

ISSN 0026-8984

Том 57, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 6, 2023

Специальный выпуск
“МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ
ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ”

(редакторы-составители И.Ю. Петрушанко, Д.С. Карпов)

Предисловие к специальному выпуску 915

**РОЛЬ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ ОКСИДА АЗОТА
И СЕРОВОДОРОДА В РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК**

Оксид азота(II) в биологии Chlorophyta

Е. В. Ермилова 916

Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами
как функционально активная, “рабочая” форма системы оксида азота
в живых организмах (обзор)

А. Ф. Ванин 925

Эффекты донора сероводорода GYY4137 на пул протеасом клеток рака прямой кишки

Е. В. Григорьева, Т. М. Астахова, А. В. Буров, В. Л. Карпов, А. В. Морозов 938

**ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС
И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ**

Белки теплового шока в защите растений от окислительного стресса

Н. П. Юрина 949

Изменения активности антиоксидантных систем *Escherichia coli*
при фосфатном голодании

*Г. В. Смирнова, А. В. Тюленев, Н. Г. Музыка,
Л. В. Сутормина, О. Н. Октябрьский* 965

Антиоксидантные и геропротекторные свойства экстракта плодов
рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.)

*Е. Ю. Платонова, Д. А. Голубев, Н. В. Земская, О. Г. Шевченко,
С. А. Патов, М. В. Шапошников, А. А. Москалев* 979

Низкомолекулярные тиолы как фактор, усиливающий чувствительность мутантов
Escherichia coli с нарушенным синтезом ADP-гептозы к антибиотикам

*Т. А. Серегина, И. Ю. Петрушанко, П. И. Заринов, Ю. Д. Кулешова,
К. В. Лобанов, Р. С. Шакулов, В. А. Митькевич, А. А. Макаров, А. С. Миронов* 995

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ
ПРИ ВОСПАЛЕНИИ**

Тимусный гормон тимозин-1 α снижает провоспалительный ответ клеток RAW 264.7,
индуцированный эндотоксином

*Е. Г. Новоселова, О. В. Глушкова, М. О. Хренов, С. М. Лунин, М. Г. Шарапов,
Р. Г. Гончаров, Э. К. Мубаракишина, Т. В. Новоселова, С. Б. Парфенюк* 1006

Протективное действие Hsp70 и доноров сероводорода в макрофагах THP-1
при ЛПС-индуцированном воспалении с участием эндоцитоза

М. М. Юринская, Д. Г. Гарбуз, М. Б. Евгеньев, М. Г. Винокуров 1017

Роль митохондрий в нарушении барьерной функции кишечного эпителия при воспалительных заболеваниях кишечника

Д. А. Чернявский, И. И. Галкин, А. Н. Павлюченкова, А. В. Фёдоров, М. А. Челомбитько

1028

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

Редокс-каталитические свойства кобаламинов

Ю. В. Шаталин, В. С. Шубина, М. Е. Соловьева, В. С. Акатов

1043

Транскрипционный фактор NRF2 в функционировании эндотелия

Н. Д. Кондратенко, Л. А. Зиновкина, Р. А. Зиновкин

1058

Идентификация мелиттинподобных белков с молекулярной массой 67 кДа, взаимодействующих с Na^+/K^+ -АТФазой

*Л. А. Варфоломеева, Е. А. Климанова, С. В. Сидоренко,
Д. А. Федоров, О. Д. Лопина*

1077

Цитохром *bd* как антиоксидантный редокс-фермент

В. Б. Борисов, М. R. Nastasi, E. Forte

1084

Характеристика дегидратазы δ -аминолевуленовой кислоты холодноводной губки *Halisarca dujardini*

*О. И. Кравчук, А. Д. Фиошин, К. В. Михайлов, Р. Х. Зиганишин,
К. И. Адамейко, Н. Г. Горностаев, А. И. Жураковская,
В. С. Михайлов, Е. И. Шагимарданова, Ю. В. Люпина*

1085

Нейрональный кальциевый сенсор-1: цинк/редоксзависимый белок сигнальных путей нервной системы

В. Е. Бакшеева, А. А. Замятнин мл., Е. Ю. Зерний

1098

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Метаболическая гетерогенность опухолей

М. В. Ширманова, С. Д. Синюшкина, А. Д. Комарова

1130

Ишемически-реперфузионные поражения: молекулярные механизмы патогенеза и способы их коррекции

Р. Г. Гончаров, М. Г. Шарпов

1150

Регуляция метаболизма и роль редокс-факторов в энергетическом контроле покоя и пролиферации кровяных клеток

М. В. Калашникова, Н. С. Полякова, А. В. Белявский

1175

Метаболический стресс эритроцитов индуцирует глутатионилирование гемоглобина

*П. И. Зарипов, Ю. Д. Кулешова, Ю. М. Полуэктов, С. В. Сидоренко, О. К. Кван,
Г. В. Максимов, В. А. Митькевич, А. А. Макаров, И. Ю. Петрушанко*

1188

ПРЕДИСЛОВИЕ К СПЕЦИАЛЬНОМУ ВЫПУСКУ

DOI: 10.31857/S0026898423060150, EDN: QGZFLX

Специальный выпуск **“Молекулярные механизмы редокс-регуляции живых организмов”** посвящен рассмотрению различных аспектов редокс-регуляции, т.е. регуляции, в основе которой лежат процессы окисления и восстановления молекул, на молекулярном, клеточном уровне и уровне целого организма.

Процессы, сопровождающиеся окислением и восстановлением молекул, обеспечивают существование всех живых организмов. Это процессы метаболизма, дыхания, противомикробной защиты клеток и внутриклеточной антиоксидантной защиты. В частности, потребление кислорода аэробными организмами при дыхании и других метаболических процессах сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК), которые способны окислять ионы металлов, повреждать белки, липиды, углеводы, а также ДНК, внося вклад в мутационный процесс и старение организмов. Нормальное функционирование клетки обеспечивается поддержанием определенного баланса восстановленных и окисленных форм молекул, в результате чего внутриклеточная среда характеризуется более низким редокс-потенциалом, чем внеклеточная. Это обеспечивается множеством ферментативных и неферментативных механизмов нейтрализации радикалов и восстановления молекул. Большую роль в этих процессах играют тиоловые группы белков и низкомолекулярные тиолы, в частности глутатион. Восстановление тиоловых групп происходит с помощью NADPH, одного из сильнейших внутриклеточных восстановителей, и катализируется рядом ферментов. При существенном сдвиге баланса между процессами окисления и восстановления в сторону окисления развивается окислительный стресс, который приводит к нарушению работы белков, повреждению структур клетки, мембран и ДНК. В случае восстановительного стресса нарушаются внутриклеточные процессы регуляции, в которые вовлечены АФК.

В настоящее время стало понятно, что поддержание редокс-гомеостаза критично для жизнеспособности клеток, а изменение внутриклеточного редокс-статуса вовлечено в регуляцию пролиферации, дифференцировки, функционирования, адаптации и гибели клеток. Нарушение редокс-гомеостаза наблюдается при целом ряде патологий — при раке, воспалении, метаболических нарушениях, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях. Кроме АФК и тиолов, в процессы редокс-регуляции активно вовлечены также газотрансмиттеры — оксид азота и сероводород. Все эти соединения активно участвуют в редокс-зависимой модификации белков, которая служит одним из ключевых механизмов, лежащих в основе клеточной редокс-регуляции. Все больше появляется данных о том, что редокс-зависимые модификации белков, такие как глутатионилирование, нитрозилирование, сульфгидрирование, не только защищают тиоловые группы белков от необратимого окисления активными формами кислорода, но и способны изменять свойства и функционирование белков самых разных классов от транспортеров до транскрипционных факторов.

Понимание механизмов редокс-регуляции открывает новые подходы к решению целого ряда проблем, таких как терапия и профилактика рака, замедление старения организма, подавление воспалительных процессов, коррекция метаболических нарушений и преодоление антибиотикорезистентности бактерий. Надеемся, что данный специальный выпуск позволит читателям осознать важность редокс-регуляции, расширить представления об окислительно-восстановительных процессах, лежащих в ее основе, и послужит толчком для дальнейших исследований в этой области.

И.Ю. Петрушанко
Д.С. Карпов

РОЛЬ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА В РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 57.053

ОКСИД АЗОТА(II) В БИОЛОГИИ Chlorophyta

© 2023 г. Е. В. Ермилова*

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: e.ermilova@spbu.ru

Поступила в редакцию 01.03.2023 г.

После доработки 20.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

NO представляет собой газообразную сигнальную редокс-молекулу, функционирующую в клетках эукариот. Однако некоторые аспекты синтеза, оборота и эффектов NO специфичны для растений. В отличие от высших растений роль NO у Chlorophyta изучена еще недостаточно. Тем не менее, некоторые механизмы контроля уровня этой сигнальной молекулы охарактеризованы на модельных представителях зеленых водорослей. Так, в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* синтез NO осуществляется с помощью двойной системы, включающей нитратредуктазу и NO-формирующую нитриредуктазу. Другие механизмы, с помощью которых NO образуется из нитрита, связаны с компонентами электрон-транспортной цепи митохондрий. Кроме того, образование NO у некоторых зеленых водорослей происходит по окислительному механизму, сходному с механизмом у млекопитающих. Недавнее выявление L-аргининзависимого синтеза NO у бесцветной водоросли *Polytomella parva* предполагает существование комплекса белков с ферментативной активностью, сходной по действию с синтазой оксида азота у животных. Это открытие прокладывает путь к дальнейшему изучению потенциальных членов семейства NO-синтаз у Chlorophyta. Неотъемлемой частью функционирования NO в клетках является не только его синтез, но и регуляторные процессы, участвующие в поддержании внутриклеточного уровня NO. Члены семейства усеченных гемоглобинов с диоксигеназной активностью могут превращать NO в нитрат, как у *C. reinhardtii*. Описано также участие NO-редуктаз в нейтрализации NO. Еще более интригующим является тот факт, что зеленые водоросли, в отличие от животных, по-видимому, не используют типичный сигнальный модуль NO-cGMP. S-нитрозированный глутатион, который считается основным резервуаром NO в клетках, передает сигналы NO белкам. S-нитрозирование белков Chlorophyta считается одним из ключевых механизмов действия редокс-молекулы. В представленной работе обсуждается современное состояние и перспективные направления исследований, связанных с биологией NO у зеленых водорослей.

Ключевые слова: Chlorophyta, NO, нитратредуктаза, NO-синтаза, S-нитрозирование**DOI:** 10.31857/S002689842306006X, **EDN:** QZMDJN

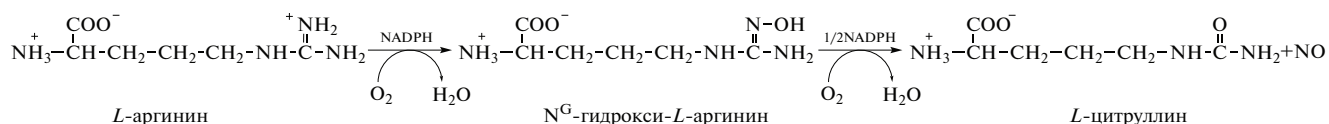
ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота(II) (NO) принадлежит к категории редокс-активных молекул, которые координируют многие физиологические и биохимические процессы в организмах разного уровня организации [1–3]. С конца 1990-х годов, после выявления роли NO в воспалительных реакциях и в процессах нейротрансмиссии у млекопитающих [4–6], началось всестороннее изучение этого газообразного свободного радикала у растений [7, 8]. На примере различных представителей высших растений установлено, что NO вовлечен в регуляцию таких процессов роста и развития, как прорастание семян, цветение и созревание плодов, развитие корней, а также в адаптацию к неблагоприятным условиям окружающей среды [9–16]. Кроме того, NO играет важную роль в симбиозе бобовых растений с ризобиями, действуя как мета-

болический интермедиат в цикле фитоглобин–NO при гипоксии [17]. Анализ восстановительных и окислительных, ферментативных и неферментативных путей эндогенного синтеза NO позволил установить, что контроль с помощью этой мультифункциональной сигнальной молекулы достигается в основном за счет посттрансляционных модификаций белков (ПТМ) [8, 18–21].

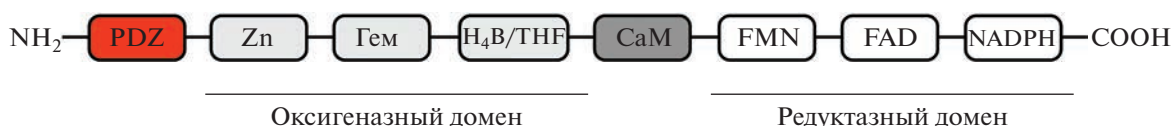
Однако большинство исследований в области функций NO и механизмов контроля его внутриклеточных уровней (биологии NO) у фотосинтезирующих организмов проведено на высших растениях. По сравнению с Embryophyta функции NO у водорослей изучены недостаточно. Это создает заметный пробел в понимании механизмов образования этой сигнальной молекулы и путей ее использования у растений в целом, особенно учитывая важную роль водорослей в морских,

а



б

NOS1 млекопитающих



NOS Chlorophyta

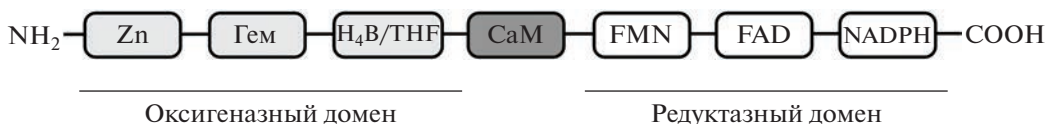


Рис. 1. Окислительный механизм формирования NO (а) и структура NOS у млекопитающих и зеленых водорослей (б).

пресноводных и наземных экосистемах. Полученные за последнее десятилетие результаты показывают, что зеленые водоросли, наряду с высшими растениями, представляют собой перспективную экспериментальную модель для изучения эволюции NO-зависимых регуляторных сетей. В предлагаемом обзоре обсуждаются последние данные о механизмах контроля внутриклеточных уровней NO, его роли и сигнальных функциях у Chlorophyta.

МЕХАНИЗМЫ СИНТЕЗА NO У CHLOROPHYTA

Механизмы, регулирующие уровни NO у фотосинтезирующих организмов, представляют одну из наиболее дискуссионных тем в биологии этой сигнальной редокс-молекулы. Зеленые водоросли способны синтезировать NO с использованием окислительного или восстановительного путей [22–26].

Окислительный путь формирования NO основан на образовании оксида азота и L-цитруллина из L-аргинина посредством двухэтапного окисления в присутствии O₂ и восстановленной формы NADPH с помощью NO-синтаз ([EC 1.14.13.39]; NOS; рис. 1а). Впервые такой механизм был выявлен у млекопитающих, которые используют три

изоформы NOS [27]. NOS млекопитающих — это двухдоменные белки, которые состоят из N-концевого оксигеназного домена (NOSox) и C-концевого редуктазного домена (NOSred) (рис. 1б). Домен NOSox связывает аргинин, протопорфирин IX (гем) и тетрагидробиоптерин (BH₄). Второй домен, NOSred, связывает NADPH, FMN и FAD [28, 29]. Оба домена соединены кальмодулинсвязывающей последовательностью (CaM). Два консервативных остатка цистеина домена NOSox в каждом мономере формируют сайт связывания цинка, который облегчает димеризацию NOS.

Первыми из NOS растений были охарактеризованы NOS зеленых одноклеточных пиководорослей, принадлежащих к классу Mamiellophyceae: *Ostreococcus tauri* (OtNOS), *O. lucimarinus* и *Bathycoccus prasinos* [22, 30, 31]. Интересно, что OtNOS обладает способностью к чрезвычайно быстрому синтезу NO, что нехарактерно для NO-синтаз животных или бактерий [32].

С использованием широкомасштабного анализа геномов и транскриптомов гомологи NOS были выявлены у некоторых водорослей [33, 34]. При этом только у 11 представителей Chlorophyta эти гомологи содержали оба домена, типичных для NOS млекопитающих, которые были соединены между собой участком, идентичным CaM-

связывающей последовательности OtNOS [33]. Следует подчеркнуть, что OtNOS сохраняет 70% активности в отсутствие CaM [22]. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что NOS Chlorophyta скорее всего не взаимодействуют с CaM. Кроме того, в отличие от NOS млекопитающих белки этого семейства у водорослей утратили консервативные аминокислотные остатки N-концевого крюка, но содержат атипичный Zn-связывающий регион [34] (рис. 1б). Еще одна отличительная особенность структурной организации NOS зеленых водорослей состоит в том, что они связывают аналог H4B, предположительно тетрагидрофолат (H4F), который, например у OtNOS, действует как донор электронов [22, 35]. Понять, являются ли эти белки истинными NOS, позволит анализ их биохимических свойств.

Примечательно, что кроме NOS “архетипического”, или “стандартного” типа, характерного для млекопитающих, обнаружены и структурно отличные от них белки [33, 36]. Поскольку в ряде случаев ингибиторный анализ выявил NOS-подобные активности у не содержащих канонических NOS представителей, предположили, что в формировании NO из аргинина могут участвовать мультимерные комплексы, состоящие из отдельных компонентов — NOSox и NOSred [21, 23].

Вместе с тем тот факт, что лишь немногие представители Chlorophyta содержат ортологи NOS, поднимает вопрос о значении этого фермента для водорослей в целом. Кроме того, у зеленых водорослей не выявлена возможность формирования NO через окислительный путь с использованием полиаминов, как у некоторых высших растений [37].

Анализ имеющихся данных указывает на то, что у большинства Chlorophyta в процессе эволюции не сохранился окислительный путь формирования NO. Вместе с тем большинство зеленых водорослей способно эффективно ассимилировать и восстанавливать нитрат, который далее восстанавливается в нитрит. Восстановительный путь формирования NO основан на его образовании из нитрита.

Восстановление нитрата в нитрит осуществляет фермент нитратредуктаза (NR). Ферменты растений локализованы в цитозоле, состоят из двух субъединиц, каждая из которых содержит три простетические группы: FAD, гем b_{557} и молибденовый кофактор (Мосо), который представляет собой молибдоптериновый комплекс с молибденом [38]. Домены фермента являются окислительно-восстановительными центрами, в которых электроны от NADPH последовательно переносятся на FAD, гем и Мосо [25]. Примечательно, что фермент обладает двумя активностями: диафоразной и терминальной. В диафоразной, или дегидрогеназной активности электроны, посту-

пающие от NADPH, используются для восстановления акцепторов электронов, таких как, например, ферроцианид или цитохром *c*. Терминальная активность NR определяет восстановление нитрата с помощью электронов, полученных от таких доноров, как FMN, метилвиологен или бромфеноловый синий.

Экспериментальные данные, полученные на высших растениях, позволили предположить, что Мо-содержащая NR — основной фермент, ответственный за генерирование NO из нитрита у растений [8, 39, 40]. Вместе с тем, в стандартных условиях активность, обеспечивающая восстановление нитрита, составляет около 1% от общей активности NR [41]. Последнее обстоятельство предполагает минимальный вклад фермента в синтез NO. Не исключено, что другие Мосо-зависимые ферменты могут отвечать за формирование NO у растений [42].

В настоящее время нитритзависимое формирование NO экспериментально доказано только у нескольких видов зеленых водорослей [25, 43–46]. Наиболее подробно молекулярные механизмы генерирования редокс-молекулы изучены у модельной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Анализ нитритзависимого генерирования сигнальной молекулы у этой зеленой водоросли позволил пересмотреть роль NR в этом процессе. Так показано, что при образовании NO из нитрита NR взаимодействует с еще одним Мо-содержащим белком — NOFNiR (NO-формирующей нитритредуктазой) [44] (рис. 2). NOFNiR синтезирует NO независимо от Мо-центра NR, но использует электроны, поставляемые за счет диафоразной активности NR. Пока неясно, используется ли подобная двойная система NR-NOFNiR и другими зелеными водорослями, и высшими растениями.

Изучение адаптации *C. reinhardtii* к гипоксии показало, что нитритзависимое формирование NO происходит в отсутствие функциональной NR [47], а значит, осуществляется с использованием другого, независимого от NR, механизма. У высших растений компоненты электрон-транспортной цепи митохондрий (мтЭТЦ) вовлечены в синтез NO [48, 49]. Роль мтЭТЦ в формировании NO изучена у *Chlorella sorokiniana* и *C. reinhardtii* [43, 50] (рис. 2). Однако механизмы нитритзависимого синтеза NO требуют дальнейшего изучения с привлечением большего числа объектов.

МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ NO У CHLOROPHYTA

Чтобы исключить повреждающее действие NO, организмы должны контролировать его внутриклеточные уровни. Так, *C. reinhardtii* содержит усеченный гемоглобин 1 (THB1), который обладает NO-диоксигеназной активностью и

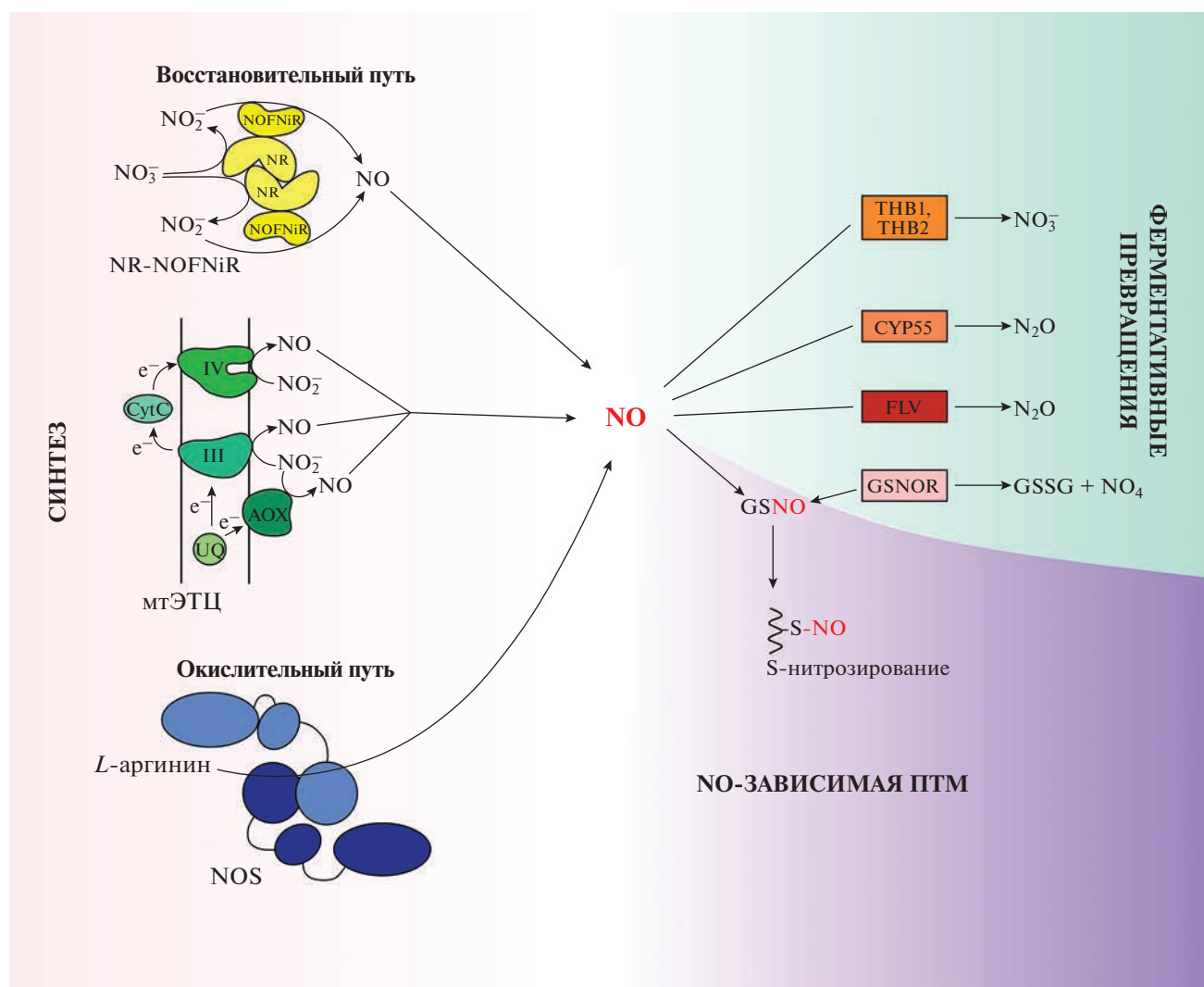


Рис. 2. Механизмы контроля внутриклеточных уровней NO у Chlorophyta.

может взаимодействовать с NR [51]. THB1 принимает электроны от NR и превращает NO в нитрат в присутствии кислорода (рис. 2), т.е. функционирует как альтернативный акцептор электронов. Интересно, что этот механизм описан у двух водорослей *Chattonella subsalsa* и *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), у которых химерные гены кодируют как THB, так и NR [52]. Еще один усеченный гемоглобин *C. reinhardtii*, THB2, также обладающий NO-диоксигеназной активностью, необходим (дополнительно к THB1) для контроля уровней внутриклеточного NO в условиях дефицита фосфора [53, 54]. Предполагается, что усеченные гемоглобины вовлечены в модуляцию уровней NO и за счет этого могут контролировать NO-зависимые сигнальные пути [45, 51, 53, 54].

Кроме того, NO, как показано недавно, может служить субстратом для NO-редуктаз *C. reinhardtii*, которые катализируют образование оксида

азота(I) (N_2O) в митохондриях и хлоропластах [55–57]. На свету процесс формирования катализируется FLV-белками, а в темноте цитохромом P450 – CYP55 [57]. Примечательно, что CYP55 синтезируется и функционирует в основном при низком содержании кислорода в среде [58]. Поскольку различные Chlorophyta используют оба механизма синтеза N_2O [57], этот путь контроля уровней NO у зеленых водорослей может быть наиболее консервативным.

Уровни NO в клетках могут регулироваться также путем окисления производных NO (RNS) с антиоксидантом – трипептидом глутатионом (GSH, Glu-Cys-Glu), что приводит к образованию S-нитрозоглутатиона (GSNO), который рассматривается в качестве основного внутриклеточного резервуара NO [59]. Поскольку GSNO действует как своеобразный буфер NO, его уровни важны для обеспечения гомеостаза NO. В связи с

этим S-нитрозоглутатионредуктаза (GSNOR), которая катализирует необратимое превращение GSNO в окисленный глутатион, вовлечена по сути в поддержание баланса активных форм азота и, в конечном счете, в контроль редокс-состояния цитоплазмы [60]. Интересно, что в ядерном геноме *C. reinhardtii* выявлены два гена, кодирующих изоформы GSNOR. Охарактеризован фермент CrGSNOR1 и установлена его ограниченная чувствительность к редокс-зависимым посттрансляционным модификациям [61]. Предполагается, что уровни нитрозотиолов в клетках водоросли контролируются другими ферментами или регулируются в основном на уровне синтеза NO. Подобное отличие от высших растений может быть связано с разными потребностями в регуляции метаболизма NO у Chlorophyta и Streptophyta.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ NO У CHLOROPHYTA

У млекопитающих описан NO-зависимый сигнальный путь, в котором продуцируемый синтазой NO активирует растворимые гуанилатциклазы (pGC), которые катализируют синтез второго посредника cGMP из гуанозин-5'-трифосфата. Передача сигнала осуществляется через последующее действие cGMP на белки-эффекторы [62].

У пяти видов зеленых водорослей (Chlorophyta, порядок Chlamydomonadales) выявлены 11 белков, гомологичных pGC [24]. Однако во всех белках зеленых водорослей отсутствовали остатки цистеина (Cys78 и Cys214), необходимые для восприятия pGC молекулы NO. Последнее обстоятельство указывает на то, что ни один из этих белков не может отвечать на действие NO, подобно pGC животных. Кроме того, проанализированные pGC *C. reinhardtii*, CYG12, CYG56 и CYG11, не демонстрировали зависимости от NO [63]. Более того, CYG11 охарактеризован как потенциальный CO-сенсор [64]. Имеющиеся данные позволяют сделать вывод о том, что растения не используют классический модуль NO/cGMP [65]. По-видимому, в процессе эволюции у животных и растений произошла дивергенция контролируемых NO сигнальных путей.

Считается, что у высших растений основной NO-зависимый сигнальный механизм связан с посттрансляционным S-нитрозированием белков [24]. При модификациях этого типа молекула NO реагирует с тиоловой группой цистеина в присутствии акцептора электронов и образуется ковалентная связь S-NO—S-нитрозотиол [66].

Среди зеленых водорослей S-нитрозирование анализировали главным образом у *C. reinhardtii*. У этой модельной водоросли выявлено около 500 S-нитрозированных белков, функции кото-

рых связаны с метаболическими процессами, синтезом, фолдингом и деградацией белков, репликацией, транскрипцией и другими функциями клетки [67]. Кроме того, охарактеризовано несколько белков *C. reinhardtii*, подвергающихся этой ПТМ [68, 69]. Оксид азота образуется в клетках *C. reinhardtii* при ассимиляции нитрата [70, 71], голодании по макроэлементам [45, 53, 54, 72, 73], в условиях гипоксии [47] и важен для синтеза пролина и путресцина [74], однако S-нитрозирование белков охарактеризовано только при солевом стрессе [75]. Способностью к S-нитрозированию обладает также близкородственная *C. reinhardtii* нефотосинтезирующая водоросль *P. parva* [23]. Таким образом, чтобы экспериментально подтвердить предположение о ключевой роли S-нитрозирования в действии NO на зеленые водоросли, необходим анализ этой модификации белков у других представителей Chlorophyta и в разных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Исследования последних лет привели к обнаружению синтеза NO представителями Chlorophyta. Однако несмотря на широкое использование зеленых водорослей в научных исследованиях и биотехнологии, механизмы формирования/утилизации NO и его роль в путях передачи сигналов у этих организмов пока недостаточно понятны. Одной из основных проблем в изучении роли NO была (и остается) расшифровка механизмов, которые определяют изменение его внутриклеточных уровней. Так, у высших растений ключевая роль в синтезе NO приписывается NR. У *C. reinhardtii* открыта новая система формирования редокс-молекулы, состоящая из двух ферментов: NO-формирующей нитритредуктазы и NR. Вместе с тем остается неясным, функционирует ли подобная система у других водорослей или они, подобно высшим растениям, используют NR для синтеза NO.

Открытие окислительного пути синтеза NO и характеристика NOS у некоторых Chlorophyta также не позволяют пока понять, насколько широко эта группа организмов использует аргинин в качестве субстрата для генерации NO и могут ли комплексы, состоящие из нескольких белков, функционально заменять NOS. В пользу последнего предположения свидетельствует недавнее открытие аргининзависимого синтеза NO у нефотосинтезирующей водоросли *P. parva*, утратившей NR в процессе эволюции.

Не менее интригующим остается ферментативное превращение NO. В ряде работ установлено участие в этом процессе усеченных гемоглобинов с диоксигеназной активностью. Кроме того, оказалось, что в снижении уровней NO в клетках зеленых водорослей важную роль могут играть

NO-редуктазы, катализирующие превращение NO в N₂O. В целом, для выяснения всех нерешенных вопросов необходимо исследование большего числа объектов.

Следует отдельно выделить еще одно интенсивно развивающееся направление, связанное с анализом механизмов действия этой сигнальной молекулы. Метаболизм оксида азота регулируется редокс-состоянием клеток. Совместно с другими редокс-молекулами, NO вовлечен в контроль клеточных редокс-процессов. В этой связи у Chlorophyta прежде всего необходимо детальное изучение взаимодействия NO с активными формами кислорода. Кроме того, последние данные позволяют поставить под сомнение, что Chlorophyta используют в регуляторных сетях типичный для животных модуль NO-сGMP. В отсутствие у водорослей специфических рецепторов восприятие и действие NO осуществляется, по-видимому, преимущественно через ПТМ. Для подтверждения правильности предположения о ключевой роли ПТМ по типу S-нитрозирования необходим анализ S-нитросом у различных представителей Chlorophyta в физиологических условиях, при которых в клетках генерируется редокс-молекула. По нашему мнению, дальнейший прогресс в области биологии NO у Chlorophyta позволит судить об эволюции ключевых компонентов (ферментов и регуляторных белков) биосинтеза и утилизации оксида азота, а также о тех регуляторных сетях, которые контролируются NO у растений.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 21-14-00017 для Е.Е.В.).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wendehenne D., Durner J., Klessig D.F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**(4), 449–455.
- Wendehenne D., Pugin A., Klessig D.F., Durner J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**(4), 177–183.
- Bredt D.S., Snyder S.H. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. **8**(1), 3–11.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**(24), 9265–9269.
- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. **327**(6122), 524–526.
- Cox M.A., Bassi C., Saunders M.E., Nechanitzky R., Morgado-Palacin I., Zheng C., Mak T.W. (2020) Beyond neurotransmission: acetylcholine in immunity and inflammation. *J. Intern. Med.* **287**(2), 120–133.
- Astier J., Gross I., Durner J. (2018) Nitric oxide production in plants: an update. *J. Exp. Bot.* **69**(14), 3401–3411.
- Kolbert Z.S., Barroso J.B., Brouquisse R., Corpas F.J., Gupta K.J., Lindermayr C., Loake G.J., Palma J.M., Petřivalský M., Wendehenne D., Hancock J.T. (2019) A forty year journey: the generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide*. **93**, 53–70.
- Yu M., Lamattina L., Spoel S.H., Loake G.J. (2014) Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytol.* **202**(4), 1142–1156.
- He Y., Tang R.H., Hao Y., Stevens R.D., Cook C.W., Ahn S.M., Jing L., Yang Z., Chen L., Guo F., Fiorani F., Jackson R.B., Crawford N.M., Pei Z.M. (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science*. **305**(5692), 1968–1971.
- Bethke P.C., Libourel I.G., Jones R.L. (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **57**(3), 517–526.
- Sun C., Lu L., Liu L., Liu W., Yu Y., Liu X., Hu Y., Jin C., Lin X. (2014) Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol.* **201**(4), 1240–1250.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **59**(2), 165–176.
- Qiao W., Fan L.M. (2008) Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* **50**(10), 1238–1246.
- Fancy N.N., Bahlmann A.K., Loake G.J. (2017) Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant Cell Environ.* **40**(4), 462–472.
- González-Gordo S., Bautista R., Claros M.G., Cañas A., Palma J.M., Corpas F.J. (2019) Nitric oxide-dependent regulation of sweet pepper fruit ripening. *J. Exp. Bot.* **70**(17), 4557–4570.
- Berger A., Boscari A., Frendo P., Brouquisse R. (2019) Nitric oxide signaling, metabolism and toxicity in nitrogen-fixing symbiosis. *J. Exp. Bot.* **70**(17), 4505–4520.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci.* **16**(3), 160–168.
- Astier J., Lindermayr C. (2012) Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(11), 15193–15208.
- Corpas F.J., Chaki M., Leterrier M., Barroso J.B. (2009) Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signal. Behav.* **4**(10), 920–923.

21. Corpas F.J., Palma J.M., Río L.A.D., Barroso J.B. (2009) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.* **184**, 9–14.
22. Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Calo G., Salerno G., Lamattina L. (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell.* **22**(11), 3816–3830.
23. Lapina T., Statinov V., Puzanskiy R., Ermilova E. (2022) Arginine-dependent nitric oxide generation and S-nitrosation in the non-photosynthetic unicellular alga *Polytomella parva*. *Antioxidants.* **11**(5), 949.
24. Astier J., Mounier A., Santolini J., Jeandroz S., Wendehenne D. (2019) The evolution of nitric oxide signaling diverges between animal and green lineages. *J. Exp. Bot.* **70**(17), 4355–4364.
25. Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. (2017) Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends Plant Sci.* **22**(2), 163–174.
26. Mallick N., Rai L.C., Mohn F.H., Soeder C.J. (1999) Studies on nitric oxide (NO) formation by the green alga *Scenedesmus obliquus* and the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Chemosphere.* **39**(10), 1601–1610.
27. Stuehr D.J., Santolini J., Wang Z.Q., Wei C.C., Adak S. (2004) Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* **279**(35), 36167–36170.
28. Daff S. (2010) NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide.* **23**(1), 1–11.
29. Li H., Poulos T.L. (2005) Structure–function studies on nitric oxide synthases. *J. Inorg. Biochem.* **99**(1), 293–305.
30. Di Dato V., Musacchia F., Petrosino G., Patil S., Montresor M., Sanges R., Ferrante M.I. (2015) Transcriptome sequencing of three pseudo-nitzschia species reveals comparable gene sets and the presence of nitric oxide synthase genes in diatoms. *Sci. Rep.* **5**(1), 12329.
31. Kumar A., Castellano I., Patti F.P., Palumbo A., Buia M.C. (2015) Nitric oxide in marine photosynthetic organisms. *Nitric Oxide.* **47**, 34–39.
32. Weisslocker-Schaetzel M., André F., Touazi N., Foresi N., Lembrouk M., Dorlet P., Frelet-Barrand A., Lamattina L., Santolini J. (2017) The NOS-like protein from the microalgae *Ostreococcus tauri* is a genuine and ultrafast NO-producing enzyme. *Plant Sci.* **265**, 100–111.
33. Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E.J., Wong G.K.S., Wendehenne D. (2016) Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.* **9**(417), re2.
34. Santolini J., André F., Jeandroz S., Wendehenne D. (2017) Nitric oxide synthase in plants: where do we stand? *Nitric Oxide.* **63**, 30–38.
35. Foresi N., Mayta M.L., Lodeyro A.F., Scuffi D., Correa-Aragunde N., García-Mata C., Casalougué C., Carrillo N., Lamattina L. (2015) Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **82**(5), 806–821.
36. Chatelain P., Astier J., Wendehenne D., Rosnoblet C., Jeandroz S. (2021) Identification of partner proteins of the algae *Klebsormidium nitens* NO synthases: toward a better understanding of NO signaling in eukaryotic photosynthetic organisms. *Front. Plant Sci.* **12**, 3068.
37. Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I.S., Scherer G.F. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* **47**(3), 346–354.
38. Campbell M.G., Smith B.C., Potter C.S., Carragher B., Marletta M.A. (2014) Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**(35), E3614–E3623.
39. Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(25), 16314–16318.
40. Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S. (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* **4**(4), 128–129.
41. Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.* **53**(366), 103–110.
42. Tejada-Jimenez M., Llamas A., Galván A., Fernández E. (2019) Role of nitrate reductase in NO production in photosynthetic eukaryotes. *Plants.* **8**(3), 56.
43. Tischner R., Planchet E., Kaiser W.M. (2004) Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Lett.* **576**(1–2), 151–155.
44. Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Llamas Á., Ocaña-Calahorra F., Mariscal V., Carreras A., Barroso J.B., Galván A., Fernández E. (2016) A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ.* **39**(10), 2097–2107.
45. Minaeva E., Zalutskaya Z., Filina V., Ermilova E. (2017) Truncated hemoglobin 1 is a new player in *Chlamydomonas reinhardtii* acclimation to sulfur deprivation. *PLoS One.* **12**(10), e0186851.
46. Zalutskaya Z., Korkina S., Ermilova E. (2023) Second nitrate reductase of *Dunaliella salina*: functional redundancy or greatly? *Protistology.* **17**(1), 16–29.
47. Hemschemeier A., Düner M., Casero D., Merchant S.S., Winkler M., Happe T. (2013) Hypoxic survival requires a 2-on-2 hemoglobin in a process involving nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**(26), 10854–10859.
48. Gupta K.J., Igamberdiev A.U. (2011) The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion.* **11**(4), 537–543.
49. Vishwakarma A., Kumari A., Mur L.A., Gupta K.J. (2018) A discrete role for alternative oxidase under hy-

- poxia to increase nitric oxide and drive energy production. *Free Radic. Biol. Med.* **122**, 40–51.
50. Ostroukhova M., Ermilova E. (2019) New insights into NO generation and AOX1 upregulation in *Chlamydomonas*. *Protistology*. **13**(1), 19–25.
 51. Sanz-Luque E., Chamizo-Ampudia A., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. (2015) Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* **6**, 899.
 52. Stewart J.J., Coyne K.J. (2011) Analysis of raphidophyte assimilatory nitrate reductase reveals unique domain architecture incorporating a 2/2 hemoglobin. *Plant Mol. Biol.* **77**, 565–575.
 53. Filina V., Grinko A., Ermilova E. (2019) Truncated hemoglobins 1 and 2 are implicated in the modulation of phosphorus deficiency-induced nitric oxide levels in *Chlamydomonas*. *Cells*. **8**(9), 947.
 54. Grinko A., Alqoubaili R., Lapina T., Ermilova E. (2021) Truncated hemoglobin 2 modulates phosphorus deficiency response by controlling of gene expression in nitric oxide-dependent pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. **254**, 1–15.
 55. Plouviez M., Wheeler D., Shilton A., Packer M.A., McLenachan P.A., Sanz-Luque E., Ocaña-Calahorra F., Fernández E., Guieysse B. (2017) The biosynthesis of nitrous oxide in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **91**(1), 45–56.
 56. Plouviez M., Shilton A., Packer M.A., Guieysse B. (2019) Nitrous oxide emissions from microalgae: potential pathways and significance. *J. Appl. Phycol.* **31**, 1–8.
 57. Burlacot A., Richaud P., Gosset A., Li-Beisson Y., Peltier G. (2020) Algal photosynthesis converts nitric oxide into nitrous oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**(5), 2704–2709.
 58. Zalutskaya Z., Dukhnov S., Leko N., Ermilova E. (2021) Nitric oxide levels and CYP55 expression in *Chlamydomonas reinhardtii* under normoxia and hypoxia. *Protistology*. **15**(3), 153–160.
 59. Frungillo L., Skelly M.J., Loake G.J., Spoel S.H., Salgado I. (2014) S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nat. Commun.* **5**(1), 5401.
 60. Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2019) S-nitrosoglutathione reductase – the master regulator of protein S-nitrosation in plant NO signaling. *Plants*. **8**(2), 48.
 61. Tagliani A., Rossi J., Marchand C.H., De Mia M., Tedesco D., Gurrieri L., Meloni M., Falini G., Trost P., Lemaire S.D., Fermani S., Zaffagnini M. (2021) Structural and functional insights into nitrosoglutathione reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Redox Biol.* **38**, 101806.
 62. Martínez-Ruiz A., Cadenas S., Lamas S. (2011) Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **51**(1), 17–29.
 63. de Montaigu A., Sanz-Luque E., Galvan A., Fernandez E. (2010) A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*. **22**(5), 1532–1548.
 64. Horst B.G., Stewart E.M., Nazarian A.A., Marletta M.A. (2019) Characterization of a carbon monoxide-activated soluble guanylate cyclase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*. **58**(17), 2250–2259.
 65. Astier J., Rossi J., Chatelain P., Klinguer A., Besson-Bard A., Rosnoblet C., Jeandroz S., Nicolas-Francis V., Wendehenne D. (2021) Nitric oxide production and signalling in algae. *J. Exp. Bot.* **72**(3), 781–792.
 66. Smith B.C., Marletta M.A. (2012) Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**(5–6), 498–506.
 67. Morisse S., Zaffagnini M., Gao X.H., Lemaire S.D., Marchand C.H. (2014) Insight into protein S-nitrosylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Antioxid. Redox Signal.* **21**(9), 1271–1284.
 68. Zaffagnini M., Michelet L., Sciabolini C., di Giacinto N., Morisse S., Marchand C.H., Trost P., Fermani S., Lemaire S.D. (2014) High-resolution crystal structure and redox properties of chloroplastic triosephosphate isomerase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Plant*. **7**(1), 101–120.
 69. Berger H., De Mia M., Morisse S., Marchand C.H., Lemaire S.D., Wobbe L., Kruse O. (2016) A light switch based on protein S-nitrosylation fine-tunes photosynthetic light harvesting in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **171**(2), 821–832.
 70. Sanz-Luque E., Ocaña-Calahorra F., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. (2013) Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Exp. Bot.* **64**(11), 3373–3383.
 71. Zalutskaya Z., Kochemasova L., Ermilova E. (2018) Dual positive and negative control of *Chlamydomonas* PII signal transduction protein expression by nitrate/nitrite and NO via the components of nitric oxide cycle. *BMC Plant Biol.* **18**, 1–10.
 72. Wei L., Derrien B., Gautier A., Houille-Vernes L., Boulouis A., Saint-Marcoux D., Malnoë A., Rappaport F., de Vitry C., Vallon O., Choquet Y., Wollman F.A. (2014) Nitric oxide-triggered remodeling of chloroplast bioenergetics and thylakoid proteins upon nitrogen starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*. **26**(1), 353–372.
 73. De Mia M., Lemaire S.D., Choquet Y., Wollman F.A. (2019) Nitric oxide remodels the photosynthetic apparatus upon S-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **179**(2), 718–731.
 74. Zalutskaya Z., Derkach V., Puzanskiy R., Ermilova E. (2020) Impact of nitric oxide on proline and putrescine biosynthesis in *Chlamydomonas* via transcriptional regulation. *Biol. Plant.* **64**, 653–659.
 75. Chen X., Tian D., Kong X., Chen Q., Ef A., Hu X., Jia A. (2016) The role of nitric oxide signalling in response to salt stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. **244**, 651–669.

Nitric Oxide(II) in Biology of Chlorophyta

E. V. Ermilova*

Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

**e-mail: e.ermilova@spbu.ru*

NO is a gaseous signaling redox-active molecule that functions in various eukaryotes. However, its synthesis, turnover, and effects in cells are specific in plants in several aspects. Compared with higher plants, the role of NO in Chlorophyta has not been investigated enough. Yet, some of the mechanisms for controlling levels of this signaling molecule have been characterized in model green algae. In *Chlamydomonas reinhardtii*, NO synthesis is carried out by a dual system comprising nitrate reductase and NO-forming nitrite reductase. Other mechanisms that might produce NO from nitrite are associated with components of mitochondrial electron-transport chain. In addition, NO formation in some green algae proceeds by oxidative mechanism similar to that in mammals. Recent discovery of *L*-arginine-dependent NO synthesis in colorless alga *Polytomella parva* suggests the existence of a protein complex with enzyme activity that are similar to animal nitric oxide synthase. This latter finding paves the way for further research into potential members of the NO synthases family in Chlorophyta. Beyond synthesis, the regulatory processes to maintain intracellular NO levels are also an integral part for its function in cells. Members of the truncated hemoglobins family with dioxygenase activity can convert NO to nitrate, as was shown for *C. reinhardtii*. In addition, the implication of NO reductases in NO scavenging has also been described. Even more intriguing, unlike in animals, the typical NO/cGMP signaling module appears not to be used by green algae. S-nitrosylated glutathione, which is considered the main reservoir for NO, provides NO signals to proteins. In Chlorophyta, protein S-nitrosation is one of the key mechanisms of action of the redox molecule. In this review, we discuss the current state-of-the-art and possible future directions related to the biology of NO in green algae.

Keywords: Chlorophyta, NO, nitrate reductase, NO-synthase, S-nitrosation

РОЛЬ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА В РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 577.3.043.577.35'3.053.013

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛ-СОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ КАК ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНАЯ, “РАБОЧАЯ” ФОРМА СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ (ОБЗОР)

© 2023 г. А. Ф. Ванин*

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия

*e-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 31.03.2023 г.

После доработки 22.05.2023 г.

Принята к публикации 22.05.2023 г.

Суммированы экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами можно рассматривать в качестве эндогенной “рабочей формы” системы оксида азота (NO), функционирующей в живых организмах. Эти комплексы могут служить донорами как молекул NO, ответственных за позитивное регуляторное действие системы оксида азота на различные физиологические и биохимические процессы в организме животных и человека, так и катионов нитрозония (NO^+), ответственных в основном за проявление негативной цитотоксической активности этой системы. Особое внимание уделено способности динитрозильных комплексов железа, особенно в комбинации с производными дитиокарбамата, подавлять коронавирусную инфекцию SARS-CoV-2 у сирийских хомячков.

Ключевые слова: оксид азота, динитрозильные комплексы железа, катионы нитрозония, S-нитрозотиос

DOI: 10.31857/S0026898423060204, **EDN:** QLHGFC

В настоящее время установлено, что в клетках всех представителей живого мира — человека и животных, растений и микроорганизмов, непрерывно ферментативным путем продуцируется простейшее химическое соединение — монооксид азота, или оксид азота (NO), который функционирует и как положительный, и как отрицательный регулятор практически всех метаболических процессов [1–3]. Положительное действие оксида азота на эти процессы проявляется в активации метаболических процессов, тогда как негативное приводит к их подавлению и развитию цитотоксических эффектов.

Ясно, что время жизни NO в живых организмах как активной свободно-радикальной молекулы в свободном (несвязанном) состоянии не может быть достаточно длительным для реализации как паракринного, так и аутокринного действия NO. Поэтому Природа для реализации такого действия “прибегает” к включению NO в такие его эндогенные соединения, как S-нитрозотиолы (RS-NO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с низко- и высокомолекулярными (белки) тиол-содержащими лигандами, обеспечивающими перенос NO на значительные расстояния до соответствующих мишеней его биологического действия с последующим высвобождением,

необходимым для взаимодействия с этими мишенями [4–9].

Как показано в публикациях нашей группы, в организме RS-NO и ДНКЖ могут взаимно превращаться, что делает их существование взаимозависимым — ДНКЖ могут превращаться в RS-NO, тогда как RS-NO в присутствии двухвалентного железа переходит обратно в ДНКЖ. Тем не менее, решающая роль в системе ДНКЖ–RS-NO как компонента, определяющего появление самой этой системы, отводится ДНКЖ [6, 8].

Результаты последних исследований ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами показывают, что в живых организмах эти комплексы могут выступать не только в качестве доноров нейтральных молекул NO, но и катионов нитрозония (NO^+) [10–12]. Именно эта способность ДНКЖ может быть ответственной за цитотоксическую активность этих комплексов. Появление этих катионов в составе ДНКЖ обеспечивается, по нашему мнению, механизмом образования этих комплексов, важнейшей стадией которого является реакция диспропорционирования молекул NO, попарно связывающихся с ионом двухвалентного железа [13]. В результате этой реакции молекулы NO превращаются в анион нитроксила (NO^-) и катион нитрозония (схема 1). Анионы нитроксила,

связываясь с протонами, превращаются в нейтральные молекулы нитроксила (HNO), выходящие из лигандного окружения железа. В освободившееся место включается другая (третья) молекула NO, что приводит к образованию моноядерной формы ДНКЖ (М-ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами, описываемой в соответствии со схемой 1 резонансной структурой — $[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$. Что касается сохранения в комплексе катиона нитрозония, который, связываясь с анионом гид-

роксидила, мог бы превратиться в азотистую кислоту, выходящую из комплекса, то этого не происходит из-за переноса на катион нитрозония, как сильного электрофила, электронной плотности с нуклеофильных компонентов ДНКЖ — атомов серы тиол-содержащих лигандов. Этот перенос нейтрализует положительный заряд на катионе нитрозония, предотвращая тем самым его взаимодействие с анионом гидроксидила и обеспечивая сохранение ДНКЖ.

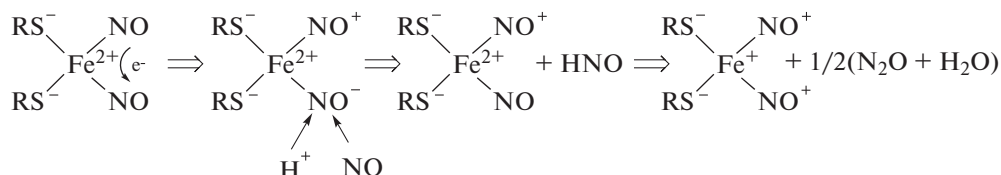


Схема 1. Механизм образования моноядерной формы ДНКЖ в реакции NO с Fe^{2+} и тиол-содержащими соединениями (RS^-) [12].

Реакция диспропорционирования молекул NO, т. е. одноэлектронного взаимного окисления-восстановления этих молекул, обеспечивает превращение исходного диамагнитного железо-динитрозильного $[Fe^{2+}(NO)_2]$ фрагмента (ЖДНФ) с четным числом электронов в парамагнитное состояние с $S = 1/2$, характеризующееся сигналом ЭПР с $g_{cp} = 2.03$ — сигналом 2.03. Именно по этому сигналу эти комплексы впервые были обнаружены и идентифицированы в живых организмах еще в 60-е годы прошлого столетия [14–16].

При снижении концентрации тиол-содержащих соединений парамагнитные М-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами обратимо димеризуются в биядерные диамагнитные ДНКЖ (Б-ДНКЖ, резонансная структура $[(RS^-)_2Fe_2^{2+}(NO)_2(NO^+)_2]$), преимущественно (по сравнению с М-ДНКЖ) представленные в тканях животных [17]. Диамагне-

тизм этих комплексов — результат спаривания спинов двух ЖДНФ по серным мостикам, связывающим в Б-ДНКЖ эти фрагменты. Характерный показатель — приведенный на рис. 1 спектр оптического поглощения с двумя основными полосами на 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции (ϵ), равными соответственно 4600 и $3700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ в пересчете на один ЖДНФ в Б-ДНКЖ [17]. На том же рис. 1 приведен спектр оптического поглощения S-нитрозотиола с основной полосой на 334 ($\epsilon = 0.94 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и слабой полосой на 540 нм [18].

М- и Б-ДНКЖ с резонансной структурой ЖДНФ $[Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$ могут возникать также и в реакции Fe^{2+} , тиолов и молекул S-нитрозотиолов (RS^-NO^+), попарно связывающихся, как и молекулы NO на схеме 1, с ионом Fe^{2+} с последующим их диспропорционированием (схема 2):

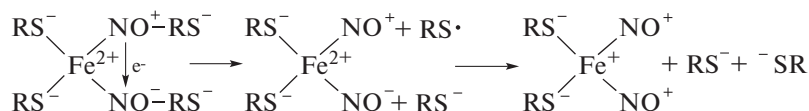


Схема 2. Механизм образования М-ДНКЖ в реакции $RS-NO$ с Fe^{2+} и тиол-содержащими соединениями (RS^-) [12].

Диспропорционирование молекул $RS-NO$ переводит их в неустойчивое состояние — в $(RS^\cdot-NO^+)$ и $(NO-RS^-)$, соответственно, с последующим распадом этих аддуктов и высвобождением из комплексов тиольного радикала и ионизованного тиола (тиолят-аниона) и сохранением в составе комплексов NO и NO^+ , что и приводит к образованию ДНКЖ с резонансной структурой

$[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+) = (RS^-)_2Fe^+(NO^+)(NO^+)]$, такой же, как при образовании ДНКЖ в реакции NO с Fe^{2+} и тиол-содержащими соединениями, приведенной на схеме 1.

Очевидно, что химическое равновесие между М-ДНКЖ с представленной на схемах 1 и 2 резонансной структурой и составляющими этот комплекс компонентами описывается реакцией, приведенной на схеме 3:

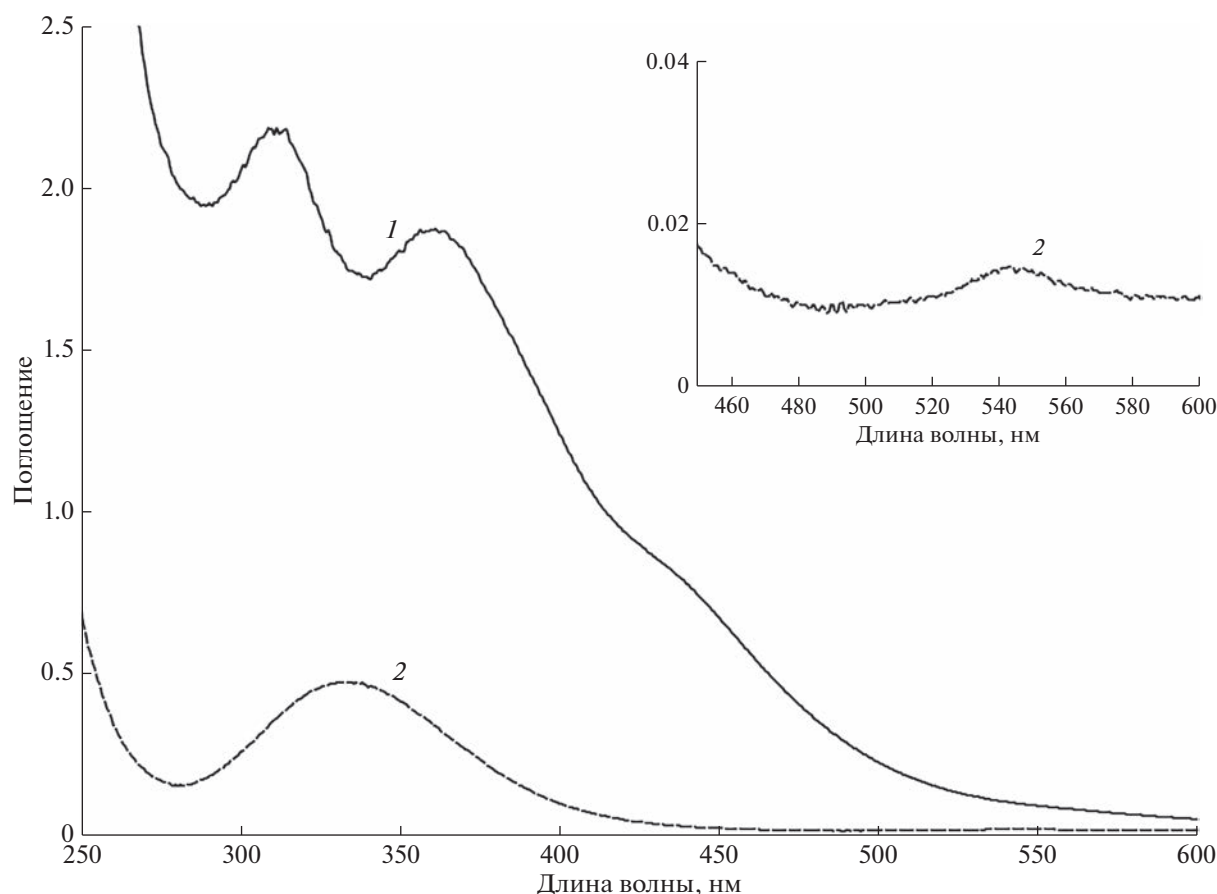


Рис. 1. Спектры поглощения Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами (кривая 1) и S-нитрозотиолов (кривая 2). Во вставке показано слабое оптическое поглощение S-нитрозотиолов в области 540 нм.

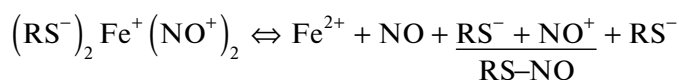


Схема 3. Химическое равновесие между М-ДНКЖ с составляющими этот комплекс компонентами — тиолами, ионами Fe^{2+} , молекулами NO и катионами нитрозония [12].

В соответствии с этой схемой М-ДНКЖ нитрозильные лиганды могут высвобождаться из этих комплексов как в форме нейтральных молекул NO, так и в форме катионов нитрозония, причем в одинаковом соотношении. Такое высвобождение невозможно в случае резонансной структуры ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами — $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^-(\text{NO}^+)_2]$, которой придерживаются многие исследователи этих комплексов. Резонансная структура действительно может быть справедливой для кристаллической формы этих комплексов, но, по-моему, в соответствии с аргументами, приведенными в наших работах [11, 12, 14], она не характеризует эти комплексы в растворенном состоянии. При установлении химического равновесия ДНКЖ с резонансной структурой $[(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^-(\text{NO}^+)_2]$ нитрозильные лиганды

могут высвобождаться из этих комплексов только в форме NO и NO^- , но не в форме катионов нитрозония [11, 12, 14].

Представление о том, что ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами выступают в качестве стабилизатора, переносчика и донора оксида азота, является сейчас общепринятым [7, 9]. Что же касается цитотоксического действия этих комплексов, то большинство исследователей, полагающих, что ДНКЖ могут высвобождать только молекулы NO, естественно считают, что цитотоксическая активность этих комплексов может определяться только этими молекулами, точнее продуктом их реакции с анионами супероксида — пероксинитритом (ONOO^-) [7, 9]. При протонировании пероксинитрит распадается на сильнейшие цитотоксины — гидроксильный радикал и диоксид азота [19, 20].

Что же касается катионов нитрозония, как эффективных цитотоксичных агентов, высвобождающихся из ДНКЖ, то такое предположение впервые было высказано в работе группы российских и немецких исследователей [21], изучавших цитотоксическое действие М-ДНКЖ с тиосульфатом (М-ДНКЖ-ТС) на культуру опухолевых клеток Jurkat. Оказалось, что такое действие полностью сохранялось после разрушения использованных комплексов одним из производных дитиокарбамата — *N*-метил-D,L-глукаминдитиокарбамата (МГД).

По мнению авторов, этот результат однозначно свидетельствовал о том, что цитотоксическое

действие М-ДНКЖ-ТС на клетки Jurkat обусловлено высвобождением из комплекса катиона нитрозония. Это заключение следует из приведенного на схеме 4 механизма разрушительного действия МГД как производного дитиокарбамата на М- и Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами. Это разрушение вызывается перехватом молекулами МГД (дитиокарбамата) железо-мононитрозильной группы из ЖДНФ с образованием мононитрозильного комплекса железа (МНКЖ) с МГД и сопутствующим высвобождением из М- и Б-ДНКЖ катиона нитрозония.

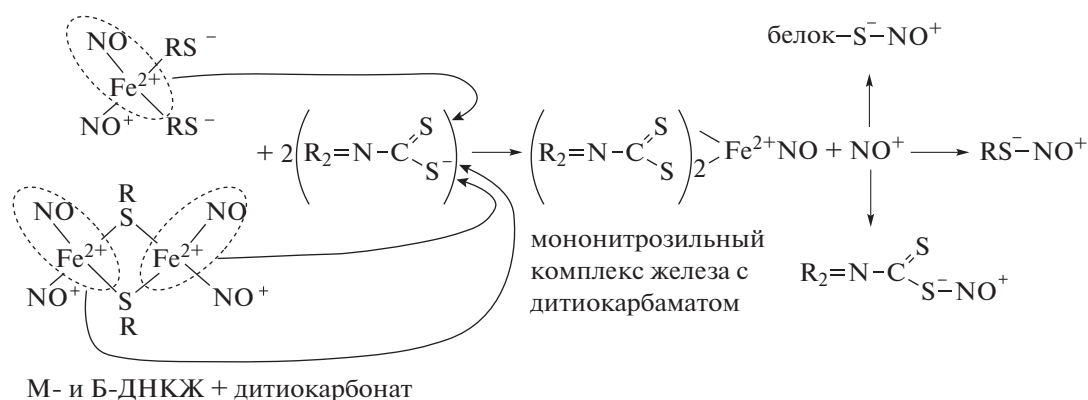


Схема 4. Механизм разрушительного действия дитиокарбамата на М- и Б-ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами [22].

В результате молекулы NO включаются в устойчивые МНКЖ с МГД и тем самым “выходят из игры” — они уже не влияют на клетки и ткани, тогда как катионы нитрозония, будучи свободными, становятся единственными в своем действии на эти биосистемы.

Характерно, что проапоптотическое действие М-ДНКЖ-ТС усиливалось при добавлении к нему МГД [21]. Сами по себе М-ДНКЖ-ТС и МГД инициировали апоптоз, особенно М-ДНКЖ-ТС, так что если бы при совместном введении они не влияли друг на друга, то, судя по данным, приведенным в [21], они могли инициировать переход в апоптотическое состояние 45% клеток. В реальном эксперименте при их совместном введении в клеточную культуру в состояние апоптоза переходило более 60% клеток [21].

Усиление действия М-ДНКЖ-ТС было, по-видимому, обусловлено распадом всех комплексов с выделением из них максимального количества катионов нитрозония, вызывавших апоптоз. Интересно, что добавление глутатиона к М-ДНКЖ-ТС ослабляло его проапоптотическое действие [21]. По-видимому, это было связано с превращением М-ДНКЖ-ТС в более стабильные комплексы Б-ДНКЖ с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH), кото-

рые сами по себе высвобождали существенно меньшее количество катионов нитрозония, чем М-ДНКЖ-ТС.

Способность другого производного дитиокарбамата — диэтилдитиокарбамата (ДЭТК) — разрушать М-ДНКЖ-ТС в соответствии со схемой 4, использовалась нами при изучении гипотензивного действия этих комплексов как доноров NO на животных (рис. 2) [23]. ДЭТК значительно подавлял это действие при его внутривенном (в/в) введении животным до М-ДНКЖ-ТС (рис. 2, кривая 3). Если же ДЭТК вводили после М-ДНКЖ-ТС, то у животных наблюдалось кратковременное резкое снижение артериального давления (АД), обусловленное, по-видимому, восстановлением до NO катионов нитрозония в составе $RS-NO$, образующихся (в соответствии со схемой 4) при распаде ДНКЖ с последующим выходом NO в окружающую среду (рис. 2, кривые 4 и 5). Слабое влияние ДЭТК на уже пониженное АД у этих животных (кривые 4 и 5) могло быть обусловлено отсутствием контакта между ДЭТК и ДНКЖ, локализованных внутри клеток [23].

Также МГД был способен резко усиливать гибель культуры клеток MCF-7, вызванную инкубацией с Б-ДНКЖ с меркаптосукцинатом (Б-ДНКЖ-МС)

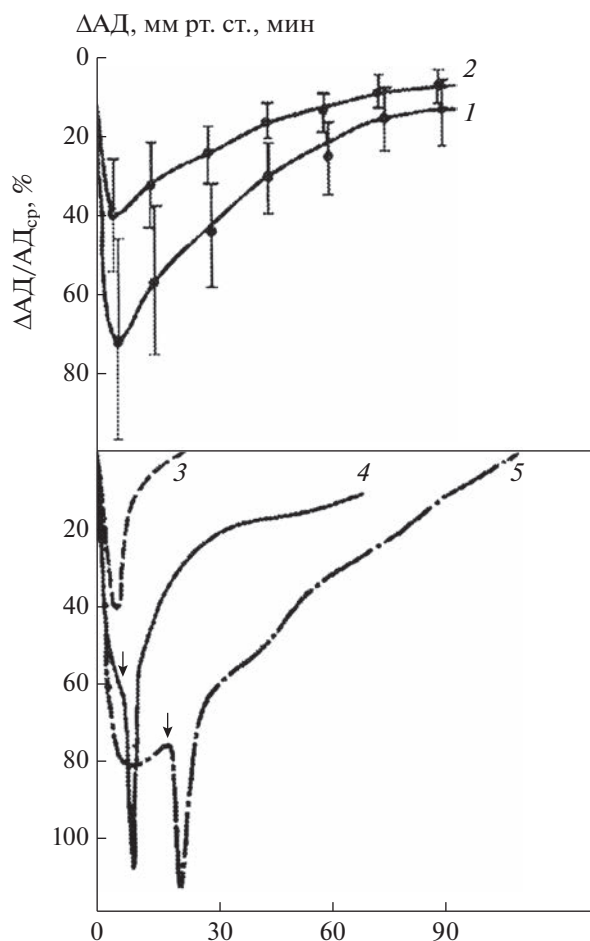


Рис. 2. Изменение артериального давления (АД и ААД) у бодрствующих крыс после в/в введения им М-ДНКЖ-ТС в дозе 10 мкмоль/кг веса (кривые 1 и 2); М-ДНКЖ-ТС введен через 1 мин после в/в введения диэтилдитиокарбамата (ДЭТК) в дозе 30 мг/кг (кривая 3); ДЭТК вводили животным после М-ДНКЖ-ТС в моменты, указанные стрелками (кривые 4 и 5) [23].

[22]. Снижение выживаемости этих клеток (их гибель) оценивалось по двумерной диаграмме, полученной методом проточной цитофлуориметрии. Эта диаграмма характеризует степень апоптоза (по флуоресценции аннексина V-FITC) и степень некроза (по флуоресценции пропидия йодида).

Как следует из рис. 3, при одновременном введении в культуру клеток Б-ДНКЖ-МС и МГД содержание погибших клеток достигало 80% (столбик 4), тогда как при сложении действия каждого из них без какого-либо влияния друг на друга (столбики 2 и 3) гибель клеток не превышала бы 50% (столбик 5). Очевидно, что синергический эффект Б-ДНКЖ-МС и МГД при их одновременном введении в культуру клеток был обусловлен повышением (в соответствии со схемой 4) уровня катионов нитрозония, высвобождавшихся под действием МГД из Б-ДНКЖ-МС.

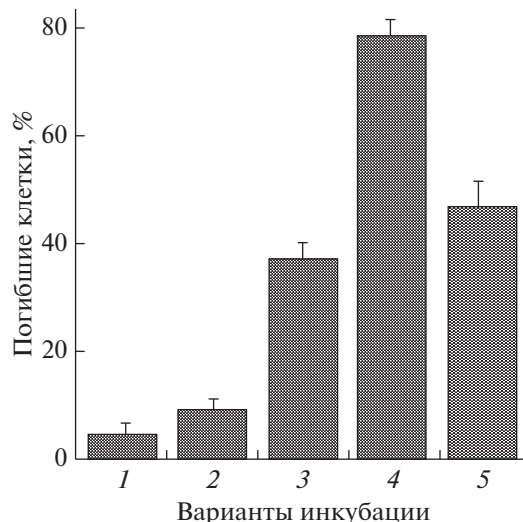


Рис. 3. Гибель опухолевых клеток человека MCF-7 (%): столбик 1 – контроль, 2 – инкубация с 0.5 мМ Б-ДНКЖ-МС, 3 – инкубация с 1.0 мМ МГД, 4 – инкубация со смесью этих соединений, 5 – сумма эффектов М-ДНКЖ-МС и МГД (столбики 2 + 3) при отсутствии взаимодействия между ними [22].

Аналогичный результат получен нами при изучении сочетанного влияния ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH на выживание бактерий *Escherichia coli* TN350 (интактность клеток оценивали по колониеобразующей активности) (рис. 4). Как и в уже рассмотренных примерах, при одновременном введении ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH уровень интактных клеток снижался до 5%, а при введении ДЭТК через 40 мин после Б-ДНКЖ-GSH погибали все клетки. В этом случае ДНКЖ переходили внутрь клеток, так что при дальнейшем контакте этих комплексов с ДЭТК все катионы нитрозония, высвобождавшиеся из ДНКЖ, оказывались внутри клеток, оказывая на них цитотоксическое действие.

Как показывают наши последние исследования, распад ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, приводящий к высвобождению из них катионов нитрозония, можно обеспечить обработкой комплексов супероксид анион-радикалами или хелаторами двухвалентного железа. В соответствии с данными [25], анионы супероксида могут реагировать в ДНКЖ с молекулами NO, входящими в состав этих комплексов в качестве нитрозильных лигандов в ЖДНФ. Как упоминалось выше, одна половина этих лигандов может быть представлена в резонансных структурах ДНКЖ в форме нейтральных молекул NO, а другая – в форме катионов нитрозония. Согласно [26], взаимодействие анионов супероксида с молекулами NO приводит к появлению в лигандной сфере железа в ДНКЖ пероксинитрита с последующей его изомеризацией в составе ДНКЖ в

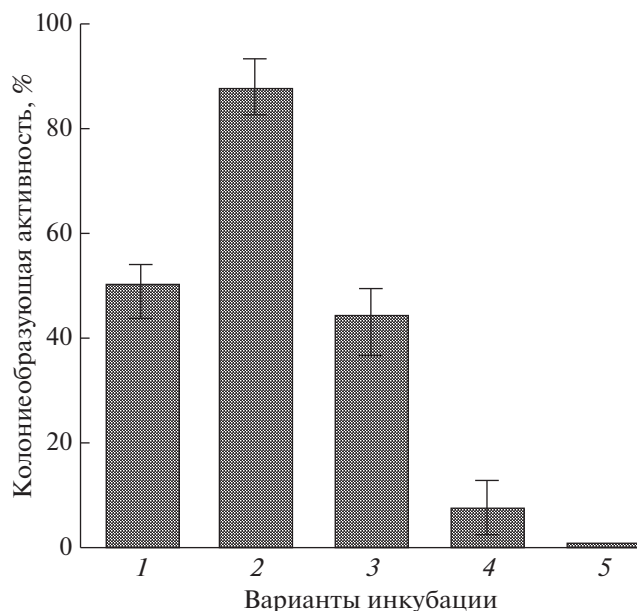


Рис. 4. Влияние ДЭТК и Б-ДНКЖ-GSH на колониобразующую активность бактерий *E. coli* TN350. В среду инкубации клеток добавляли: 1 – 2.5 мМ ДЭТК; 2 – 0.5 мМ Б-ДНКЖ-GSH; 3 – суммарное действие ДЭТК + Б-ДНКЖ-GSH (1 + 2) при отсутствии взаимодействия между ними; 4 – одновременное воздействие ДЭТК + Б-ДНКЖ-GSH; 5 – Б-ДНКЖ-GSH добавляли через 40 мин после ДЭТК [24].

нитрат, что и приводит к распаду этих комплексов с высвобождением из них катионов нитрозония. Что касается разрушительного действия хелаторов железа, то высвобождение катионов нитрозония из ДНКЖ в ходе их разрушения (а оно действительно имеет место [26]) очевидно определяется заменой всех лигандов в окружении двухвалентного железа в ДНКЖ этими хелаторами. Не исключено, что именно этот механизм лежал в основе обнаруженного [27] цитотоксического действия Б-ДНКЖ-GSH на клетки HeLa, вызванного добавлением к этим клеткам хелаторов железа – батофенантролиндисульфоната или этилендиаминтетраацетата (EDTA).

Оказалось, что высвобождение из Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония, как цитотоксических агентов, резко усиливающееся под действием ДЭТК, можно использовать для подавления размножения коронавируса SARS-CoV-2 в организме модельных животных (сирийских хомячков). Таким образом, открывается возможность создания на основе ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами и производными дитиокарбамата (не исключено, что и на основе только ДНКЖ), лекарств, эффективных при COVID-19!

Опыты на сирийских хомячках, зараженных коронавирусом SARS-CoV-2, проводили сотрудники Государственного научного центра вирусологии

и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора РФ (Кольцово, Новосибирская область). Животным, помещенным в закрытую камеру, подавали воздух и распыленные растворы сначала Б-ДНКЖ-GSH в течение 30 мин, а затем (через 30 мин) раствор ДЭТК также на 30 мин. В распылитель растворов вводили 10 мл 10 мМ растворов Б-ДНКЖ-GSH или ДЭТК. Эти соединения вводили указанным способом сирийским хомячкам, зараженным коронавирусом, в течение 4 суток дважды в сутки. После этого животных забивали с последующим забором тканей носовой полости и легких, гомогенизировали и определяли в них количество РНК вируса методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени через показатель *Ct* (число циклов) и методом титрования на культуре клеток Vero 6 ($\lg\text{TCID}_{50}/\text{мл}$) [28].

В табл. 1 приведены полученные методом ОТ-ПЦР результаты определения вирусной нагрузки у сирийских хомячков. Показано, что аэрозольное введение животным только Б-ДНКЖ-GSH, статистически значимо снижало вирусную нагрузку только в тканях носовой полости – в 16 раз по сравнению с контрольными животными (плацебо). При этом не обнаружено значимого снижения вирусной нагрузки по инфекционному титру ($\lg\text{TCID}_{50}/\text{мл}$) ни в ткани носовой полости, ни в тканях легкого.

Лечебный эффект использованных препаратов повышался при последовательном введении животным сначала Б-ДНКЖ-GSH, а затем ДЭТК. Хотя по данным ОТ-ПЦР (*Ct*) накопление РНК в тканях носовой полости снижалось, как и при использовании только Б-ДНКЖ-GSH, в те же 16 раз, однако лечебный эффект начинал проявляться и в тканях легкого: уровень РНК вируса снижался в них по сравнению с плацебо в 20 раз. Еще более выраженный результат получен при оценке эффективности лечения методом титрования вируса – титр вируса снижался, по крайней мере в тканях носовой полости, в 200 раз по сравнению с плацебо, тогда как в тканях легкого снижение было практически таким же, как при определении вирусной нагрузки методом ОТ-ПЦР (снижение в 20 раз).

Результаты, полученные после аэрозольного введения зараженным хомячкам только ДЭТК или ДЭТК с последующим введением Б-ДНКЖ-GSH, показали полное отсутствие лечебного эффекта этих препаратов при таком способе их введения.

Интересно, что не удалось обнаружить образования (хотя бы в легких) МНКЖ-ДЭТК, вызванного аэрозольным введением хомячкам сначала Б-ДНКЖ-GSH, а затем ДЭТК, методом ЭПР по характерному для этих комплексов триплетному сигналу ЭПР с центром при $g = 2.04$ [28]. В соответствии со схемой 4 эти комплексы должны возникать при взаимодействии Б-ДНКЖ-GSH с

Таблица 1. Вирусная нагрузка в тканях носовой полости и легкого сирийских хомячков, интраназально инфицированных вирусом SARS-CoV-2, с последующим аэрозольным лечением препаратами Б-ДНКЖ-GSH и Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК

Соединение	Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 в тканях			
	носовая полость		легкое	
	lgTCID ₅₀ /мл	Ct	lgTCID ₅₀ /мл	Ct
Б-ДНКЖ-GSH	4.1 ± 0.5	23.83 ± 1.27	4.4 ± 0.8	20.67 ± 2.13
Б-ДНКЖ-GSH + ДЭТК	2.7 ± 0.4	27.28 ± 3.44	2.4 ± 0.4	30.33 ± 1.18
Плацебо	5.0 ± 0.5	19.80 ± 2.19	3.7 ± 0.4	25.96 ± 1.60

* Более низкие пороговые значения числа циклов (Ct) указывают на более высокую вирусную нагрузку.

ДЭТК, что должно было приводить и к высвобождению из Б-ДНКЖ катионов нитрозония. Последние, как цитотоксические агенты, должны были, по нашему мнению, оказывать лечебное действие на зараженных хомячков — подавлять размножение в их организме коронавируса SARS-CoV-2.

Неудача с регистрацией в тканях легких МНКЖ-ДЭТК, вероятнее всего, была обусловлена разрушительным действием супероксида на эти комплексы. Такое действие продемонстрировано в работе [29], в которой этот эффект объясняется связыванием аниона супероксида в МНКЖ-ДЭТК с молекулой NO. Об этой реакции я уже говорил выше при обсуждении распада ДНКЖ под действием анионов супероксида. Отмечу, что в легких, находящихся в непосредственном контакте с воздухом — с кислородом воздуха — уровень анионов супероксида должен быть достаточно высоким, по крайней мере достаточным, для разрушения МНКЖ-ДЭТК.

Главное свойство катионов нитрозония, определяющее их функциональную роль у живых организмов — способность этих катионов S-нитрозировать тиолы как низкомолекулярной, так и белковой природы. Поэтому есть основание предполагать, что именно инициируемая катионами реакция S-нитрозирования разнообразных вирусных белков — протеаз, белков оболочки, обратных транскриптаз, факторов транскрипции, а также протеаз хозяина, обеспечивала снижение продукции вируса в организме хозяина, будучи эффективным средством защиты организма животных и человека от вирусной инфекции, в том числе, вызываемой коронавирусом SARS-CoV-2.

Встает вопрос, можно ли получить ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, способные сами без разрушительного воздействия на них других соединений, например, производных дитиокарбамата, высвободить значительное количество катионов нитрозония, обеспечивая тем самым противовирусный эффект и излечивая, например, COVID-19?

Подобная возможность существует! Но она, по-видимому, может реализоваться для растворов ДНКЖ, характеризующихся низким содержанием свободных (не включенных в ДНКЖ) тиолов. Об этом свидетельствуют результаты следующих, проведенных нами опытов (Ванин А.Ф. — материал готовится к печати). Используя разработанный нами метод синтеза ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, механизм которого приведен на схеме 2, мы синтезировали препараты Б-ДНКЖ-GSH, характеризующиеся соотношениями свободного глутатиона : Б-ДНКЖ-GSH, равными 2 : 1 и 0 : 1. Эти препараты мы использовали для проверки обнаруженной ранее способности Б-ДНКЖ-GSH высвобождать катионы нитрозония на воздухе в сильно кислой среде (при pH 1–2) и температуре 80°C [30].

Оказалось, что оба эти препарата способны равно эффективно высвобождать в этих условиях катионы нитрозония, последнее обнаружено по характерным для продуктов связывания этих катионов с GSH — молекулам GS-NO, имеющим максимумы оптического поглощения при 334 и 540 нм (рис. 1). Однако появление NO⁺ при распаде Б-ДНКЖ-GSH в аэробных условиях могло быть обусловлено не только высвобождением NO⁺ из этих комплексов, но и окислением высвобождающегося при этом NO до диоксида азота (NO₂) с последующим образованием триоксида диазота (N₂O₃), способного S-нитрозировать тиолы. Для проверки такой возможности такие же опыты с растворами Б-ДНКЖ-GSH проведены и в отсутствие воздуха — в анаэробных условиях. В этих условиях обнаружено, что только растворы Б-ДНКЖ-GSH, в которых все молекулы глутатиона включены в эти комплексы, т.е. при молярном соотношении свободного глутатиона и Б-ДНКЖ-GSH, равном 0 : 1, катионы нитрозония действительно высвобождаются из Б-ДНКЖ, причем в концентрации, большей концентрации комплексов (рис. 5, панель а, кривая 2). Это превышение могло быть обусловлено тем, что не все молекулы GS-NO включались в Б-ДНКЖ-GSH

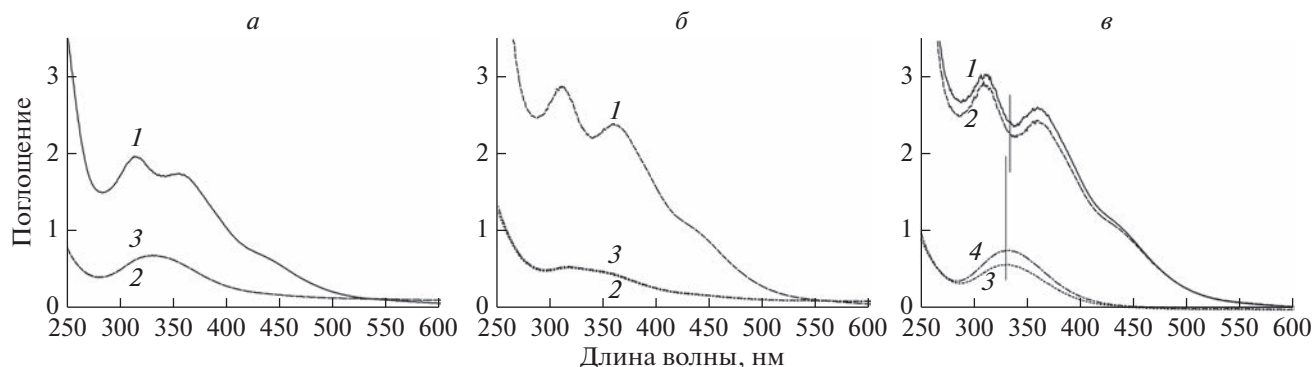


Рис. 5. Эволюция спектров поглощения Б-ДНКЖ-GSH, синтезированных при соотношении $MS : Fe^{2+} : \text{нитрит}$, равном 20 : 20 : 20 мМ (панель *а*) или 40 : 20 : 20 мМ (панели *б* и *в*), с последующей инкубацией растворов этих комплексов после их подкисления до pH 1.0 при 80°C в анаэробных (панели *а* и *б*) или в аэробных условиях (панель *в*). 1 – Исходные растворы Б-ДНКЖ-GSH; 2 и 3 – через 5 мин после прогрева растворов при pH 1.0 с последующим добавлением избытка глутатиона (панели *а* и *б*). Панель *в*: кривые 2–4, соответственно, через 1 мин после подкисления раствора, последующего прогрева в течение 1 мин при 80°C и добавления избытка глутатиона. Спектры зарегистрированы для растворов Б-ДНКЖ-GSH, разбавленных в 20 раз. На панели *в* вертикальные полосы проведены на 330 и 334 нм.

при образовании этих комплексов. Они и могли давать вклад в GS-NO, высвобождающийся из Б-ДНКЖ. Это предположение согласуется с тем, что уровень Б-ДНКЖ-GSH в этом случае был ниже, чем в растворах с двукратным превышением свободного глутатиона на Б-ДНКЖ (рис. 5, панели *б* и *в*, кривые 1).

В растворах с двукратным избытком свободного глутатиона по сравнению с содержанием комплексов, комплексы распадались без заметного образования GS-NO (рис. 5, панель *б*). Этот же раствор при прогреве в кислотной среде, но в аэробных условиях, обнаруживал появление оптического поглощения GS-NO, причем в концентрации, равной концентрации Б-ДНКЖ. Она возрастала при последующем добавлении к раствору избытка глутатиона (рис. 5, панель *в*, кривые 2 и 3).

Эти результаты позволяют сделать следующие выводы и предположения. Во-первых, катионы нитрозония действительно представлены в Б-ДНКЖ-GSH и могут высвобождаться из этих комплексов, но при низком уровне (а лучше в отсутствие) свободного тиола (GSH) в растворе. Во-вторых, при повышенном содержании свободного тиола в растворе этих комплексов может происходить восстановление высвобождающихся катионов нитрозония до молекул NO, очевидно, свободными тиолами. Поскольку тиолы сами по себе из-за нарушения закона сохранения спина в химических реакциях не могут осуществлять такое восстановление, этот процесс может реализовываться при включении в него ионов железа как спиновых катализаторов [31]. Предположение о высвобождении всех нитрозильных лигандов из Б-ДНКЖ-GSH в форме NO при соотношении свободный глутатион : Б-ДНКЖ-GSH = 2 : 1 под-

тверждается результатами наших измерений NO, высвобождающегося в газовой фазе из растворов этих комплексов [11].

Ранее мы наблюдали высвобождение NO^+ из раствора Б-ДНКЖ-GSH, но неполное, при соотношении свободный GSH : Б-ДНКЖ = 1 : 1 [11]. Вместе с тем, в той же работе показано, что при повышении этого соотношения до 2 : 1 выход NO^+ падал до 0.

В опытах с прогревом растворов с соотношением GSH : Б-ДНКЖ = 2 : 1 в аэробных условиях отмечено появление GS-NO в концентрации, равной концентрации комплексов (рис. 5, панель *в*, кривая 3), что могло быть обусловлено полным окислением кислородом воздуха свободного GSH в растворе. В результате соотношение GS-NO и Б-ДНКЖ-GSH становилось равным 0 : 1, при котором высвобождающиеся катионы нитрозония не восстанавливались до NO и могли включаться в GS-NO. Повышение уровня последних при последующем добавлении в раствор избытка GSH свидетельствует о появлении дополнительного количества NO^+ , очевидно, в составе триоксида диазота, образующегося в реакции NO и NO_2 – продукта окисления NO кислородом воздуха (рис. 5, панель *в*, кривая 4). Характерно, что при добавлении в анаэробных условиях избытка глутатиона к растворам с соотношением GSH : Б-ДНКЖ-GSH = 0 : 1, увеличения GS-NO не наблюдалось (рис. 5, панель *а*, кривая 3).

Впервые данные о цитотоксическом действии катионов нитрозония, полученные в опытах на бактериях *Clostridium sporogenes* и на культуре фибробластов Swiss 3T3, были представлены в [32, 33]. В частности, на культуре фибробластов показано, что в дозовом отношении катионы

нитрозония в 40 раз более цитотоксичны, чем молекулы NO. Доноры NO⁺ — ионы нитропруссиды [(CN)⁻₅Fe²⁺NO⁺]²⁻ — вызывали апоптоз у 50% фибробластов уже после инкубации этих клеток в течение 2 ч с 20 мкМ нитропруссидом, тогда как аналогичное действие на фибробласты молекулы NO оказывали при концентрации 800 мкМ через 24 ч инкубации клеток с газообразным NO или с его донорами — GS-NO или S-нитрозо-N-ацетилпенициламин (SNAP) [33]. В исследованиях на бактериях *C. sporogenes* в качестве предполагаемых доноров катионов нитрозония использовали красную и черную соли Руссена. Однако четкого доказательства того, что цитотоксическое действие этих комплексов обусловлено высвобождением из них катионов NO⁺, а не молекул NO, не было приведено [32]. Такое доказательство цитотоксического действия М-ДНКЖ-ТС на клетки Jurkat получено в упомянутой работе [21], в которой показан синергизм суммарного действия этих комплексов и МГД. Наши исследования подтвердили целесообразность использования подобного подхода для доказательства того, что в случае ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами не молекулы NO, а катионы нитрозония ответственны за цитотоксическое действие этих комплексов.

Это заключение позволяет мне утверждать, что полученные ранее нашей группой данные о проапоптотическом действии ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами на клетки HeLa [27], а также о подавлении этими комплексами пролиферации эндометриом в организме крыс с экспериментальным эндометриозом [34, 35], следует рассматривать как пример цитотоксического действия на биосистемы катионов нитрозония. Такое же утверждение можно высказать о наших данных, касающихся подавления под действием ДНКЖ с цистеином фиброза кавернозной ткани пениса крыс, подвергнутой денервации [36], и аналогичного действия Б-ДНКЖ с меркаптоэтанолом на фиброзное перерождение почек, вызванное лигатурой мочеточников [37].

Не исключено, что, используя ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в качестве доноров катионов нитрозония, оказывающих цитотоксическое действие на клетки и ткани, мы имитируем процесс, который естественным путем происходит в организме животных и человека при реализации клеточного иммунитета. Единственное отличие состоит в том, что природа использует для этого эндогенные ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами как “рабочую форму” оксида азота, а мы — те же комплексы, но экзогенные, т.е. синтезированные в пробирке химическим путем. Если это так, то весьма вероятно, что, используя экзогенные ДНКЖ, можно будет существенно продвинуться в решении проблемы лечения рака,

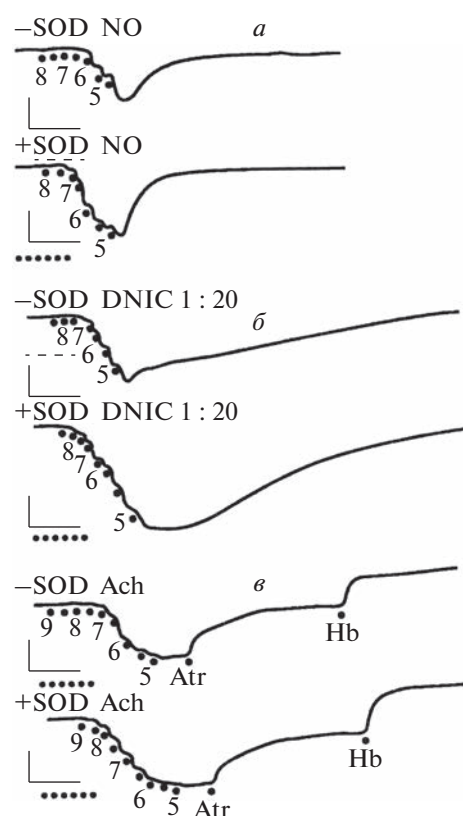


Рис. 6. Вазодилаторное действие NO (а), М-ДНКЖ с цистеином (б) и ацетилхолина (Асh) (в) в отсутствие и в присутствии супероксид-дисмутазы (-SOD и +SOD) на предварительно сокращенные норэпинефрином (10^{-7} М) изолированные кольцевые сегменты аорты крысы (без удаления эндотелия). Точками указаны моменты введения вазодилаторов (в IgM), атропина (Atr, 10^{-3} М) или гемоглобина (Hb, 10^{-3} М). Вертикальная черта — 1 г, горизонтальная — 5 мин [40].

при условии, конечно, что иммунная система животных и человека устраняет злокачественные клетки и ткани, используя эндогенные ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами. Наша группа уже в течение нескольких лет изучает влияние Б-ДНКЖ с глутатионом и другими тиол-содержащими лигандами на пролиферацию перевитых опухолей в организме мышей. Обещающим результатом в этом направлении является задержка пролиферации опухолей [38, 39].

Как соединения, выступающие в качестве “рабочей формы” эндогенного оксида азота ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в их экзогенной версии, полностью имитируют позитивное регуляторное действие эндогенного оксида азота в организме человека и животных (последнее лучше назвать системой эндогенного оксида азота). Экзогенные ДНКЖ характеризуются более высокой дозовой эффективностью, например, их сосудорасширяющего и ранозаживляющего действия по сравнению с тем же действием газооб-

Таблица 2. Регуляторное действие ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами на живые организмы

Регуляторное действие	Ссылка
Блокирование агрегации тромбоцитов (тромбоза)	[45]
Повышение эластичности эритроцитов	[46]
Повышение выживаемости животных при значительных кровопотерях	[47]
Мощная пенил-эректильная активность	[36, 48]
Антиапоптотическое действие на клеточные культуры	[49, 50]
Активация/подавление активности ряда генов	[51–53]
Усиление когнитивной активности	[54]
Защита миелиновой оболочки нейронов при воспалительных процессах в мозгу	[55]
Активация синтеза стрессорных белков	[56]
Антиоксидантное действие	[26]
Разрушительное действие на электрон-транспортные железосерные белки	[57]
Стимуляция усвоения железа при заболевании пшеницы ржавчиной	[58]
Регуляция входа и выхода железа из клеток	[59]
Уменьшение некротической зоны при экспериментальном инфаркте миокарда	[60]

разного NO. Первое иллюстрирует рис. 6, на котором приведена дозовая зависимость дилатации изолированных кольцевых сегментов аорты крыс, вызванной газообразным NO, М-ДНКЖ с цистеином или ацетилхолином (Ach) [40].

Как следует из рис. 6, М-ДНКЖ с цистеином в дозовом отношении был столь же эффективным, как эндогенный вазодилатор — ацетилхолин. Добавление гемоглобина, как перехватчика NO, снимало вазодилаторную активность ДНКЖ и ацетилхолина. В присутствии супероксид-дисмутазы (SOD), снижающей уровень супероксида и тем самым предотвращающей гибель NO под действием этого радикала, вазодилаторный эффект ДНКЖ и ацетилхолина усиливался. Аналогичный эффект SOD оказывал на вазодилаторное действие газообразного NO. При этом оно приближалось к аналогичному действию ДНКЖ в отсутствие SOD. Это означает, что включение NO в ДНКЖ обеспечивало его стабилизацию (защищало от действия супероксида), также как SOD обеспечивал аналогичную защиту свободных молекул NO. Атропин стабилизировал действие ацетилхолина.

Детальное сопоставление дозовой зависимости сосудорасширяющего действия NO и ДНКЖ в отсутствие SOD показало, что включение 10^{-8} – 10^{-7} М NO в ДНКЖ с цистеином в 100–300 раз повышало в дозовом отношении вазодилаторный эффект NO, что, очевидно, указывает на защиту последнего от супероксида [40]. В соответствии с приведенными в ранее цитированной работе данными [26], этот защитный эффект, по-видимому, обусловлен связыванием супероксида с молекулой NO в ЖДНФ ДНКЖ с последующей изомеризацией образующегося в составе этого ком-

плекса пероксинитрита в нитрат. Таким образом, ДНКЖ может выступать в качестве перехватчика супероксида, т.е. действовать как антиоксидант.

Сопоставление ранозаживляющего действия NO и Б-ДНКЖ-GSH показывает, что одинаковая эффективность этих агентов достигалась при концентрации Б-ДНКЖ в 25 раз меньшей, чем NO [41].

Высокая вазодилаторная активность ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами лежит в основе их эффективного гипотензивного действия на животных и человека [42, 43]. В связи с этим интересно было сопоставить гипотензивную активность газообразного NO и ДНКЖ. Естественно, что газообразный NO можно было вводить в организм животных и человека, в конечном итоге в кровь, только по дыхательному пути через легкие. При этом не обнаруживается никакого заметного изменения артериального давления (АД), хотя NO в кровь поступает [44]. Об этом свидетельствует регистрация в крови методом ЭПР нитрозильных комплексов гемоглобина [44]. Почему при этом не обнаруживается гипотензивного действия NO (а этот газ, как и кислород, должен доставляться к стенкам сосудов гемоглобином)? Этот вопрос остается пока без ответа. Что касается гипотензивного действия ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, то внутривенное введение в кровь их растворов приводит к выраженному снижению АД: у человека 20%-ное снижение АД достигается при дозе Б-ДНКЖ-GSH 0.2 мкмоль/кг веса, у крыс — 1 мкмоль/кг [43].

В дополнение к приведенным данным о регуляторном действии ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, в табл. 2 суммированы другие, полу-

ченные к настоящему времени, примеры эффекта этих комплексов как доноров NO.

Если же учесть, что система эндогенного оксида азота, а, следовательно, и ее “рабочая форма” — ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, функционируют практически во всех жизненных процессах, то я уверен, что приведенный в табл. 2 список будет существенно расширен.

Выражаю благодарность моему сотруднику Николаю Ткачеву за компьютерное оформление приведенных в статье рисунков.

Работа получила финансовую поддержку Российского научного фонда (грант № 23-74-00009).

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

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ignarro L.J. (2000) *Nitric Oxide Biology and Pharmacology*. Zurich: Acad. Press.
- Domingos P., Prado A.M., Wong A., Gehring C., Feijo J. (2015) Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Mol. Plant*. **8**, 506–520.
- Stern A., Zhu J. (2014) An introduction to nitric oxide sensing and response in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **87**, 187–220.
- Gaston B.M., Carver J., Doctor A., Palmer L.A. (2003) Physiological roles of S-nitrosylation. *Mol. Interventions*. **3**, 253–263.
- Seth D., Hess D.T., Hausladen A., Wang L.W., Wang A.J., Stamler J.S. (2018) A multiplex enzymatic machinery for cellular protein S-nitrosylation. *Mol. Cell*. **89**, 451–464.
- Ванин А.Ф. (2015) *Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами (Физико-химия, биология, медицина)*. Ижевск—Москва: Институт компьютерных исследований.
- Lu T.T., Wang Y.M., Hung C.H., Chiou S.J., Liaw W.F. (2018) Bioinorganic chemistry of the natural [Fe(NO)₂] motif evolution of a functional model for NO-related biomedical application and revolutionary development of a translation model. *Inorg. Chem.* **57**, 12425–12443.
- Vanin A.F. (2019) *Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms*. Cambridge: Cambridge Scholar Publ., UK.
- Lehnert N., Kim E., Dong H.T., Harland J.B., Hunt A.H., Manikas E.C., Oakley K.M., Pham J., Reed G.C., Alfaro V.S. (2021) The biologically relevant coordination chemistry of iron and nitric oxide: electronic structure and reactivity. *Chem. Rev.* **121**, 14682–14905.
- Vanin A.F., Burbaev D.S. (2011) Electronic and spatial structures of water-soluble dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands underlying their activity to act as nitric oxide and nitrosonium ion donors. *Biophys. J.* **2011**, 878236.
- Vanin A.F. (2020) How is nitric oxide (NO) converted into nitrosonium cations (NO⁺) in living organisms? (Based on the results of optical and EPR analysis of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands). *Appl. Magn. Res.* **51**, 851–876.
- Ванин А.Ф. (2020) Свободно-радикальная природа молекул монооксида азота как фактор, определяющий их превращение в живых организмах в ионы нитрозония. *Биофизика*. **65**, 421–438.
- Vanin A.F., Malenkova I.V., Serezhnikov V.A. (1997) Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **1**, 191–203.
- Vanin A.F. (2023) Research into dinitrosyl iron complexes in living organisms through EPR as an example of applying this method in biology: a review. *Appl. Magn. Res.* **54**, 289–308.
- Ванин А.Ф., Налбандян Р.М. (1965) Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках. *Биофизика*. **10**, 167–168.
- Vithaythil A.J., Ternberg J.L., Commoner B. (1965) Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis. *Nature*. **207**, 1246–1249.
- Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Burbaev D.S. (2011) Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **23**, 136–149.
- Williams D.L.H. (2004) *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*. Amsterdam: Elsevier.
- Ascenzi P., diMesi A., Sciore A.C., Clementi E. (2010) Peroxynitrite — as ugly biofactor? *Biofactors*. **36**, 264–273.
- Radi R. (2018) Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**, 5839–5848.
- Kleschyov A.L., Strand S., Schmitt S., Gottfried D., Skatchov M., Sjakste N., Deiber M., Umansky V., Münzel T. (2006) Dinitrosyl-iron triggers apoptosis in Jurkat cells despite overexpression of Bcl-2. *Free Rad. Biol. Med.* **40**, 1340–1348.
- Vanin A.F., Tronov V.A., Borodulin R.R. (2021) Nitrosonium cation as a cytotoxic component of dinitrosyl iron complexes with thio-containing ligands (based on the experimental work on MCF-7 human breast cancer cell culture) *Cell. Biochem. Biophys.* **79**, 93–102.
- Галаган М.Е., Орановская Е.В., Мордвинцев П.И., Медведев О.С., Ванин А.Ф. (1988) Гипотензивный эффект динитрозильных комплексов железа на бодрствующих животных. *Бюлл. Всесоюзного кардиол. центра*. **2**, 75–79.
- Ванин А.Ф., Телегина Д.И., Микоян В.Д., Ткачев Н.А., Васильева С.В. (2022) Цитостатическое действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом на клетки *Escherichia coli* определяется катионами нитрозония, высвобождающимися из этих комплексов. *Биофизика*. **67**, 938–946.
- Ванин А.Ф., Микоян В.Д., Ткачев Н.А. (2022) Высвобождение катионов нитрозония из динитрозильных комплексов железа при их распаде под действием анионов супероксида или этилендиаминтетраацетата. *Биофизика*. **67**, 1045–1053

26. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. (2008) Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin and methemoglobin-bound dinitrosyl iron complexes. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **18**, 37–46.
27. Giliano N.V., Konevega L.V., Noskin L.A., Serezhenkov V.A., Poltorakov A.P., Vanin A.F. (2011) Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: studies with HeLa cell culture. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **24**, 151–159.
28. Шиповалов А.В., Ванин А.Ф., Пьянков О.В., Багрянская Е.Г., Микоян В.Д., Попкова В.Я. (2022) Противовирусная активность катионов нитрозония в отношении SARS-CoV-2 на модели сирийского хомячка. *Биофизика*. **67**, 969–981.
29. Vanin A.F., Huisman A., Stroes E.S.G., de Ruiter-Huijstek F.C., Rabelink T.J., van Faassen E.E. (2001) Antioxidant capacity of mononitrosyl-iron-dithiocarbamate complexes: implications for NO trapping. *Free Rad. Biol. Med.* **30**, 813–824.
30. Vanin A.F. (2018) Nitrosonium ions as constituents of dinitrosyl iron complexes with glutathione responsible for their S-nitrosating activity. *Austin J. Analyt. Pharm. Chem.* **5**, 1109–1125.
31. Buchachenko A.L., Berdinsky V.L. (1996) Spin catalysis in chemical reactions. *J. Phys. Chem.* **100**, 18292–18299.
32. Gui X., Joannou C.L., Huges M.N., Cammack R. (1992) The bactericidal effects on transition metal complexes containing NO⁺ group on the food-spoilage bacterium *Clostridium sporogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **98**, 67–70.
33. Khan S., Kayahara M., Joashi U., Mazarakis N.D., Sarraf C., Edwards A.D., Huges M.N., Mehmet H. (1997) Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 by nitric oxide and the nitrosonium cation. *J. Cell Sci.* **110**, 2315–2322.
34. Vanin A.F., Burgova E.N., Adamyan L.V. (2015) Dinitrosyl iron complexes with glutathione suppress surgically induced experimental apoptosis in rats. *Austin J. Reprod. Med. Infertil.* **2**, 1109–1032.
35. Burgova E.N., Khristidi Y.L., Kurkov F.V., Mikoyan V.D., Shekhter A.B., Vanin A.F. (2019) The inhibiting effect of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands on the growth of endometrioid tumours in rats with experimental endometriosis. *Cell. Biochem. Biophys.* **77**, 69–77.
36. Велиев Е.И., Котов С.В., Шишло В.К., Сerezhenkov V.A., Лозинский В.И., Ванин А.Ф. (2008) Влияние динитрозильных комплексов железа с тиол-содержащими лигандами на состояние кавернозных тел пениса у крыс. *Биофизика*. **53**, 326–353.
37. Lee T.Y., Lu H.H., Chang H.T., Huang H.C., Tsai Y.J., Chang I.H., Tu C.P., Chung C.U., Lu T.T., Peng C.H., Chen Y. (2023) Delivery of nitric oxide with a pH-responsive nanocarrier for the treatment of renal fibrosis. *J. Control. Release.* **354**, 417–428.
38. Ванин А.Ф., Островская Л.А., Корман Д.Б., Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Бородулин Р.Р., Фомина М.М., Блюхтерова Н.И., Рыкова В.А. (2015) Антинитрозативная система как фактор резистентности злокачественных опухолей к цитотоксическому действию монооксида азота. *Биофизика*. **60**, 152–157.
39. Ванин А.Ф., Островская Л.А., Корман Д.Б., Блюхтерова Н.В., Рыкова В.А., Фомина М.М. (2022) Роль катиона нитрозония в механизме противоупхолевого эффекта препаратов динитрозильных комплексов железа. *Биофизика*. **67**, 982–990.
40. Vedernikov Y.P., Mordvintcev P.I., Malenkova I.V., Vanin A.F. (1992) Similarity between the vasorelaxing activity of dinitrosyl iron cysteine complexes and endothelium-derived relaxing factor. *Eur. J. Pharmacol.* **211**, 313–317.
41. Igrunkova A., Fayzullin A., Serejenkova N., Lipina T., Pekshev A., Vanin A., Zaborova V., Budanova E., Shestakov D., Kastyro I., Shekhter A. (2023) Beneficial effect of dinitrosyl iron complexes on wound healing compared to commercial nitric oxide plasma generator. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 4439–4457.
42. Клещёв А.Л., Мордвинцев П.И., Ванин А.Ф. (1985) Роль оксида азота и железа в гипотензивном действии нитрозильных комплексов железа с различными анионными лигандами. *Studia Biophys.* **105**, 93–102.
43. Chazov E.I., Rodnenkov O.V., Zorin A.V., Lakomkin V.L., Gramovich O.V., Vyborov O.V., Dragnev A.G., Timoshin A.A., Buryachkovskaya L.I., Abramov A.A., Massenko V.P., Arzamastsev E.V., Kapelko V.I., Vanin A.F. (2012) Hypotensive effect of “Oxacom” containing a dinitrosyl iron complexes with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **26**, 148–157.
44. Ванин А.Ф., Пекшев А.В., Вагапов А.Б., Шарпов Н.А., Лакомкин В.Л., Абрамов А.А., Тимошин А.А., Капелько В.И. (2021) Газообразный оксид азота и динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как предполагаемые лекарственные средства, способные купировать COVID-19. *Биофизика*. **66**, 155–163. 155–163).
45. Мордвинцев П.И., Руднева В.Г., Ванин А.Ф., Шимкевич Л.Л., Ходоров Б.И. (1986) Ингибирующее действие динитрозильных комплексов негемового железа с низкомолекулярными лигандами на агрегацию тромбоцитов. *Биохимия*. **51**, 1851–1857.
46. Шамова Е.Б., Бичан О.Д., Дрозд Е.С., Горудко И.В., Чижик С.А., Шумаев К.Б., Черенкевич С.Н., Ванин А.Ф. (2011) Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами NO. *Биофизика*. **56**, 265–271.
47. Remizova M.I., Kochetygov N.I., Kerbout K.A., Lakomkin V.L., Timoshin A.A., Burgova E.N., Vanin A.F. (2011) Effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment. *Eur. J. Pharmacol.* **662**, 40–36.
48. Andreev-Andriyevsky A.A., Mikoyan V.D., Serezhenkov V.A., Vanin A.F. (2011) Penile erectile activity of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **24**, 217–223.
49. Сerezhenkov V.A., Калинина Е.В., Глазунова В.А., Саприн А.Н., Ванин А.Ф. (2007) Почему железо устраняет цитотоксическое действие оксида азота на культуры клеток человека и животных? *Биофизика*. **52**, 869–875.

50. Kim Y.M., Chung H.T., Symmons R.L., Billiar T.R. (2000) Cellular nonheme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **275**, 10954–10961.
51. Ding H., Demple B. (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 5146–5150.
52. Lo F.C., Chen C.L., Lee C.M., Tsai M.C., Lu T.T., Liaw W.F., Yu S.S.F. (2008) A study of NO trafficking from dinitrosyl-iron complexes to the recombinant *E. coli* transcriptional factor SoxR. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 961–972.
53. Demple B. (2002) Signal transduction by nitric oxide in cellular stress response. *Mol. Cell. Biochem.* **2345/235**, 11–18.
54. Wu C.R., Huang Y.D., Hong Y.H., Liu Y.H., Narwane M., Chang Y.H., Dinh N.K., Hsieh H.T., Hsieh Y.J., Wu P.C., Pao C.W., Chan T.S., Hsu I.J., Lu T.T. (2021) Endogenous conjugation of biomimetic dinitrosyl iron complex with protein vehicles for oral delivery of nitric oxide to brain and activation of hippocampal neurogenesis. *J. Amer. Chem. Soc. Au.* **1**, 998–1013.
55. Lepka K., Volbracht K., Bill E., Schneider R., Rios N., Hildebrandt T., Ingwersen J., Prozorovski T., Lillig C.H., van Horssen J., Steinman L., Hartung H.P., Radi R., Holmgren A., Aktas O., Berndt C. (2017) Iron-sulfur glutaredoxin 2 protects oligodendrocytes against damage induced by nitric oxide release from activated microglia. *Glia.* **65**, 1521–1534.
56. Malyshev I.Yu., Malugin A.V., Golubeva L.Yu., Zenina T.A., Manukhina E.B., Mikoyan V.D., Vanin A.F. (1996) Nitric oxide donor induces HSP70 accumulation in the heart and in cultured cells. *FEBS Lett.* **301**, 21–23.
57. Voevodskaya N.V., Serezhenkov V.A., Cooper C.F., Kubrina L.N., Vanin A.F. (2002) Exogenous ferrous iron is required for the nitric oxide-catalyzed destruction of the iron-sulphur center in adrenodoxin. *Biochem. J.* **368**, 633–639.
58. Graziano M., Lamattina L. (2005) Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. *Trends Plant Sci.* **10**, 4–8.
59. Richardson D.R., Lok H.C. (2008) The nitric oxide-iron interplay in mammalian cells: transport and storage of dinitrosyl iron complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1780**, 638–651.
60. Писаренко О.И., Серебрякова Л.И., Цкитишвили О.В., Студнева Л.М., Ванин А.Ф., Чазов Е.И. (2008) Кардиозащитное действие динитрозильных комплексов железа с цистеином у крыс *in vivo*. *Изв. РАН, сер. Биология.* **1**, 110–114.

Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as a Functionally Active “Working Form” of Nitric Oxide System in Living Organisms

A. F. Vanin*

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

*e-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru

The experimental data are summarized which allow to suggest that dinitrosyl iron complexes (DNIC) with thiol-containing ligands can be considered as an endogenous “working form” of nitric oxide (NO) system in living organisms. The complexes can function as donors of both neutral NO molecules as well as nitrosonium cations (NO⁺) which exert respectively positive (regulatory) or negative (cytotoxic) effect on human and animal organisms. A special attention is paid to DNIC capacity to block (especially in combination with dithiocarbamate derivatives) coronavirus SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters.

Keywords: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, nitrosonium cations, S-nitrosothios

РОЛЬ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА В РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 57.042

ЭФФЕКТЫ ДОНОРА СЕРОВОДОРОДА GYY4137 НА ПУЛ ПРОТЕАСОМ КЛЕТОК РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ

© 2023 г. Е. В. Григорьева^{a, b}, Т. М. Астахова^c, А. В. Буров^a, В. Л. Карпов^a, А. В. Морозов^{a, b, *}

^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия

^bМосковский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

^cИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук,
Москва, 119334 Россия

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Поступила в редакцию 29.04.2023 г.

После доработки 09.06.2023 г.

Принята к публикации 09.06.2023 г.

Опухолевые клетки характеризуются повышенным уровнем метаболизма. В регуляции метаболических процессов как в здоровых, так и в опухолевых клетках участвует сероводород (H_2S), который влияет на функцию ключевых клеточных систем, включая убиквитин-протеасомную систему, обеспечивающую протеостаз. Принципиальным компонентом убиквитин-протеасомной системы являются протеасомы — мультисубъединичные белковые комплексы, которые осуществляют протеолиз большей части внутриклеточных белков. На сегодняшний день данных о влиянии H_2S на общий пул протеасом и непосредственно на отдельные формы протеасом, в том числе в опухолевых клетках, недостаточно. Нами исследован эффект донора сероводорода GYY4137 (50, 100 и 200 мкМ) на пул протеасом в клетках аденокарциномы прямой кишки SW620B8-mCherry, экспрессирующих флуоресцентно меченные неконститутивные протеасомы. Клетки инкубировали с GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч. Показано, что воздействие GYY4137 в концентрации 200 мкМ в течение 24 ч приводит к снижению химотрипсинподобной и каспазаподобной активности протеасом. При этом наблюдается повышение экспрессии генов субъединиц протеасом. В лизатах клеток, инкубированных с 200 мкМ GYY4137, спустя 48 ч увеличивается содержание конститутивной субъединицы $\beta 5$, что, по-видимому, способствует выравниванию активности протеасом в клетках. Инкубация клеток с GYY4137 (200 мкМ, 72 ч) также приводила к повышению уровней экспрессии некоторых протеасомных генов, однако это не оказывало существенного влияния на активность и субъединичный состав протеасом. На протяжении эксперимента не выявлено изменений в содержании флуоресцентно меченных неконститутивных протеасом в клетках. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о модуляции активности протеасом донором сероводорода, а также о влиянии GYY4137 на уровни транскрипции и трансляции отдельных протеасомных генов.

Ключевые слова: H_2S , доноры сероводорода, протеасомы, аденокарцинома прямой кишки

DOI: 10.31857/S0026898423060083, **EDN:** RBEQZK

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, активные формы серы (АФС), к которым, в частности, относится сероводород (H_2S), играют важную роль в поддержании гомеостаза клеток и обладают цитопротекторными свойствами [1]. Поэтому изучение механизмов действия АФС, приводящих к адаптации клеток к неблагоприятным условиям, вызывает значительный интерес. На сегодняшний день активно исследуется влияние H_2S на жизненно важные системы, обеспечивающие регуляцию метаболизма клеток [2, 3].

Одной из таких систем является убиквитин-протеасомная система (УПС).

Роль УПС в метаболизме клеток связана с деградацией большинства внутриклеточных белков. Ключевым компонентом УПС, непосредственно осуществляющим разрушение белковых субстратов, являются протеасомы — крупные (мол. масса 20S протеасомы равна 700 кДа) мультисубъединичные белковые комплексы. 20S протеасомы представляют собой цилиндрические структуры, построенные из 28 субъединиц, организованных в четыре семичленных кольца [4].

Два внешних кольца содержат альфа-субъединицы ($\alpha 1-7$), которые участвуют в формировании структуры протеасом, а также барьера, ограничивающего доступ субстратов во внутренние камеры протеасом. Внутреннее пространство протеасомы сформировано двумя кольцами, состоящими из бета-субъединиц ($\beta 1-7$). Как и альфа-субъединицы, бета-субъединицы протеасом выполняют структурную функцию, однако три из них — $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ — являются каталитически активными гидролазами. N-концевые остатки треонина этих субъединиц осуществляют нуклеофильную атаку пептидных связей субстрата после кислых, основных и гидрофобных аминокислотных остатков соответственно. Таким образом, протеасомы проявляют каспазаподобную, трипсинподобную и химотрипсинподобную активности. Во время сборки протеасом конститутивные каталитические субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$) могут заменяться так называемыми “иммунными” аналогами ($\beta 1i$, $\beta 2i$ и $\beta 5i$), обладающими несколько иной структурой, что приводит к изменению активности протеасом и спектра производимых ими пептидов [5]. Протеасомы, содержащие все три иммунные субъединицы вместо конститутивных, принято называть иммунопротеасомами, в то время как протеасомы, содержащие как иммунные, так и конститутивные субъединицы, иногда называют промежуточными. И иммунные, и промежуточные (вместе “неконститутивные”) протеасомы активно участвуют в презентации антигенов, в воспалительных реакциях и ответе клеток на различные стрессовые воздействия [6, 7]. Поэтому экспрессия определенных форм протеасом рассматривается как прогностический фактор при онкологических и аутоиммунных заболеваниях. В этой связи при исследовании влияния определенных веществ на УПС особый интерес представляют изменения в пуле протеасом.

Накапливаются экспериментальные данные, указывающие на влияние АФС, в частности H_2S , на пул протеасом в клетке и функциональное состояние УПС [8, 9]. Недавно, используя технологию CRISPR-Cas9, нами была получена репортерная клеточная линия аденокарциномы прямой кишки, в состав протеасом которой входят иммунные субъединицы $\beta 5i$, слитые с флуоресцентным белком mCherry [10]. Принципиальной особенностью этой линии является то, что экспрессия гена, кодирующего химерную субъединицу $\beta 5i$ -mCherry, находится под контролем эндогенных регуляторных механизмов. Это позволяет количественно (с использованием проточной цитометрии) оценивать влияние различных препаратов на экспрессию компонентов иммунопротеасом в живых клетках, а также изучать локализацию неконститутивных форм протеасом. С использованием полученной линии в нашей работе изучено влияние молекулярного донора сероводорода — GYY4137,

обеспечивающего медленное высвобождение H_2S , на пул протеасом в клетках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии. В работе использовали генетически модифицированную линию клеток аденокарциномы прямой кишки SW620B8-mCherry [10]. Клетки культивировали в среде DMEM (“Gibco”, Великобритания), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“Hyclone”, США) и пенициллин/стрептомицин (500 Ед./500 мкг/мл), при 37°C и 5% CO_2 .

Обработка клеток донором сероводорода. Донор сероводорода GYY4137 (“Sigma-Aldrich”, США) разводили в DMSO до концентрации 50, 100 и 200 мМ, затем добавляли в культуральную жидкость до конечной концентрации 50, 100 и 200 мкМ. К контрольным клеткам добавляли такое же количество DMSO (по объему). Клетки инкубировали в течение 6, 24, 48 и 72 ч, после чего промывали фосфатным буфером (ФБ), снимали с подложки с помощью резинового скребка, суспендировали в ФБ и переносили в пробирки объемом 1.5 мл. Клетки осаждали центрифугированием (200 g, 4 мин), отбирали надосадочную жидкость, а осадки клеток замораживали при $-80^\circ C$.

Выделение РНК и получение кДНК. Суммарную РНК выделяли из клеток с помощью набора RNA Solo (“Евроген”, Россия) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию и чистоту РНК определяли спектрофотометрически, используя прибор NanoDrop (“Thermo Scientific”, США). Далее проводили реакцию обратной транскрипции, используя обратную транскриптазу Magnus (“Евроген”) и праймер oligo(dT)₂₀ для получения кДНК.

Оценка уровня экспрессии протеасомных генов. Проводили количественную ПЦР в реальном времени и сравнительный анализ уровней экспрессии генов, кодирующих каталитические субъединицы протеасом: *PSMB5* (субъединица $\beta 5$), *PSMB6* (субъединица $\beta 1$), *PSMB8* (субъединица $\beta 5i$) и *PSMB9* (субъединица $\beta 1i$). Использовали разработанную нами ранее ПЦР-систему [11], олигонуклеотиды (табл. 1), образцы кДНК, полученные из клеток, и набор Luminaris Color Hi-Green qPCR Master Mix (“Thermo Scientific”, США). В качестве референсного гена использовали ген *Actb*.

Лизирование клеток. Для определения активности протеасом клетки гомогенизировали в буфере (50 мМ Трис-HCl pH 7.5, 100 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 10% глицерина, 10 мМ $Na_2S_2O_5$ и 2 мМ АТФ) из расчета 1 мкл буфера на 10000 клеток. Гомогенаты осветляли центрифугированием в центрифуге 5418R (“Eppendorf”, Германия) при максимальных оборотах в

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер*	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
PSMB5 for (субъединица β5)	CTCCAAACTGCTTGCCAAC
PSMB5 rev (субъединица β5)	GTTCCCTTCACTGTCCACG
PSMB6 for (субъединица β1)	AAGCCGAGAAGTTTCCACT
PSMB6 rev (субъединица β1)	GCGATGTAGGACCCAGT
PSMB8 for (субъединица β5i)	GGTGAACAAGGTGATTGAG
PSMB8 rev (субъединица β5i)	GTTCTCCATTTTCGCAGATAG
PSMB9 for (субъединица β1i)	GCTGCTGATGCCCAAGC
PSMB9 rev (субъединица β1i)	GCTGATATTTCTCACCACATTTGC

* Последовательности праймеров опубликованы ранее [11].

Таблица 2. Антитела, использованные в работе

Антитела	Производитель
Моноклональные антитела мыши к субъединице β2	“Enzo”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице β5	“GeneTex”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице β1i	“Abcam”, Великобритания
Поликлональные антитела кролика к субъединице β5i	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела мыши к β-актину	“Abcam”, Великобритания
Антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена	“Enzo”, США
Поликлональные антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена	“Abcam”, Великобритания

течение 30 мин. Концентрацию общего белка в образцах измеряли по методу Лоури. Для изучения содержания белков субъединиц протеасом методом иммуноблоттинга клетки лизировали в буфере (50 мМ Трис-HCl pH 7.5, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1% NP-40), инкубировали в течение 10 мин на льду, после чего осветляли центрифугированием (10000 g, 10 мин). Затем надосадочную жидкость отбирали и замораживали при –80°C.

Иммуноблоттинг. Содержание целевых белков в гомогенатах анализировали методом иммуноблоттинга. Белки разделяли с помощью электрофореза в 12%-ном денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) после чего переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”, США). Эффективность переноса оценивали, окрашивая мембраны 0.1%-ным раствором Ponceau Rouge (“Sigma-Aldrich”). Для выявления субъединиц протеасом мембраны инкубировали с первичными антителами (табл. 2) в течение 2 ч, затем отмывали ФБ, содержащим 0.1% Tween 20 (“Thermo

Fisher Scientific”), и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (табл. 2), конъюгированными с пероксидазой хрена. Блоты проявляли с помощью набора ECL Prime (“GE Healthcare”, Великобритания) и рентгеновской пленки (“FujiFilm”, Япония). Для нормирования сигнала мембраны отмывали от антител сначала буфером для снятия антител (ФБ, 2%-ный додецилсульфат Na, 100 мМ β-меркаптоэтанол), а затем дополнительно ФБ. Мембраны инкубировали с первичными антителами к β-актину (табл. 2) в течение 1 ч, после чего отмывали и инкубировали с соответствующими вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена (табл. 2), и проявляли, как описано выше. Относительную оптическую плотность сигналов оценивали с помощью программы ImageJ.

Определение активности протеасом. Химотрипсиноподобную и каспазаподобную активности протеасом в осветленных гомогенатах оценивали по уровню гидролиза флуорогенных субстратов

Suc-LLVY-AMC (“Sigma-Aldrich”) и Z-LLE-AMC (“Sigma-Aldrich”) с использованием VersaFluor Fluorometer (“Bio-Rad”), как описано в [12]. Активность измеряли как минимум в трех повторностях в 100 мкл буфера для определения активности (20 мМ Трис-HCl pH 7.5, 1 мМ дитиотреитол, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ и 30 мкМ субстрата), содержащего 6 мкл осветленного гомогената; концентрации АТФ и MgCl₂ выбирали, учитывая данные [13]. Специфическую активность протеасом контролировали, добавляя в отдельные пробы по 10 мкМ ингибитора протеасом MG132 (“Sigma-Aldrich”). Полученные значения умножали на уравнивающий коэффициент (определяемый после оценки концентрации белка в пробах), вычисляли среднее значение и стандартное отклонение, после чего пересчитывали относительно уровня активности в контрольных клетках (в процентах).

Проточная цитометрия. Клетки SW620B8-mCherry обрабатывали GYY4137 (50, 100 или 200 мкМ) в течение 6, 24, 48 или 72 ч, после чего снимали с подложки и оценивали флуоресценцию mCherry с помощью проточного цитометра LSRFortessa (“BD Biosciences”, США). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием FlowJo версии 10.0.7 (“FlowJo LLC”, США) и Microsoft Excel (“Microsoft Corp.”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

GYY4137 снижает активность протеасом при инкубации в течение суток

На первом этапе работы оценили влияние GYY4137 в различных концентрациях на активность протеасом в клетках SW620B8-mCherry. Исходя из данных, приведенных в [14–16], были выбраны и использованы следующие концентрации донора сероводорода – 50, 100 и 200 мкМ, а также время инкубации клеток – 6, 24, 48 и 72 ч. Наблюдали статистически значимое снижение активности протеасом в клетках, инкубированных с 200 мкМ GYY4137 в течение 24 ч. При этом выявили снижение химотрипсинподобной (на 25%, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) и каспазаподобной (на 20% $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) активности протеасом (рис. 1). Следует отметить снижение химотрипсинподобной активности протеасом также спустя 48 ч после начала инкубации, однако статистически значимым снижение активности было в присутствии 100 мкМ GYY4137. При концентрации донора сероводорода 200 мкМ снижение химотрипсинподобной активности спустя 48 ч было близким к значимому. Через 72 ч различия в активности внутриклеточных протеасом отсутствовали.

GYY4137 вызывает динамические изменения экспрессии протеасомных генов

Связан ли эффект модуляции активности протеасом с изменением содержания протеасом? Чтобы понять это, мы в первую очередь исследовали уровни экспрессии генов, кодирующих субъединицы протеасом с химотрипсинподобной ($\beta 5$, $\beta 5i$, $\beta 1i$) и каспазаподобной активностью ($\beta 1$). Так, в клетках SW620B8-mCherry, инкубированных с GYY4137, методом ПЦР в реальном времени проведен анализ экспрессии генов *PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB8* и *PSMB9*, кодирующих каталитические субъединицы $\beta 5$, $\beta 1$, $\beta 5i$ и $\beta 1i$ соответственно. Показано, что воздействие GYY4137 вызывает динамические изменения уровней экспрессии протеасомных генов (рис. 2). Следует отметить, что амплитуда выявленных изменений превосходила амплитуду в контрольных клетках не более, чем в 2.3 раза. Наиболее заметно изменились уровни экспрессии генов *PSMB6* (2.3 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), *PSMB8* (2.2 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) и *PSMB5* (2 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) в образцах клеток, инкубированных с 50 мкМ GYY4137 в течение 24 ч. Также в образцах клеток, инкубированных со 100 и 200 мкМ GYY4137 в течение 24 ч, выявлено повышение экспрессии генов *PSMB6* (1.88 и 1.76 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) и *PSMB8* (1.85 и 1.39 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни). Кроме того, обнаружено повышение уровней экспрессии генов *PSMB5* (1.37 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), *PSMB6* (1.56 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), *PSMB8* (1.27 раза, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) при инкубации клеток с 200 мкМ GYY4137 в течение 6 ч. Экспрессия генов *PSMB5* и *PSMB6* возрастала и после инкубации со 100 и 200 мкМ GYY4137 (1.44 и 1.76 раза и 1.32 и 1.4 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) спустя 72 ч после добавления донора сероводорода (рис. 2). Более сложная динамика экспрессии генов *PSMB8* и *PSMB9*, кодирующих иммунные субъединицы $\beta 5i$ и $\beta 1i$ протеасом, наблюдалась при инкубации клеток с GYY4137 в течение 72 ч. Экспрессия гена *PSMB8* увеличивалась при инкубации с 50 и 100 мкМ (1.36 и 1.22 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни), но имела тенденцию к снижению после инкубации с 200 мкМ GYY4137 (0.84 раза). Экспрессия *PSMB9* также увеличивалась после инкубации со 100 мкМ, но снижалась после инкубации с 200 мкМ GYY4137 (1.45 и 0.88 раза, соответственно, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни) (рис. 2).

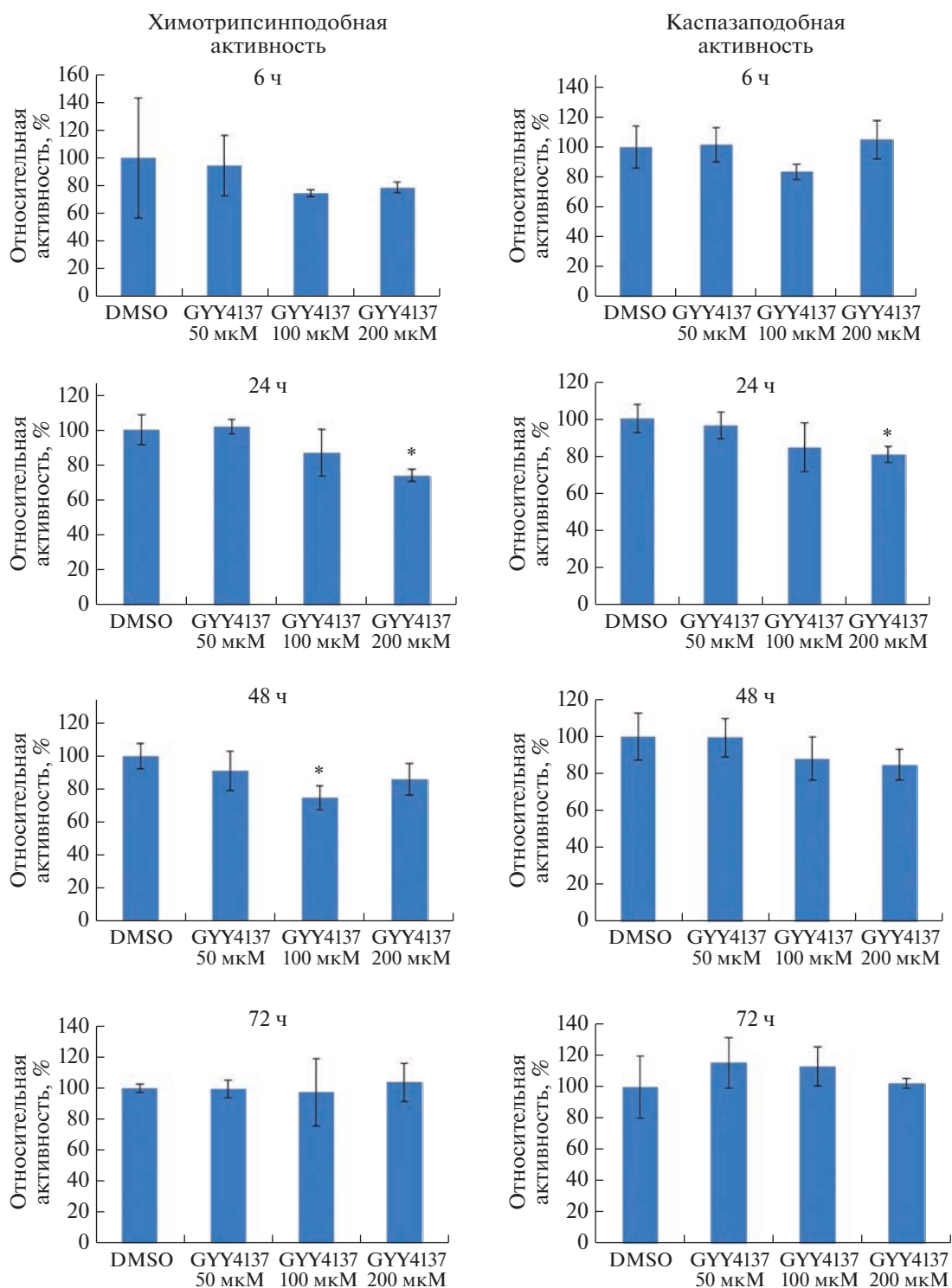


Рис. 1. Сравнительный анализ химотрипсинподобной и каспазаподобной активности в гомогенатах клеток SW620B8-mCherry после инкубации с различными концентрациями GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч. Уровни активности нормированы по уровню в контрольных клетках. Статистическая значимость различий в уровнях активности в образцах по сравнению с контролем оценена с помощью критерия Манна–Уитни, * $p < 0.05$.

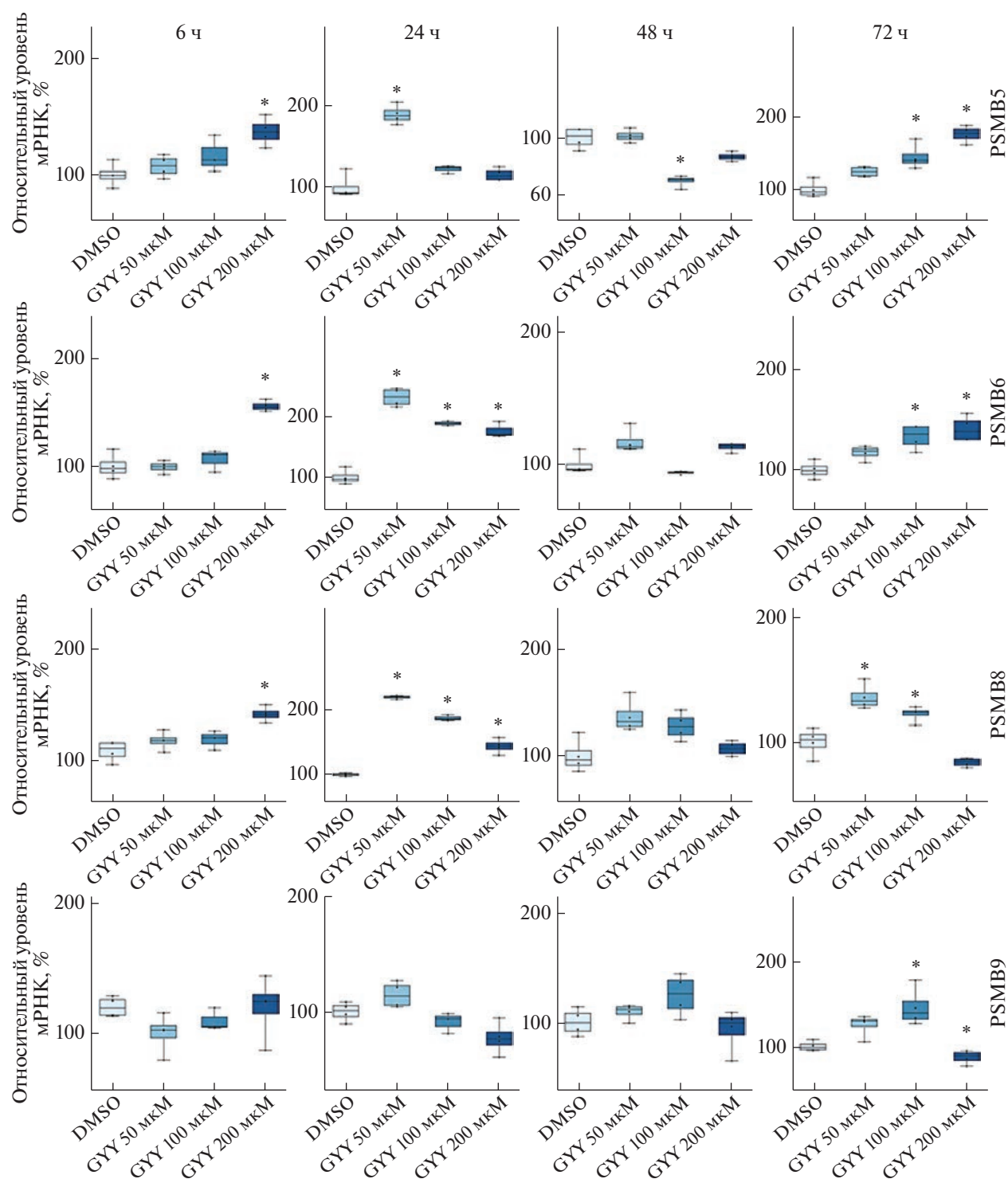


Рис. 2. Сравнительный анализ экспрессии генов конститутивных (*PSMB5*, *PSMB6*) и иммунных субъединиц протеасом (*PSMB8*, *PSMB9*) в клетках SW620B8-mCherry после инкубации с различными концентрациями GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч. Уровень экспрессии гена нормирован по уровню экспрессии в контрольных клетках, инкубированных в указанные промежутки времени. Указаны медианные значения и стандартное отклонение. Статистическая значимость различий в уровне экспрессии генов в образцах по сравнению с контролем оценена с помощью критерия Манна–Уитни, * $p < 0.05$.

ГYY4137 вызывает изменения содержания субъединиц протеасом в гомогенатах клеток

С целью более детальной характеристики изменений в пуле протеасом под действием GYY4137 оценили содержание субъединиц $\beta 5$, $\beta 1i$ и $\beta 5i$ протеасом в гомогенатах клеток, инкубированных с донором сероводорода в течение разных промежутков времени, методом иммуноблоттинга (рис. 3).

В клетках, инкубированных с GYY4137 в течение 48 ч, выявлено некоторое снижение количества субъединицы $\beta 1i$, однако, учитывая низкий уровень экспрессии данной субъединицы, можно предположить, что небольшие изменения ее содержания не оказывают существенного влияния на общую активность протеасом. Кроме того, после 48 ч инкубации с донором сероводорода наблюдали дозозависимое увеличение содержания субъединицы $\beta 5$ (рис. 3), тогда как экспрессия субъединицы $\beta 5i$ существенно не изменилась. Содержание этой субъединицы мы оценили, используя также другой подход. Особенность линии SW620B8-mCherry заключается в том, что в клетках этой линии экспрессируется $\beta 5i$, слитая с флуоресцентным белком mCherry, поэтому оценить содержание этой субъединицы в клетках можно также по интенсивности флуоресценции. Используя проточную цитометрию, определили флуоресценцию mCherry в клетках через разные промежутки времени после инкубации с GYY4137 в разных концентрациях. Оказалось, что инкубация клеток с донором сероводорода не влияет на уровень флуоресценции mCherry в клетках SW620B8-mCherry (рис. 4). Эти результаты подтверждают данные, полученные при анализе содержания субъединиц протеасом в лизатах клеток, и указывают на отсутствие значительных изменений в содержании неконститутивных протеасом, содержащих эту субъединицу, несмотря на повышение экспрессии гена *PSMB8*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В клетках человека H_2S синтезируется из аминокислоты цистеина с помощью ферментативной реакции, катализируемой цистатионин- γ -лиазой (CSE) и цистатионин- β -синтазой (CBS), а также 3-меркапто-сульфидтрансферазой (3-MST) [17]. Как правило, уровни сероводорода в клетках достаточно низкие, однако H_2S признан физиологическим медиатором, выполняющим множество важных функций и влияющим на ключевые клеточные системы. Так, сероводород играет цитопротекторную роль при ишемической болезни, участвует в защите клеток от окислительного стресса, в синаптической передаче, поддержании тонуса сосудов, в процессах ангиогенеза, в воспалительных реакциях, регуляции транскрипции и

заживлении ран [1]. Таким образом, изучение роли сероводорода в клетке представляется крайне актуальным, поэтому необходимы специальные соединения, которые могут служить донорами H_2S , т.е. обеспечивать его высвобождение. На сегодняшний день известны соединения, обеспечивающие разную скорость высвобождения H_2S [17]. К классическим молекулам относятся такие соли, как NaSH, Na_2S . При растворении этих солей происходит быстрое высвобождение сероводорода, что может плохо воспроизводить физиологические процессы в клетке. Более медленное высвобождение сероводорода обеспечивает GYY4137 – сравнительно недавно полученное производное замещенного дитиофосфетана (Реагент Лавессона) [15]. В настоящее время GYY4137 относится к наиболее часто применяемым в исследованиях донорам сероводорода [17]. Нами изучены динамические эффекты разных концентраций GYY4137 на пул протеасом в линии клеток SW620B8-mCherry аденокарциномы прямой кишки.

В клетках SW620B8-mCherry под действием GYY4137 снижается активность протеасом. Так, инкубация клеток в течение 24 ч с GYY4137 приводит к статистически значимому снижению как химотрипсинподобной, так и калпазоподобной активности комплексов, не связанному с изменением содержания субъединиц протеасом, обладающих этими активностями. Важным механизмом регуляции активности протеасом является модификация субъединиц посредством посттрансляционных модификаций [18]. Так, фосфорилирование и нитрозилирование субъединиц протеасом может приводить как к повышению, так и к понижению активности протеасом [18]. Нам не удалось найти публикаций, в которых выявлено сульфгидрирование субъединиц протеасом, однако известно, что в клетках от 10 до 25% белков подвергаются сульфгидрированию [19]. Нельзя исключить и сульфгидрирование субъединиц протеасом, что, в конечном итоге, скажется на активности комплексов. С другой стороны, сульфгидрирование белков может влиять на эффективность их фосфорилирования и нитрозилирования [20]. Таким образом, можно предположить, что на начальном этапе снижение активности протеасом может быть связано с модификацией их субъединиц H_2S . При этом со снижением активности протеасом в промежутке между 6 и 24 ч совпадает умеренная активация экспрессии генов, кодирующих субъединицы протеасом. По всей видимости, данный эффект зависит от концентрации GYY4137. Так, при использовании GYY4137 в концентрации 200 мкМ повышение экспрессии протеасомных генов заметно уже через 6 ч. Спустя 24 ч повышение экспрессии протеасомных генов под действием 200 мкМ GYY4137 становится минимальным, а в присутствии 50 мкМ, наоборот,

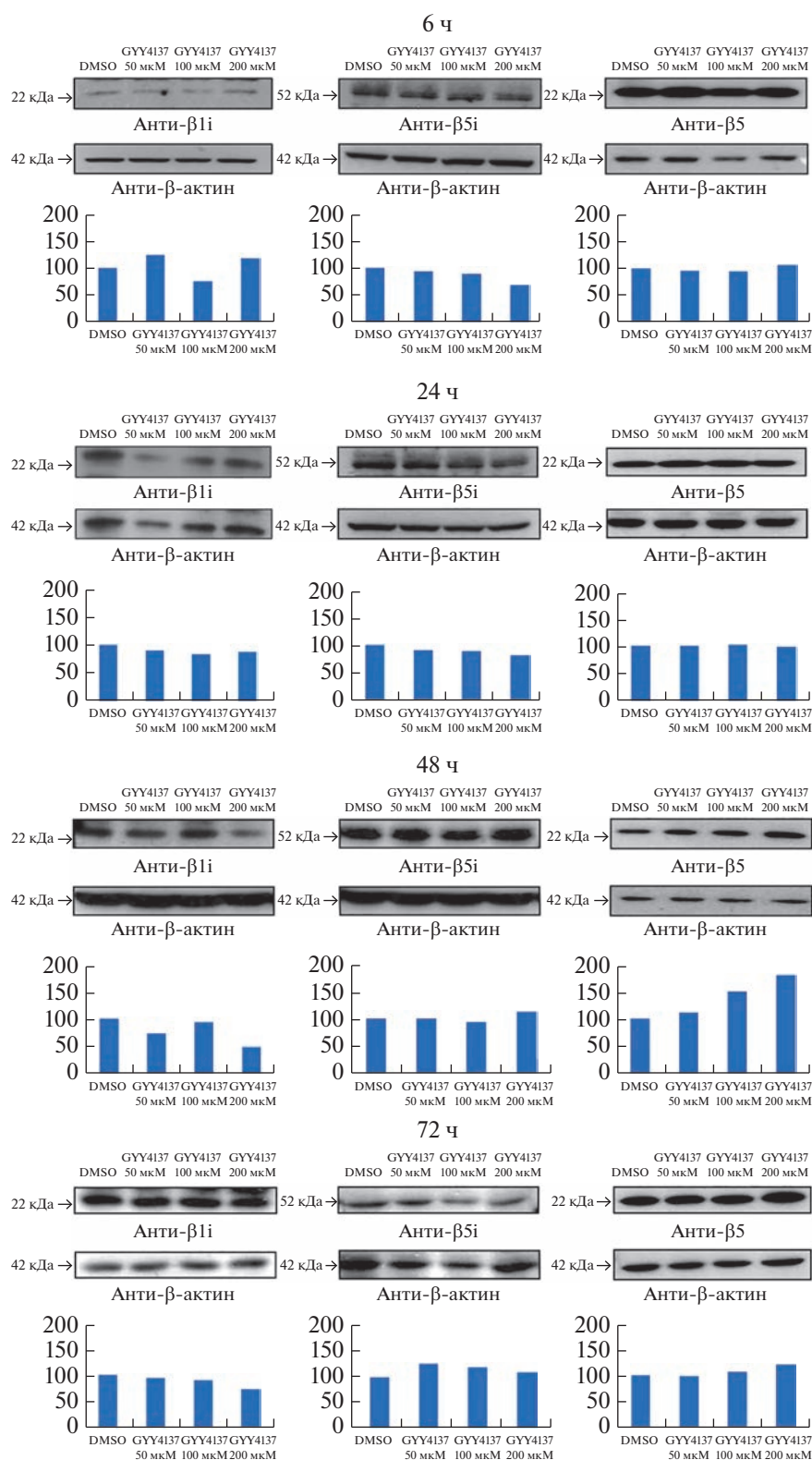


Рис. 3. Иммуноблоттинг лизатов клеток SW620B8-mCherry, инкубированных с различными концентрациями донора сероводорода GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч. Под изображениями блотов приведены диаграммы, отражающие нормированные (по уровню сигнала β-актина) значения оптической плотности (в % от контроля (DMSO)). Результаты иммуноблоттинга анализировали с помощью программы ImageJ.

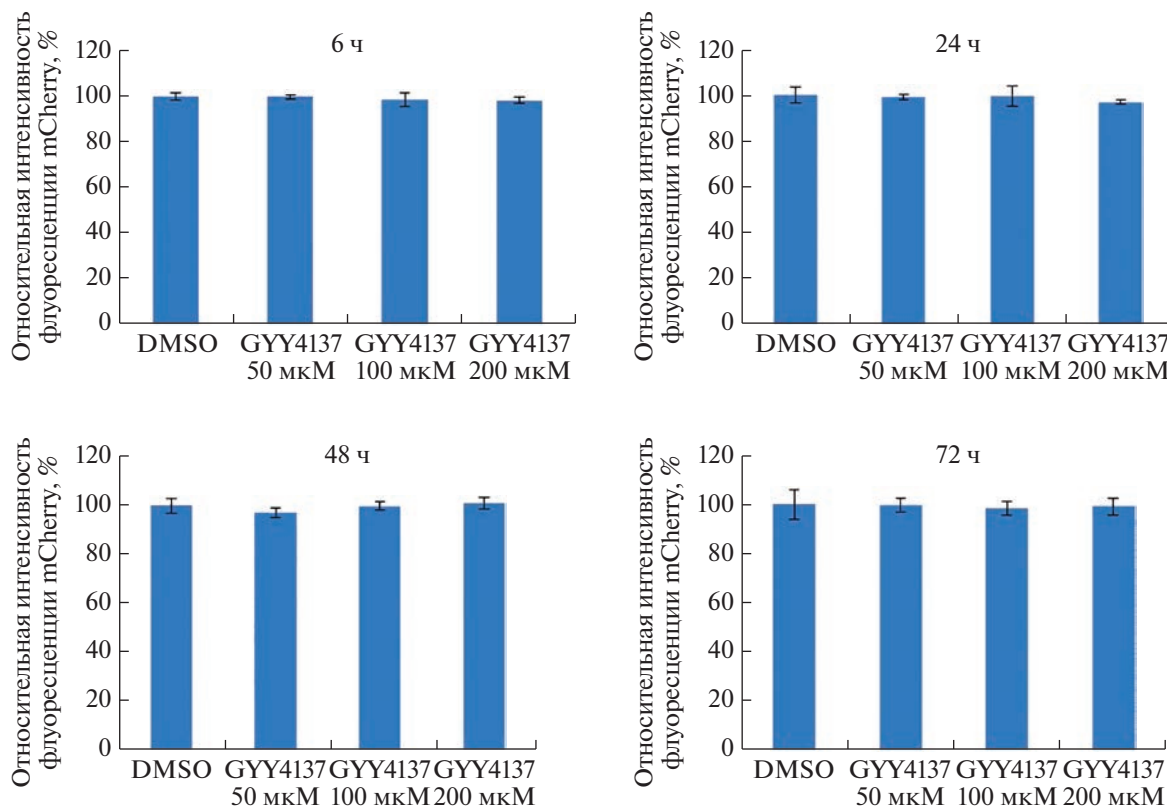


Рис. 4. Сравнительный анализ средней интенсивности флуоресценции mCherry в клетках SW620B8-mCherry после инкубации с различными концентрациями GYY4137 в течение 6, 24, 48 и 72 ч.

максимальным. Таким образом, вероятно, имеет место отложенный эффект, связанный с высвобождением сероводорода. Этот эффект подтверждается дозозависимым увеличением содержания конститутивной каталитической субъединицы $\beta 5$ в лизатах клеток через 48 ч после добавления донора сероводорода. В результате чего, возможно, происходит восстановление общей активности протеасом. Можно предположить несколько механизмов, обеспечивающих такие изменения. Так, сульфгидрирование белка Keap1 приводит к высвобождению и ядерной транслокации транскрипционного фактора Nrf2 [8], мишенями которого являются промоторы протеасомных генов [7, 21]. На мышах, моделирующих развитие сердечной недостаточности, показано, что H_2S -терапия по Nrf2-зависимому механизму способствует повышению активности протеасом и замедляет развитие патологии [9]. Кроме того, АФС активируют эндотелиальную синтазу оксида азота и, как следствие, выработку NO [22]. В то же время, под действием NO происходит повышение уровня экспрессии генов, кодирующих иммунные субъединицы протеасом, что способствует увеличению протеолитической активности комплексов [23]. Кроме того, сульфгидрирование субъединицы p65 NF- κ B способ-

ствует связыванию транскрипционного фактора с коактиватором RPS3, после чего этот комплекс стимулирует транскрипцию целевых генов [24], среди которых есть и гены иммунных субъединиц протеасом [6]. Еще один возможный механизм воздействия АФС на компоненты УПС – стимуляция выработки cAMP и участие в активации cAMP-зависимой протеинкиназы [25], которая фосфорилирует и активирует транскрипционный фактор CREB [26], усиливающий транскрипцию генов иммунных субъединиц протеасом [6]. Важно отметить, что несмотря на изменения уровня экспрессии гена *PSMB8*, мы не наблюдали существенного изменения содержания неконститутивных протеасом, содержащих субъединицу $\beta 5i$, в клетках SW620B8-mCherry. Таким образом, полученные данные указывают на то, что в клетках рака прямой кишки действие GYY4137 в большей степени сказывается на содержании и активности конститутивных протеасом.

В целом, экспериментальные и опубликованные данные указывают на вероятную роль сероводорода в регуляции активности и субъединичного состава протеасом, что напрямую влияет на поддержание редокс-статуса и гомеостаза клеток в целом. Дальнейшие эксперименты позволят точнее установить молекулярные механизмы, обеспечива-

ющие изменения в пуле протеасом, вызванные действием доноров сероводорода, в частности GYY4137. Также предстоит понять, подвергаются ли субъединицы протеасом сульфидированию и какой эффект это оказывает на протеолитическую активность комплексов.

Работа получила финансовую поддержку Российского научного фонда (грант № 17-74-30030).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kimura H. (2014) Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules*. **19**, 16146–16157.
- Sen N. (2017) Functional and molecular insights of hydrogen sulfide signaling and protein sulfhydration. *J. Mol. Biol.* **429**, 543–561.
- Paul B.D., Snyder S.H., Kashfi K. (2021) Effects of hydrogen sulfide on mitochondrial function and cellular bioenergetics. *Redox Biol.* **38**, 101772.
- Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. **386**, 463–471.
- Abi Habib J., Lesenfans J., Vigneron N., Van den Eynde B.J. (2022) Functional differences between proteasome subtypes. *Cells*. **11**, 421.
- Ferrington D.A., Gregerson D.S. (2012) Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Progr. Mol. Biol. Transl. Sci.* **109**, 75–112.
- Pickering A.M., Linder R.A., Zhang H., Forman H.J., Davies K.J. (2012) Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28 $\alpha\beta$ regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **287**, 10021–10031.
- Koike S., Ogasawara Y., Shibuya N., Kimura H., Ishii K. (2013) Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by *t*-buthylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* **587**, 3548–3555.
- Shimizu Y., Nicholson C.K., Lambert J.P., Barr L.A., Kuek N., Herszenhaut D., Tan L., Murohara T., Hansen J.M., Husain A., Naqvi N., Calvert J.W. (2016) Sodium sulfide attenuates ischemic-induced heart failure by enhancing proteasomal function in an Nrf2-dependent manner. *Circ. Heart Fail.* **9**, e002368.
- Burov A., Funikov S., Vagapova E., Dalina A., Rezvykh A., Shyroкова E., Lebedev T., Grigorieva E., Popenko V., Leonova O., Spasskaya D., Spirin P., Prasolov V., Karpov V., Morozov A. (2021) A cell-based platform for the investigation of immunoproteasome subunit $\beta 5i$ expression and biology of $\beta 5i$ -containing proteasomes. *Cells*. **10**, 3049.
- Морозов А.В., Буров А.В., Астахова Т.М., Спаская Д.С., Маргулис Б.А., Карпов В.Л. (2019) Динамика функциональной активности и экспрессии субъединиц протеасом в условиях адаптации клетки к тепловому шоку. *Молекуляр. биология*. **53**, 638–647.
- Морозов А.В., Буров А.В., Фуников С.Ю., Тетерина Е.В., Астахова Т.М., Ерохов П. А., Устюгов А.А., Карпов В.Л. (2023) Изменения активности и содержания отдельных форм протеасом в образцах коры головного мозга при развитии патологии у мышей линии 5xFAD. *Молекуляр. биология*. **57**(5), 873–885.
- Morozov A., Astakhova T., Erokhov P., Karpov V. (2022) The ATP/Mg²⁺ balance affects the degradation of short fluorogenic substrates by the 20S proteasome. *Methods Protocols*. **5**, 15.
- Li L., Fox B., Keeble J., Salto-Tellez M., Winyard P.G., Wood M.E., Moore P.K., Whiteman M. (2013) The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. *J. Cell. Mol. Med.* **17**(3), 365–376. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12016>
- Li L., Whiteman M., Guan Y.Y., Neo K.L., Cheng Y., Lee S.W., Zhao Y., Baskar R., Tan C.H., Moore P.K. (2008) Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*. **117**(18), 2351–2360. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753467>
- Wu Z., Peng H., Du Q., Lin W., Liu Y. (2015) GYY4137, a hydrogen sulfide-releasing molecule, inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinases in Coxsackie virus B3-infected rat cardiomyocytes. *Mol. Med. Rep.* **11**(3), 1837–1844. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2901>
- Powell C.R., Dillon K.M., Matson J.B. (2018) A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem. Pharmacol.* **149**, 110–123.
- Kors S., Geijtenbeek K., Reits E., Schipper-Krom S. (2019) Regulation of proteasome activity by (post-) transcriptional mechanisms. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 48.
- Westermann B. (2009) Nitric oxide links mitochondrial fission to Alzheimer's disease. *Sci. Signaling*. **2**, pe29–pe29.
- Zhang D., Du J., Tang C., Huang Y., Jin H. (2017) H₂S-induced sulfhydration: biological function and detection methodology. *Front. Pharmacol.* **8**, 608.
- Kaya H.E.K., Radhakrishnan S.K. (2021) Trash talk: mammalian proteasome regulation at the transcriptional level. *Trends Genet.* **37**, 160–173.
- King A.L., Polhemus D.J., Bhushan S., Otsuka H., Kondo K., Nicholson C.K., Bradley J.M., Islam K.N., Calvert J.W., Tao Y.X., Dugas T.R., Kelley E.E., Elrod J.W., Huang P.L., Wang R., Lefer D. (2014) Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 3182–3187.
- Kotamraju S., Matalon S., Matsunaga T., Shang T., Hickman-Davis J.M., Kalyanaraman B. (2006) Upreg-

- ulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.* **40**, 1034–1044.
24. Sen N., Paul B.D., Gadalla M.M., Mustafa A.K., Sen T., Xu R., Kim S., Snyder S.H. (2012) Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol. Cell.* **45**, 13–24.
25. Kimura H. (2000) Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 129–133.
26. Huang H., Wang H., Figueiredo-Pereira M.E. (2013) Regulating the ubiquitin/proteasome pathway via cAMP-signaling: neuroprotective potential. *Cell Biochem. Biophys.* **67**, 55–66.

Effects of Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 on the Proteasome Pool of Colon Cancer Cells

E. V. Grigorieva^{1, 2}, T. M. Astakhova³, A. V. Burov¹, V. L. Karpov¹, and A. V. Morozov^{1, 2, *}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

³Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Cancer cells are characterized by an increased level of metabolism and are highly dependent on the correct functioning of the processes that ensure homeostasis. Reactive sulfur species (RSS) are important molecular modulators of metabolic processes in both healthy and tumor cells. The effect of RSS and, in particular, H₂S, on key cellular systems, including the ubiquitin-proteasome system (UPS), which ensures the destruction of most intracellular proteins, has been shown. The main components of the UPS are proteasomes – multisubunit protein complexes, within which protein proteolysis occurs. At the same time, data on the effect of H₂S directly on the pool of proteasomes in tumor cells are insufficient. Here, we studied the effect of incubation of SW620B8-mCherry colon adenocarcinoma cells expressing a fluorescently labeled proteasome subunit with 50, 100, and 200 μ M of hydrogen sulfide donor GYY4137. The effect of the substance on the proteasome pool was assessed 6, 24, 48, and 72 h after administration. It was shown that the chymotrypsin-like and caspase-like proteasome activity decreases in cells incubated with 200 μ M of the GYY4137 for 24 h. This coincided with an increase in the expression of proteasome subunit genes. In lysates of cells incubated with 200 μ M GYY4137 for 48 h an increase in the content of the constitutive β 5 subunit was observed. Against this background, the activity of proteasomes in cells levels off. Following prolonged incubation with GYY4137 (72h), an increase in the expression levels of some proteasome genes was also observed, though this did not have a significant effect on the activity and subunit composition of proteasomes. Thus, the data obtained indicate the modulation of proteasome activity by the hydrogen sulfide donor, as well as the effect of GYY4137 on the levels of transcription and translation of proteasome genes.

Keywords: H₂S, hydrogen sulfide donor, proteasome, rectal adenocarcinoma

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ

УДК 575.2

БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

© 2023 г. Н. П. Юрина*

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: nyurina@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 23.03.2023 г.

После доработки 20.04.2023 г.

Принята к публикации 23.04.2023 г.

В обзоре рассмотрены современные представления о роли белков теплового шока (Heat Shock Protein, HSP), а также транскрипционных факторов генов белков теплового шока (Heat Shock Transcription Factor, HSF) в защите растений от окислительного стресса, индуцированного различными видами абиотического и биотического стресса. HSP — плеiotропные белки, участвующие в различных внутриклеточных процессах и выполняющие множество важных функций, включая повышение устойчивости растений к стрессу, защиту структуры и активности белков антиоксидантной системы. Повышенная экспрессия генов *HSP* в стрессовых условиях, приводящая к повышенному содержанию HSP, может быть использована в качестве маркера окислительного стресса. HSF растений кодируются большими семействами генов с варьируемыми последовательностями, экспрессией и функциями. Растительные HSF регулируют транскрипцию широкого спектра генов, индуцируемых стрессом, включая не только гены *HSP*, но и других шаперонов детоксикации активных форм кислорода, ферментов, участвующих в защитных метаболических реакциях и биосинтезе осмолитов или других факторов транскрипции. Полногеномный анализ растений *Arabidopsis*, риса, тополя, латука и пшеницы выявил сложную сеть взаимодействий семейств генов *HSP* и *HSF*, формирующих защиту растений от окислительного стресса. Рассмотрены данные, указывающие на важную роль HSP и HSF в реакции растений на стресс, что может быть использовано для повышения продуктивности и стрессоустойчивости растений.

Ключевые слова: окислительный стресс, активные формы кислорода, белки теплового шока, транскрипционные факторы генов белков теплового шока, антиоксидантные ферменты

DOI: 10.31857/S0026898423060228, **EDN:** QMLBFC

ВВЕДЕНИЕ

Растения постоянно подвергаются воздействию различных видов биотического и абиотического стресса, которые негативно влияют на их рост и развитие, поэтому изучению механизмов защиты растений от стресса уделяется большое внимание. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что практически на все виды стресса окружающей среды растения отвечают образованием активных форм кислорода (АФК), которые порождают окислительный стресс [1–5]. Окислительный стресс в клетках растений возникает при воздействии практически всех неблагоприятных факторов внешней среды, включая засуху, солевой, тепловой и холодовой стресс, высокую освещенность, загрязнение воздуха токсическими со-

единениями и др. [1, 3, 6, 7]. Избыточное образование таких АФК, как пероксид водорода, супероксидный радикал и синглетный кислород, приводит к повреждению клеточных мембран, белков, липидов, углеводов и ДНК [8, 9].

Механизм антиоксидантной защиты включает ферментативные и неферментативные компоненты, участвующие в сбалансированном образовании и детоксикации АФК. АФК взаимодействуют с различными клеточными сигнальными молекулами, включая фитогормоны, G-белки, ионы кальция и митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) [5, 10]. Обнаружено, что АФК опосредуют клеточные сигналы посредством прямого взаимодействия с факторами транскрипции (TF), включая TF генов белков теплового шока (Heat Shock Transcription Factor, HSF). Например, факторы HSFA2 и HSFA4 индуцируются окислительным стрессом и участвуют в детекции пероксида водорода [11]. АФК являются важными сигналь-

Сокращения. HSP — белки теплового шока (Heat Shock Protein); HSF — транскрипционные факторы генов белков теплового шока (Heat Shock Transcription Factor); TF — фактор транскрипции (Transcription Factor).

ными молекулами, которые, среди прочего, вовлечены в акклиматизацию растений и активацию их иммунитета [8, 12]. АФК участвуют, например, в ретроградной регуляции экспрессии генов в клетках растений [13, 14], а также, по-видимому, в передаче внутриклеточных и межклеточных сигналов, контролирующих экспрессию генов и активность антистрессовых систем [15].

Даже в отсутствие стресса АФК постоянно образуются в клетке как побочный продукт аэробного метаболизма в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и при β -окислении жирных кислот [15]. Клеточная антиоксидантная система может выводить токсичные АФК через аскорбат-глутатионовый путь (так называемый путь Asada–Halliwell) — основной путь антиоксидантной защиты, который обезвреживает в основном пероксид водорода и поддерживает сбалансированный окислительно-восстановительный статус растительных клеток. В стрессовых условиях увеличивается активность таких антиоксидантных ферментов, как супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), аскорбатпероксидаза (APX), глутатионпероксидаза (GPX), пероксидаза (POD), пероксиредоксин (PRX), монодегидроаскорбатредуктаза (MDHAR), дегидроаскорбатредуктаза (DHAR), глутатионредуктаза (GR) и глутатион-S-трансфераза [7, 15, 16]. Что же известно о том, как растения противостоят окислительному стрессу?

Одним из наиболее важных и изученных антистрессовых механизмов является биосинтез белков теплового шока (Heat shock protein, HSP) [17–20]. HSP — широко распространенные в прокариотических и эукариотических организмах белки, впервые были обнаружены в клетках в ответ на повышение температуры, но накопленные данные указывают на большое разнообразие ролей, которые HSP играют в растениях, что делает очень важным их всестороннее изучение. Прежде всего, HSP функционируют как шапероны и участвуют в рефолдинге денатурированных белков, сворачивании синтезированных полипептидов и солюбилизации агрегированных белков, деградации денатурированных белковых агрегатов [21, 22]. HSP играют важную роль в развитии растений и реакциях на различные стрессовые условия, включая засуху, солевой стресс, заражение патогенами и нападение насекомых [7]. Большое разнообразие функций, которые выполняют HSP в растениях, постоянно привлекает внимание исследователей. Следует отметить, что HSP и HSF у животных изучены лучше, чем у растений.

Экспрессия генов *HSP* регулируется в основном белками HSF. Активация генов *HSF* при стрессовом воздействии происходит с помощью многоэтапных процессов [15]. В настоящее время наблюдается рост публикаций, посвященных сложным взаимодействиям HSP и HSF, имеющим решающее

значение для устойчивости растений к стрессу. Получены новые данные о функционировании HSF. Оказалось, что HSF активируют транскрипцию не только генов *HSP*, но и генов других стрессовых белков, участвующих в защите растений от стресса, в том числе окислительного, например, антиоксидантных ферментов [12]. Очевидно, что активация и биосинтез сложной шаперонной системы (HSP), ликвидирующей токсичные продукты взаимодействия АФК с биополимерами, и повышение активности антиоксидантной системы клеточной защиты, снижающей внутриклеточные концентрации АФК, относятся к основным ответам на стресс и играют важную роль в акклиматизации растений и повышении их устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды.

В настоящем обзоре изложены современные представления о роли HSP, а также HSF в защите растений от окислительного стресса, индуцированного различными видами абиотических и биотических воздействий. Обсуждаются системы защиты растений с особым акцентом на роль HSP и HSF в реакции растений на стресс. Не обсуждаются вопросы, связанные с регуляцией активности HSF некодирующими РНК, которые требуют отдельного рассмотрения.

СЕМЕЙСТВА HSP РАСТЕНИЙ

Белки HSP играют решающую роль в защите клеточных структур растений и других организмов от стресса [5, 23]. HSP являются шаперонами, они отвечают за множество молекулярных функций, включая сворачивание, сборку, стабилизацию, мембранный транспорт и деградацию белков в нормальных условиях, а также в условиях стресса [5]. Представители разных семейств HSP растений активируются в ответ на жару, холод, засуху, засоление, световой стресс и другие виды стресса [21, 24–26].

Устойчивость организмов к окислительному стрессу в значительной степени определяется способностью молекулярных шаперонов поддерживать конформационный гомеостаз белков. Роль шаперонов в поддержании гомеостаза животных клеток и клеточной гибели хорошо изучена, но гораздо меньше известно об их функциях в клетках растений. В связи с этим остро необходимо изучение взаимодействия HSP/шаперонной системы и HSF в защите растений от окислительного стресса.

HSP найдены почти у всех организмов, от бактерий до грибов, растений и животных, включая человека. Известно несколько семейств HSP, классифицируемых на основе их молекулярной массы, которая колеблется в пределах 8–200 кДа. HSP обычно подразделяются на следующие семейства: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 HSP40 и

низкомолекулярные sHSP [7, 22, 27]. Особый интерес представляют sHSP, HSP70 и HSP90, поскольку представители именно этих семейств наиболее интенсивно синтезируются в условиях стресса. Ниже рассмотрены семейства HSP, представители которых важны для защиты от окислительного стресса и связаны с темой обзора.

Низкомолекулярные белки sHSP — древние белки, содержащие основной домен α -кристаллина со структурой β -сэндвича и разнообразные N-концевые домены. sHSP действуют как АТФ-независимые шапероны, связывающие денатурированные стрессом белки, для предотвращения их необратимой агрегации [20]. В стрессовых условиях, вызывающих повреждения белков, sHSP предотвращают необратимую агрегацию разворачивающихся белков, встраиваясь в образующиеся белковые агрегаты. Эти белковые комплексы впоследствии взаимодействуют с другими шаперонами, такими как ClpB/HSP104 и HSP70/HSP40, для реактивации денатурированных белков. Наиболее многочисленная группа sHSP обнаружена у высших растений (19–37 у *Arabidopsis*, риса и тополя), представители *Volvocales* содержат меньше этих белков (8 у *Chlamydomonas reinhardtii*, 7 у *Volvox carterii* и 6 у *Gonium pectorale*) [28]. Более сложная система HSP у растений, чем у животных может быть обусловлена “прикрепленным” образом жизни, который не позволяет уходить от стресса.

HSP70 — это шаперон, который наиболее универсально индуцируется в ответ на такие факторы стресса, как ультрафиолетовое и гамма-излучение, воздействие токсичных химических веществ. Шапероны HSP70 участвуют в широком спектре внутриклеточных функций: сворачивании вновь синтезированных белков, транслокации полипептидов в митохондрии, хлоропласты и эндоплазматический ретикулум, сборке и разборке белковых комплексов, регуляции активности белков. Кроме того, HSP70 кооперируется с другими клеточными шаперонными системами, включая HSP90, шаперонин HSP60, sHSP и HSP100 [29]. В условиях стресса активность HSP70 связана с предотвращением агрегации белков, солиubilизацией агрегированных белков, стимулированием повторного сворачивания неправильно свернутых или развернутых белков, взаимодействием с механизмами клеточной деградации, такими как система убиквитин-протеасома, для удаления aberrантных белков и белковых агрегатов [29].

Представители другого семейства шаперонов, HSP90, локализуются в цитозоле в отсутствие стресса. Основная функция HSP90 заключается в регуляции белкового метаболизма, обеспечении стабильности белка и участии во внутриклеточном транспорте белков. Обычно HSP90 действует в сочетании с другими шаперонами, такими как

HSP70 [27]. Несколько лет назад было установлено, что сверхэкспрессия гена *HSP90* в опухолевых клетках, представляет новую проблему при лечении онкологических заболеваний [27].

Когда растения подвергаются стрессу, синтез нормальных белков снижается, при этом повышается экспрессия генов стрессовых белков и, как следствие, запускается синтез HSP. Экспрессия генов *HSP* положительно регулирует активность антиоксидантных ферментов. Так, например, повышенная экспрессия небольшого HSP17.8 усиливала активность супероксид-дисмутазы (SOD) в клетках *Arabidopsis* [30], а сверхэкспрессия HSP16.9 повышала активность пероксидазы (POD), каталазы (CAT) и SOD в растениях табака [31].

HSP — плеiotропные белки, участвующие в различных биохимических процессах и выполняющие множество важных функций в клетках эукариот, а также способствующие повышению стрессоустойчивости растений. Предполагается, что HSP положительно влияют на термотолерантность растений, защищая структуру и активность белков, дезактивирующих АФК и снижающих их концентрацию в клетке [7, 15].

HSP КАК БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА РАСТЕНИЙ

Маркеры окислительного стресса важны для мониторинга токсического воздействия различных повреждающих факторов на растения. Выявление маркеров окислительного стресса находится в центре внимания многих исследователей, и во многих экспериментах найдены чувствительные к АФК гены белков, идентифицированных как биомаркеры. Синтез шаперонов индуцируется стрессом и зависит от стресса, таким образом, содержание HSP может быть полезным индикатором окислительного стресса и стрессовых реакций в различных организмах [5, 23]. В качестве биомаркеров используются представители разных семейств HSP [32, 33]. Особый интерес вызывают представители семейств sHSP и HSP70, так как часто они являются наиболее ранними и интенсивно синтезируемыми стрессовыми белками. Так, например, изучена возможность использования sHSP17.4C *Arabidopsis* в качестве молекулярного маркера окислительного стресса [5]. Участие АФК в индукции HSP17.4C показано в опытах, в которых растения обрабатывали пероксидом водорода. Установлено, что такая обработка повышала уровень экспрессии генов *HSP17.4C*. Эти результаты согласуются с данными, согласно которым экспрессия различных sHSP растений повышается в ответ на внешнее воздействие окислительного стресса [11]. Затем в опытах на мутантах *Arabidopsis* с дефицитом каталазы 2 обнаружили накопление эндогенного пероксида водорода, что приводило к значительной индук-

ции HSP17.4CI. Таким образом, получено прямое доказательство того, что биосинтез HSP17.4CI индуцируется АФК [5]. Быстрая индукция и высокая экспрессия *HSP17.4CI* при различных стрессовых состояниях, сопряженная с образованием АФК, предполагает, что этот ген может играть важную роль в снижении окислительного стресса, а HSP17.4CI можно использовать в качестве молекулярного маркера окислительного стресса у *Arabidopsis*. Получены данные, свидетельствующие о том, что экспрессия еще одного белка — HSP17.6C *Arabidopsis*, регулируется различными сигналами, которые связывают биотические и абиотические стрессы с АФК, и этот белок также может служить молекулярным маркером окислительного стресса [5].

Удачным примером использования белков семейства HSP70 в качестве маркеров окислительного стресса стал хлоропластный HSP70B [34–37]. Так, сравнили реакцию на тепловой стресс трех видов хлореллы, два из которых происходят из контрастных мест обитания — Антарктиды (*Chlorella vulgaris* — экстремофильная) и горячих источников в Болгарии (термофильный вид *Chlorella 8/1*). Третьим был мезофильный вид — *C. kesslerii* [34, 35]. Показано, что благодаря более высокому конститутивному уровню и хорошо заметному повышению биосинтеза HSP70B, вид *C. vulgaris* может выживать в экстремальных условиях Антарктиды. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что белки семейства HSP70 входят в число основных компонентов устойчивости к стрессам, а Hsp70B является хорошим ранним маркером индуцированного окислительного стресса и стрессового состояния клеток с изученным генотипом.

Таким образом, повышенную экспрессию генов *HSP* (например, *sHSP*, *HSP70B*) в стрессовых условиях можно использовать в качестве маркеров окислительного стресса. Конечно, невозможно охватить и интерпретировать огромную базу данных о биохимических маркерах, поэтому были выбраны наиболее характерные примеры. Для обнаружения надежных маркеров окислительного стресса необходимы дальнейшие исследования.

ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА (HSF) — ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ HSP

HSF представляют собой группу консервативных регуляторных белков, присутствующих в клетках всех про- и эукариот. За последние годы получено много новых данных о структуре и функциях HSF у растений [12, 24, 38]. Эти белки участвуют в регуляции реакций на стресс и биологических процессов в растениях. Растения отличаются более сложной реакцией на стресс, чем

дрожжи и животные. Так, например, у растений семейство HSF состоит из 18–52 членов, в то время как у дрожжей и дрозиды оно представлено единичными экземплярами, а у млекопитающих идентифицировано четыре HSF [12, 39]. Несмотря на значительные вариации в числе и последовательностях HSF, их структура и функции высоко консервативны у растений. К настоящему времени достигнут значительный прогресс в расшифровке сложной регуляторной сети HSF, функции ряда HSF охарактеризованы не только у модельного растения *Arabidopsis*, но и у некоторых других видов растений.

Факторы HSF являются активаторами транскрипции, регулирующими экспрессию генов *HSP* [24, 38], так HSF *Arabidopsis* контролируют транскрипцию более 200 генов, индуцируемых в ответ на тепловой стресс [40]. Растения одновременно подвергаются многим видам стресса, которые приводят к окислительному, или вторичному стрессу. HSF растений активируют транскрипцию не только в ответ на тепловой стресс, но и на многие другие стрессы окружающей среды, изменяя экспрессию большой группы генов, участвующих в поддержании клеточного гомеостаза, включая гены *HSP* [38, 41]. Изучение профилей экспрессии генов *HSF* у *Arabidopsis* и других видов растений (рис, ячмень, томаты, пшеница, кукуруза и соя) выявило заметные различия в их экспрессии в ответ на воздействие абиотического и биотического стресса [12, 24, 38, 42–46]. Так, например, изучение транскрипции 25 генов *HSF* риса показало, что на тепловой стресс отвечают 19 из них, на засуху, солевой и холодовой стрессы — 11, девять и семь генов соответственно [47]. Показано значительное перекрытие профилей транскрипции генов *HSP* и *HSF* при тепловом и других видах стресса, что свидетельствует о существенных перекрестных взаимодействиях в различных сигнальных сетях [24].

Структура и классы HSF

Основными структурными элементами белков HSF являются ДНК-связывающий домен, домен олигомеризации и домен активации транскрипции. N-концевой ДНК-связывающий домен фактора HSF узнает элементы теплового шока (Heat Shock Elements, HSE) в промоторных областях генов, регулируемых HSF [39]. Элементы HSE, содержащие палиндромную нуклеотидную последовательность (5'-nGAAnnTTTn-3'), служат для связывания TF. За ДНК-связывающим доменом следует олигомеризационный домен, отвечающий за белок-белковые взаимодействия и тримеризацию HSF при активации для инициации транскрипции. На C-конце находится домен, необходимый для активации транскрипции. Классификация растительных HSF (классы А, В и С)

основана на различиях в этих трех доменах [38], в частности, в домене олигомеризации. ДНК-связывающий домен наиболее консервативен, тогда как два других домена более вариабельны [48]. Факторы HSF классов А и С часто содержат дополнительные аминокислотные остатки (вставку) в домене олигомеризации, а в С-концевом домене HSF классов В и С отсутствуют мотивы активатора транскрипции [41, 49].

Класс HSFA — самый большой класс HSF, обнаруженный у большинства видов растений, включая *Arabidopsis*, рис (*Oryza sativa*) и тополь (*Populus trichocarpa*) [24, 25, 50]. Только HSF класса А способны к активации транскрипции, тогда как представители классов В и С не обладают активаторной функцией, поскольку в них отсутствует соответствующий мотив, содержащий кислые аминокислотные остатки [51]. HSF класса А необходимы для раннего ответа *Arabidopsis* на избыточную освещенность [12] и тепловой стресс [40]. Результаты генетического и функционального анализа позволяют рассматривать HSFA1 как центральный регулятор, необходимый на ранней стадии реакции растений на тепловой шок [52–54]. Интересно, что и HSFA1a, и HSFA1b важны в начальной стадии экспрессии генов, чувствительных к тепловому стрессу [55]. Факторы HSFA2, HSFA7 и HSFB *Arabidopsis* функционируют как основные положительные регуляторы экспрессии генов, индуцированных тепловым стрессом [56]. Факторы HSFA4a и HSFA8 действуют как сенсоры АФК, образующихся при тепловом стрессе [57].

В отличие от HSF класса А, факторы класса В действуют как коактиваторы или репрессоры экспрессии генов [58, 59]. Среди факторов класса В выявлены репрессоры транскрипции генов других HSF (например, HSFA2 и HSFA7) и HSP (например, HSP101 и HSP70) при тепловом стрессе [60]. Обнаружено, что HSF класса В способствуют толерантности к солевому стрессу, стимулируя биосинтез флавоноидов в растениях сои [59], и ингибируют транскрипцию у *Arabidopsis* [58]. Кроме того, факторы HSFB, являющиеся нижестоящими мишенями факторов HSFA1, взаимодействуют с HSFA1 и другими TF (например, HSFA7, HSFA2, MBF1C, NAC, WRKY), формируя регуляторную сеть, ответственную за экспрессию генов, чувствительных к тепловому стрессу, как показано на примере *Arabidopsis* и овсяницы высокой (*Festuca arundinacea*) [61, 62].

Функции и роль HSF класса С до сих пор изучены недостаточно. Считается, что представители семейства HSF класса С не обладают активаторной функцией [12], однако HSFC1b регулирует толерантность к солевому стрессу и участвует в гормональной реакции риса на абсцизовую кислоту [63]. HSF класса С распространены у пред-

ставителей класса однодольных растений [41]. Так, повышенная экспрессия гена *HSFC2a* пшеницы приводит к увеличению содержания HSP и других стрессовых белков, усиливая тем самым термотолерантность растений [60]. Сверхэкспрессия другого гена этого класса — *HSFC1b* (клонированного из овсяницы), в клетках *Arabidopsis* повышала их устойчивость к стрессу за счет увеличенной экспрессии генов *HSP* [61]. Кроме того, обнаружено, что гены *HSFC* пшеницы [64], капусты (*Brassica rapa*) [65] и сои (*Glycine max*) активируются тепловым стрессом [54].

HSF регулируют различные стрессовые ответы

Согласно современной модели стрессовой активации транскрипции, нативные HSF сохраняются в цитоплазме клеток в мономерной форме в комплексе с HSP70/HSP90 и кошаперонами. В условиях стресса поврежденные белки связывают HSP комплекса HSP70/HSP90, что приводит к освобождению HSF. Затем освободившиеся HSF образуют тримеры, которые перемещаются из цитоплазмы в ядро, где активируют экспрессию генов *HSP* и других генов ответа на стресс. Предполагается, что тепловой стресс активирует факторы HSF не непосредственно, а через АФК. Активация транскрипции в клетках растений отличается от активации в животных клетках [12]. У растений главным действующим TF (мастер-регулятором) является HSFA1, который образует неактивный комплекс с HSP70/HSP90. Фактор HSFA1 активирует транскрипцию не только генов *HSP*, но и ряда других генов, а также может контролировать другие факторы HSF [12] (рис. 1). Первые функции HSFA1 были описаны у растений томата и установлено, что этот фактор отвечает за устойчивость растений к тепловому стрессу (фактор регуляции термоустойчивости) [66]. Анализ трансгенных растений томата показал, что HSFA1 играет уникальную роль в качестве главного регулятора синтеза HSFA2 и HSFB1, а также HSP [66].

Тримеризация факторов HSF необходима для узнавания HSE-мотивов в промоторах целевых генов. Гомотримеры и гетеротримеры HSF обнаружены у разных видов растений. Так, фактор HSFA1 *Arabidopsis* образует гомо- и гетеротримеры в различных комбинациях [55, 67]. HSFA1, HSFA2 и HSFA3 участвуют в образовании гетеротримеров, что увеличивает активацию транскрипции и ведет к приобретению термоустойчивости [68]. HSF класса В могут образовывать гетеротримеры с HSF класса А. Показано, что различные комбинации HSF классов А и В позволяют успешно контролировать транскрипцию в клетках риса [69].

Чувствительные к стрессу HSF индуцируются фактором HSFA1 и рядом менее изученных TF.

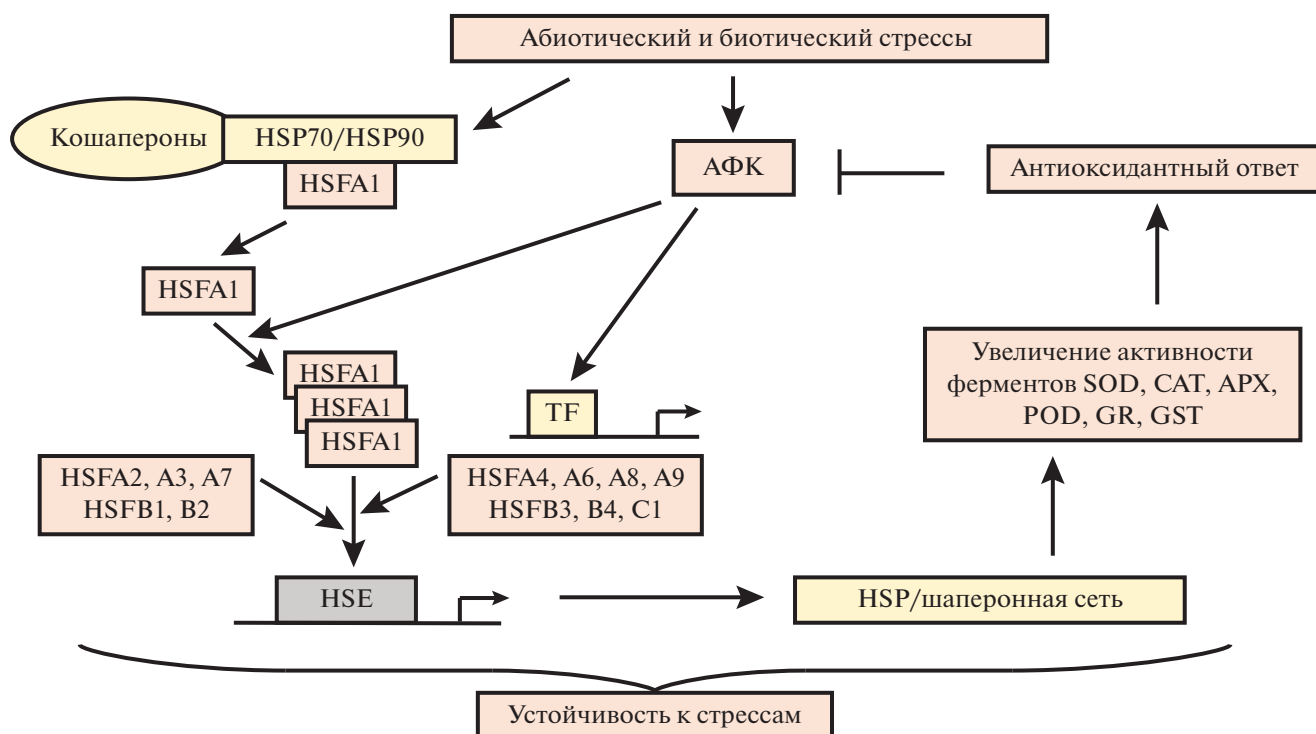


Рис. 1. Схема транскрипционной регуляции HSP, иллюстрирующая активацию HSF и их взаимодействие с другими путями противодействия абиотическому и биотическому стрессу у растений. Несколько генов *HSF*, индуцируемых стрессом (*HSFA2*, *A3*, *A7*, *B1* и *B2*), контролируются фактором HSFA1, тогда как гены *HSFA4A*, *A6*, *A8*, *B3*, *B4* и *C1* контролируются другими малоизученными транскрипционными факторами (TF). Тримеры HSFA1 связываются с мотивами HSE и активируют гены-мишени. APX (аскорбатпероксидаза), GST (глутатион-S-трансфераза), SOD (супероксид-дисмутаза), POD (пероксидаза), CAT (каталаза).

Роль фактора HSFA1 в активации транскрипции достаточно хорошо изучена [51], тогда как информация о влиянии других TF весьма малочисленна.

Обнаружено, что другие TF класса A (HSFA2 и HSFA3) усиливают ответы на тепловой и другие виды стресса. HSFA2 необходим для тепловой индукции генов, контролируемых HSFA1. Сверхэкспрессия генов *HSFA2* и *HSFA3* повышает генотипическую и приобретенную термотолерантность растений [70, 71]. Генетический анализ показал, что гены *HSFA2* и *HSFA3* контролируют ответ на тепловой стресс и пути их регуляции перекрываются [68].

Сверхэкспрессия факторов HSFA1, HSFA2, HSFA3 и HSFA4 увеличивает толерантность *Arabidopsis* не только к тепловому стрессу, но также и к другим видам стресса (засуха, высокая освещенность, солевой, осмотический и окислительный стрессы) [12, 72]. Некоторые факторы повышают устойчивость растений к нескольким видам стресса, например, HSFA2 — к высокой освещенности, тепловому, и окислительному стрессу [70], а HSFA4 — к тепловому и солевому стрессам [73]. Обнаружено, что факторы HSFA2 и HSFA4 ин-

дуцируются окислительным стрессом и участвуют в детекции пероксида водорода [11]. Мутации, инактивирующие гены этих факторов, снижают устойчивость растений к стрессирующим воздействиям [74]. Показано, что факторы HSF, за исключением HSFA1, выполняют специализированные функции и не всегда могут замещать друг друга в стрессовом ответе. HSF участвуют не только в индукции транскрипции генов *HSP*, но могут контролировать и гены других белков, участвующих в защите от стресса [12]. Например, фактор HSFA3 повышает устойчивость растений риса к засухе за счет увеличения содержания абсцизовой кислоты, полиаминов и антиоксидантной активности [75]. Различные HSF могут стимулировать синтез защитных метаболитов, таких как рафиноза, для повышения устойчивости к засухе [76] или флавоноидов для повышения устойчивости растений к солевому стрессу [59]. Таким образом, HSF растений усиливают транскрипцию широкого спектра генов, кодирующих индуцируемые стрессом белки, которые включают HSP и другие шапероны, TF, тушители АФК, ферменты, участвующие в защитных метаболических реакциях и биосинтезе осмолитов [38, 41, 71, 77, 78].

HSF и окислительный стресс

Механизм распознавания АФК белками HSF изучен недостаточно. Предполагают, что HSF реагируют на пероксид водорода, поскольку пероксид водорода может стабилизировать тримеры HSF с помощью обратимого окисления остатков Cys и образования связей Cys–Cys [42]. Обнаружено, что активность двух факторов – HSFA4A и HSFA8 – зависит от редокс-состояния цитоплазмы клеток [73, 74, 79]. Эти результаты позволили предположить, что HSFA4A и HSFA8 могут функционировать как цитоплазматические сенсоры пероксида водорода в стрессовых условиях [12, 57].

HSF различных видов растений могут индуцировать экспрессию некоторых генов антиоксидантных ферментов, таких как супероксид-дисмутаза, аскорбатпероксидаза, каталаза, или увеличивать содержание глутатиона [12, 74, 80, 81]. HSFA4A усиливает регуляцию других TF, связанных с защитой от окислительного стресса [74]. Показано, что HSFA2 регулирует экспрессию аскорбатпероксидазы 1 (APX1). Сверхэкспрессия *HSFA2* приводит к увеличению транскрипции *APX1*, в то время как у мутанта с поврежденным геном *HSFA2* снижен синтез этого фермента [15]. Полученные данные согласуются с тем, что в линиях *Arabidopsis* со сверхэкспрессией *APX1* повышена устойчивость к тепловому и окислительному стрессу [15]. Таким образом, АФК индуцируют экспрессию генов *HSF* и повышают устойчивость растений к тепловому стрессу. Детоксикация АФК уменьшает пулы пероксида водорода и, следовательно, запускается механизм обратной связи, регулирующий экспрессию *HSF* [15]. Перекрестные взаимодействия между окислительно-восстановительным контролем и регуляцией HSF могут отвечать за усиление перекрестной акклиматизации в различных стрессовых условиях [15, 82].

Регуляция активности HSF

Дополнительная регуляция активности *HSF* осуществляется в основном на уровне транскрипции (альтернативный сплайсинг) и с помощью посттрансляционных модификаций (фосфорилирование и сумоилирование). Так, например, две изоформы HSFA2 в растениях томата образовались путем альтернативного сплайсинга. Одна из них, HSFA2-II, контролирует ранний ответ на стресс, в то время как другая, HSFA2-I, регулирует акклиматизацию и термотолерантность [83]. Посттрансляционные модификации HSF влияют на активность, транспорт, локализацию и обмен белков. Различные митоген-активируемые протеинкиназы (MAP) опосредуют сигналы АФК и фосфорилируют многие растительные TF [84]. Так показано, что фосфорилирование HSFA2 *Arabidopsis* с помощью киназы MPK6 способство-

вало переносу TF в ядро и активации транскрипции во время теплового стресса [85].

Показано, что сумоилирование белков (конъюгация с малым убиквитинподобным модификатором SUMO) влияет на активность, стабильность и локализацию многих белков в эукариотических клетках. В клетках *Arabidopsis*, подвергнутых тепловому стрессу, выявлено несколько сумоилированных HSF, включая HSFA2, HSFB2B и HSFC1 [86]. Установлено, что сумоилирование фактора HSFA2 *Arabidopsis* снижало его способность активировать транскрипцию генов *HSP*. Таким образом, некоторые растительные HSF модифицируются путем фосфорилирования или сумоилирования, что снижает или повышает их активность. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выявить весь спектр модификаций HSF и охарактеризовать их влияние на активность этих белков.

HSF являются членами сложной многоуровневой регуляторной системы, которая координирует молекулярный ответ на изменения окружающей среды. По-видимому, появление большого числа генов *HSF* и многообразие их функций обусловлено эволюционной адаптацией растений к наземной жизни [12, 48]. В ходе эволюции произошла существенная диверсификация семейства генов *HSF*, необходимая для приобретения растениями устойчивости к многочисленным стрессам; в дальнейшем эти HSF интегрировались в разнообразные регуляторные пути [41].

Эпигенетическая регуляция

В последнее время уделяется большое внимание исследованиям системы эпигенетической регуляции ответа на тепловой стресс, которая включает метилирование ДНК, модификацию гистонов, ремоделирование хроматина и эпигенетическую память [60]. Метилирование ДНК участвует в регуляции генов, связанных с реакцией растений на тепловой шок [87]. Ацетилирование и метилирование гистонов опосредует реакцию растений на тепловой шок с помощью ингибирования или активации транскрипции генов [88]. АТР-зависимые комплексы ремоделирования хроматина также участвуют в реакции растений на тепловой шок [87].

Установлено, что растения “запоминают” стрессовые воздействия, что может улучшить их состояние при повторяющемся стрессе. Однако молекулярная основа этого явления изучена недостаточно. Недавно полученные результаты указывают на участие модификаций хроматина в поддержании приобретенной термотолерантности (памяти о тепловом стрессе) [89]. Память о тепловом стрессе связана с накоплением ди- и триметилирования лизина в четвертом положении гистона H3 (H3K4). Показано, что повышен-

Таблица 1. Число генов *HSP* и *HSF* в геноме некоторых видов высших растений

Вид (плоидность)	<i>HSF</i>	<i>sHSP</i>	<i>HSP60</i>	<i>HSP70</i>	<i>HSP90</i>	<i>HSP100</i>	Ссылка
<i>Arabidopsis thaliana</i> (2n)	21	19	18	18	7	7	[24]
<i>Lactuca sativa</i> (2n)	32	32	22	64	7	7	[94]
<i>Oryza sativa</i> (2n)	25	29	20	27	8	9	[25]
<i>Populus trichocarpa</i> (2n)	28	37	28	20	10	5	[50]
<i>Setaria italic</i> (2n)	—	37	20	27	9	20	[93]
<i>Triticum aestivum</i> (6n)	82	169	95	114	18	84	[95, 96]

ное метилирование H3K4 связано с гипериндукцией экспрессии гена-мишени при повторном стрессе. Эта транскрипционная память и устойчивое накопление метилирования H3K4 зависят от TF HSFA2, который необходим для запоминания теплового стресса у *Arabidopsis*. Эпигенетическая память улучшает адаптацию растений к различным стрессовым условиям [90]. Обнаружено, что фактор HSFA1 влияет на контролируемую HSFA2 память о стрессе [91]. Эти результаты показывают, что вместе с фактором HSFA1, HSFA2 является важным регулятором памяти о тепловом стрессе [92].

ПОЛНОГЕНОМНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЕМЕЙСТВ *HSP* И *HSF*

К настоящему времени всестороннее изучение семейств генов *HSP* и *HSF* в стрессовых условиях, а также при развитии и росте растений, проведено с помощью подробного биоинформатического анализа. Анализ полностью секвенированных геномов ряда растений позволил обнаружить все предполагаемые гены *HSP* и *HSF*, их дублирование и разнообразие, изучить структуру генов — выявить консервативные сайты, специфические мотивы, интроны, экзоны, сайты связывания с различными лигандами, а также провести филогенетический анализ и определить распределение генов *HSP* и *HSF* на хромосомах [24, 25, 50, 93, 94].

Хотя большинство фундаментальных исследований *HSP* и *HSF* выполнено на модельном растении *A. thaliana* [24], все больше информации накапливается о *HSP* и TF *HSF* у других видов растений. К настоящему времени охарактеризованы представители всех семейств *HSP* у таких видов, как *A. thaliana* [24], тополь (*P. trichocarpa*) [50], щетинник (*Setaria italica*) [93], салат латук (*Lactuca sativa*) [94], пшеница (*Triticum aestivum*) [95, 96] и рис (*O. sativa*) [25] (табл. 1).

Как следует из табл. 1, геном салата латук содержит 32 гена *HSF*, что больше, чем в диплоидных геномах других изученных растений: 21 у *Arabidopsis*, 28 у тополя и 25 у риса. Молекулярная масса *HSF* варьирует от 13 до 54 кДа, при этом сохраняется консервативность структуры этих регу-

ляторных белков (*HSF*), о чем свидетельствует, например, сохранение в генах семейства *HSF* латука от двух до пяти экзонов [94]. Обнаружено, что некоторые гены *HSF* латука не имеют ортологов в геноме *Arabidopsis*, тополя и риса. В геноме латука выявлены гены всех трех классов *HSF*: А (13), В (12) и С (7), при этом число генов классов В и С в геноме латука больше, чем в геноме *Arabidopsis*.

Исследование субклеточной локализации белков *sHSP* показало, что они находятся в цитоплазме, эндоплазматическом ретикулуме, пероксисомах, хлоропластах и митохондриях. Показано, что число генов *sHSP* варьирует от 22 до 37 у растений с одинаковым уровнем плоидности. Большинство генов *sHsp* не содержит интронов, однако в некоторых генах найдено два или три интрона [94]. Опубликовано большое число полногеномных идентификаций, выполненных для отдельных семейств *HSP*: *HSP70* сои (*Glycine max* L.) [50], *HSP20* огурца (*Cucumis sativus* L.) [97]. Это позволило Ну и соавт. [98] построить филогенетическое дерево членов семейства *HSP20* тыквы, показав на его примере, что в геноме идентифицировано в общей сложности 33 гена *HSP20*, распределенных по 13 хромосомам. Установлено, что тепловой стресс дифференцировано индуцирует экспрессию генов *HSP20*. Так, уровень транскриптов шести генов *HSP20* снижен при тепловом стрессе, в то время как уровни транскриптов 12 генов при этом повышены. Следует подчеркнуть, что гены *sHSP* с наибольшими изменениями экспрессии в ответ на тепловой стресс представляют большой практический интерес [95, 98].

Обнаружено, что число генов семейства *HSP70* у латука увеличилось более чем в 3 раза по сравнению с *Arabidopsis* и тополем и более чем в 2 раза по сравнению с рисом. Получены доказательства того, что увеличение количества *HSP70* латука является результатом тандемной дупликации. Предполагают, что значительный рост числа генов семейства *HSP70* связан с повышенной устойчивостью к стрессам окружающей среды. Таким образом, гены *HSP70* латука подверглись существенным перестройкам, которые привели к появлению новых представителей семейства *HSP70*, т.е. тан-

демная дупликация генов играет основную роль в увеличении разнообразия семейства HSP70. Тандемная дупликация генов *HSP70* обнаружена также у животных [99], мхов [100] и у высших растений [101, 102]. Например, тандемная дупликация способствовала увеличению числа генов *HSP70* в геноме картофеля (*Solanum tuberosum*) [101] и мха (*Physcomitrella patens*) [100]. Важно отметить, что различные организмы, у которых увеличено число генов семейства *HSP70*, обладают также повышенным разнообразием реакций на стресс [94]. Это согласуется с гипотезой о том, что гены *HSP70* — это генетические элементы, жизненно важные для ответа на абиотический стресс. Очевидно, что *HSP70* можно рассматривать как молекулярные регуляторы стрессовых реакций, поскольку они поддерживают гомеостаз белков [103].

Интересно отметить также значение белков семейства *HSP70* для фотосинтеза. Показано, что сверхэкспрессия генов *HSP70* обеспечивает фотозащиту и восстановление фотосистемы II при фотоингибировании, в то время как снижение содержания *HSP70* повышает чувствительность фотосинтезирующей зеленой водоросли *Ch. reinhardtii* к интенсивному свету [104].

В геноме растений семейство генов *HSP90* и *HSP100* представлено меньшим числом копий, чем *sHSP* и *HSP70*. Число генов высокомолекулярных белков теплового стресса *HSP90* и *HSP100* латука не увеличено по сравнению с *Arabidopsis*, рисом и тополем (табл. 1). Обнаружено, что 62% *HSP100* локализовано в хлоропластах, 26% в цитоплазме и 12% в митохондриях. Показано более разнообразная локализация *HSP90* в субклеточных компартаментах, включая ЭПР, ядро, цитоплазму и хлоропласты [94]. Обнаружено, что транскрипция наиболее изученных представителей семейств *HSP90* и *HSP100* латука не изменялась при действии УФ и светового стресса [94]. Аналогичные данные получены и для *Arabidopsis* [24].

Как следует из табл. 1, геном пшеницы *T. aestivum* L. содержит намного больше генов *HSP* и *HSF*: суммарно в нем идентифицировано 753 генов *HSP*, включая 169 *sHSP*, 273 *HSP40*, 95 *HSP60*, 114 *HSP70*, 18 *HSP90* и 84 *HSP100*. Более высокое содержание *HSP* у пшеницы по сравнению с другими видами растений, по-видимому, обусловлено высоким уровнем ploидности ($n = 6$) генома пшеницы [95]. В геноме пшеницы идентифицированы и охарактеризованы все шесть семейств *HSP*, а также тандемно дублированные гены и потенциальные псевдогены. Изучение профилей экспрессии генов *HSP* выявило роль *HSP* на различных стадиях развития и в стрессовых условиях. Так обнаружено, что *HSP40* и *HSP60* пшеницы сильнее индуцировались в ответ на биотический стресс, в то время как представители других се-

мейств *HSP* сильнее отвечали на абиотический стресс [95].

Филогенетический анализ генов *HSF* и *HSP* разных видов растений показал их тесную связь с ортологами модельного растения *Arabidopsis*. Интересно отметить, что большое число новых генов обнаружено также в семействах *HSF*, *sHSP* и *HSP70*, образовавшихся в результате тандемной дупликации. Показано, что гены *HSF*, *sHSP*, *HSP60* и *HSP70* проявляют высокую чувствительность к УФ и свету высокой интенсивности. Таким образом, очевидна роль сложной сети *HSP/HSF* в защите растений от окислительного стресса. Представители семейств генов *HSP/HSF* являются одними из основных генов, участвующих в формировании устойчивости растений к тепловому и другим видам стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растения выработали различные стратегии на морфологическом, анатомическом, физиологическом, фенологическом и молекулярном уровнях для преодоления стрессовых ситуаций. На молекулярном уровне растения реагируют на окислительный стресс с помощью регуляции транскрипции стрессовых белков, включая *HSP*. *HSP* предотвращают агрегацию белка и восстанавливают функциональную структуру поврежденных белков и клеточный гомеостаз в стрессовых ситуациях. Содержание большинства *HSP* повышается при различных биотических и абиотических стрессах, в то время как содержание некоторых из них снижается [94]. Более того, *HSP* в качестве шаперонов также играют роль в стабильности мембран [105], используют АФК в качестве сигнальной молекулы и снижают содержание АФК, повышая активность антиоксидантных ферментов [15, 106, 107].

Все *HSP* кодируются ядром и поступают не только в цитоплазму, но и в органеллы клеток. Нарушения фотосинтетического и дыхательного метаболизма при тепловом стрессе вызывают увеличение АФК и изменения окислительно-восстановительного статуса в хлоропластах и митохондриях, что активирует *HSP*-зависимые пути, системы поглощения АФК и ретроградную передачу сигналов [14, 108, 109]. Наиболее хорошо охарактеризованы *HSP* хлоропластов, связанные с транслокацией белков в органеллы, такие как *HSP93* (также обозначаемый ClpC), *HSP70* и *HSP90* [108]. Они участвуют в разворачивании и сворачивании белков-предшественников и действуют совместно с убиквитин-протеасомной системой при контроле качества белка. Импорт белков в хлоропласты также тесно связан с ретроградной передачей сигналов [14]. Показано, что два белка Hsc70-1 и *srHsc70-2* стабильно ассоциированы с транслоконом оболочки хлоропласта [108].

Факторы HSF первоначально были определены как регуляторы транскрипции генов *HSP*. Однако в последнее время получены доказательства, рассматривающие HSF в качестве основных компонентов цепей передачи сигнала при различных абиотических стрессах, отличных от теплового стресса, поэтому можно предположить, что HSF играют критически важную роль в координации и адаптации к множественным абиотическим стрессам [41, 51]. HSF растений входят в состав сложных, многоуровневых регуляторных систем, которые координируют клеточные молекулярные реакции на изменяющиеся условия окружающей среды, включая стрессовые воздействия. Предполагают, что увеличение числа генов *HSF* и их заметная функциональная диверсификация были последствиями адаптации растений к обитанию на суше в ходе эволюции [48].

АФК являются основными участниками стрессовых реакций, которые тесно взаимодействуют с HSF-зависимой регуляцией. Перекрестные взаимодействия между путями передачи сигналов HSF и АФК происходят на нескольких уровнях. Экспрессия большинства генов *HSF*, индуцированных стрессом, также регулируется АФК, а некоторые HSF, такие как *HSFA2* и *HSFA4A*, могут фосфорилироваться MAP-киназами, стимулированными АФК. Пероксид водорода может окислять остатки цистеина в белках HSF, стабилизирующих гомо- или гетеротримеры HSF. Факторы HSF (*HSFA4A* или *HSFA8*) могут опосредовать распознавание АФК и активировать транскрипцию [12, 48].

HSF индуцируют транскрипцию ряда генов-мишеней, таких как гены антиоксидантных ферментов и других TF, участвующих в окислительно-восстановительном контроле, что может уменьшать накопление АФК. Таким образом, активация детоксификации АФК снижает содержание АФК и окислительные повреждения клетки, что ослабляет сигналы АФК и приводит к регуляции по механизму обратной связи [15].

Тандемная дупликация генов, по-видимому, играет основную роль в увеличении разнообразия семейства генов *HSP70*, повышающего устойчивость растений, и согласуется с гипотезой о том, что *HSP70* является одним из основных компонентов устойчивости растений к стрессу. Предполагают, что разнообразие генов *HSF* у растений могло возникнуть в результате событий дупликации всего генома, которые имели место в ходе эволюции. Например, считается, что процесс аллополиплоидизации (полиплоидизация за счет соединения целых неродственных геномов) вносит значительный вклад в расширение семейств генов *HSF*, что исключительно важно для адаптации и выживаемости в различных условиях окружающей среды [110].

Чрезмерная экспрессия генов семейства *sHSP* и *HSP70* в стрессовых условиях, приводящая к избыточному содержанию HSP, может служить индикатором окислительного стресса и реакции организмов на стресс и использоваться в сельском хозяйстве, а также для оценки воздействия на окружающую среду.

Способность ослаблять повреждающие эффекты и сохранять клеточный гомеостаз растений, подвергающихся различным неблагоприятным воздействиям, делает некоторые HSP и HSF особенно привлекательными для повышения устойчивости к множественным или даже комбинированным стрессам [111]. Использование методов генетической инженерии и геномного редактирования позволило использовать HSF для повышения устойчивости растений к стрессовым условиям. Так, устойчивость к комбинациям различных видов стресса получена при сверхэкспрессии генов *HSFA2* [70] или *HSFA4A* [73]. Обсуждаются представители семейства HSF, перспективные для повышения устойчивости рапса (*B. napus*) к множественным стрессам [112]. Эти данные иллюстрируют важность и значение изучения HSP и HSF для практического использования. Однако необходимы дальнейшие исследования, которые позволят оценить полезность менее известных HSF для создания желаемых признаков у конкретных культур.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23 24 00486).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Del Río L.A. (2015) ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J. Exp. Bot.* **66**, 2827–2837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>
2. Xia X.J., Zhou Y.H., Shi K., Zhou J., Foyer C.H., Yu J.Q. (2015) Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **66**, 2839–2856. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv089>
3. Mittler R. (2017) ROS are good. *Trends Plant Sci.* **22**, 11–19. *Trends Plant Sci.* **22**, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
4. Caverzan A., Piasecki C., Chavarria G., Stewart C.N., Jr., Vargas L. (2019) Defenses against ROS in crops and weeds: the effects of interference and herbicides. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1086. <https://doi.org/10.3390/ijms20051086>
5. Sewelam N., Kazan K., Hüdig M., Maurino V.G., Schenk P.M. (2019) The *AtHSP17.4CI* gene expression is mediated by diverse signals that link biotic and

- abiotic stress factors with ROS and can be a useful molecular marker for oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3201.
<https://doi.org/10.3390/ijms20133201>
6. Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405–410.
[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9)
 7. Ul Haq S., Khan A., Ali M., Khattak A.M., Gai W.X., Zhang H.X., Wei A.M., Gong Z.H. (2019) Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5321.
<https://doi.org/10.3390/ijms20215321>
 8. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux P.M., Schöffl F. (2006) Heat stress induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **61**, 733–746.
<https://doi.org/10.1007/s11103-006-0045-4>
 9. Singh S.S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 909–930.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
 10. Katano K., Kohey Honda K., Suzuki N. (2018) Integration between ROS regulatory systems and other signals in the regulation of various types of heat responses in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3370.
<https://doi.org/10.3390/ijms19113370>
 11. Scarpeci T.E., Zanor M.I., Valle E.M. (2008) Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. *Plant Signal. Behav.* **3**, 856–857.
<https://doi.org/10.4161/psb.3.10.6021>
 12. Andrási N., Pettkó-Szandtner A., Szabados L. (2021) Diversity of plant heat shock factors: regulation, interactions, and functions. *J. Exp. Botany.* **72**, 1558–1575.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa576>
 13. Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* **35**, 259–270.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x>
 14. Юрина Н.П., Одинцова М.С. (2019) Петроградная сигнальная система хлоропластов. *Физиол. растений.* **66**, 243–255.
 15. Driedonks N., Xu J., Peters J.L., Park S., Rieu I. (2015) Multi-level interactions between heat shock factors, heat shock proteins, and the redox system regulate acclimation to heat. *Front. Plant Sci.* **6**, 999.
<https://doi.org/10.1134/S000629791510005310.3389/fpls.2015.00999>
 16. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Anee T.I., Parvin K., Nahar K., Mahmud J.A., Fujita M. (2019) Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants.* **8**, 384.
<https://doi.org/10.3390/antiox8090384>
 17. Li Z.Y., Long R.C., Zhang T.J., Yang Q.C., Kang J.M. (2016) Molecular cloning and characterization of the *MsHSP17.7* gene from *Medicago sativa* L. *Mol. Biol. Rep.* **43**, 815–826.
<https://doi.org/10.1007/s11033-016-4008-9>
 18. Muthusamy S.K., Dalal M., Chinnusamy V., Bansal K.C. (2017) Genome-wide identification and analysis of biotic and abiotic stress regulation of small heat shock protein (HSP20) family genes in bread wheat. *J. Plant Physiol.* **211**, 100–113.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.01.004>
 19. Liu J., Pang X., Cheng Y., Yin Y., Zhang Q., Su W., Hu B., Guo Q., Ha S., Zhang J. Wan H. (2018) The *Hsp70* gene family in *Solanum tuberosum*: genome-wide identification, phylogeny, and expression patterns. *Sci. Rep.* **8**, 16628.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34878-7>
 20. Waters E.R., Vierling E. (2020) Plant small heat shock proteins – evolutionary and functional diversity. *New Phytol.* **227**, 24–37.
<https://doi.org/10.1111/nph.16536>
 21. Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* **9**, 244–252.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>
 22. Al-Wahaibi M.H. (2011) Plant heat-shock proteins: a mini review. *J. King Saud Univ.-Science.* **23**(2), 139–150.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022>
 23. Chen B., Feder M.E., Kang L. (2018) Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress. *Mol. Ecol.* **27**, 3040–3054.
<https://doi.org/10.1134/S000629791510005310.1111/mec.14769>
 24. Swindell W.R., Huebner M., Weber A.P. (2007) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics.* **8**, 125.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-125>
 25. Hu W., Hu G., Han B. (2009) Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. *Plant Sci.* **176**, 583–590.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.01.016>
 26. Zhang J., Liu B., Li J., Zhang L., Wang Y., Zheng H., Lu M., Chen J. (2015) *Hsf* and *Hsp* gene families in *Populus*: genome-wide identification, organization and correlated expression during development and in stress responses. *BMC Genomics.* **16**, 181.
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1398-3>
 27. Dudrez L., Causse S., Bonan N., Dumetier B. (2020) Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair. *Oncogene.* **39**, 516–529.
<https://doi.org/10.1038/s41388-019-1016-y>
 28. Rutgers M., Muranaka L.S., Muhlhaus T., Sommer F., Thoms S., Schurig J., Willmund F., Schulz-Raffelt M., Schroda M. (2017) Substrates of the chloroplast small heat shock proteins 22E/F point to thermolability as a regulative switch for heat acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* **95**, 579–591.

- <https://doi.org/10.1134/S000629791510005310.1007/s11103-017-0672-y>
29. Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 665–680.
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>
 30. Jiang C., Xu J., Zhang H., Zhang X., Shi J., Li M., Ming F. (2009) A cytosolic class I small heat shock protein, RcHSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **32**, 1046–1059.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01987.x>
 31. Kong F., Deng Y., Wang G., Wang J., Liang X., Meng Q. (2014) LeCDJ1, a chloroplast DnaJ protein, facilitates heat tolerance in transgenic tomatoes. *J. Integr. Plant Biol.* **56**, 63–74.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12119>
 32. Song A., Zhu X., Chen F., Gao H., Jiang J., Chen S. (2014) A chrysanthemum heat shock protein confers tolerance to abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 5063–5078. doi.org/
<https://doi.org/10.3390/ijms15035063>
 33. Wang K., Zhang X., Goatley M., Ervin E. (2014) Heat shock proteins in relation to heat stress tolerance of creeping bentgrass at different N levels. *PLoS One.* **9**, 7. e102914.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102914>
 34. Chankova S., Yurina N. (2012) Micro-algae as a model system for studying of genotype resistance to oxidative stress and adaptive response. In: *Radiobiology and Environmental Security*. Eds Mothersill C.E., Korogodina V., Seymour C.B. Dordrecht: Springer, pp. 19–30.
 35. Chankova S., Mitrovska Z., Miteva D., Oleskina Y.P., Yurina N.P. (2013) Heat shock protein HSP70B as a marker for genotype resistance to environmental stress in *Chlorella* species from contrasting habitats. *Gene.* **516**, 184–189.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.11.052>
 36. Chankova S., Dimova E., Mitrovska Z., Miteva D., Mokerova D., Yonova P., Yurina N. (2014) Antioxidant and HSP70B responses in *Chlamydomonas reinhardtii* genotypes with different resistance to oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **101**, 131–137.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.015>
 37. Chankova S.G., Yurina N.P. (2016) Chloroplast heat shock protein 70B as marker of oxidative stress. In: *Heat Shock Proteins and Plants*. Eds Asea A., Kaur P., Calderwood S. Springer. **10**, 169–188.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-46340-7_9
 38. Fragkostefanakis S., Röth S., Schleiff E., Scharf K.-D. (2015) Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks: Hsfs and Hsps for improvement of crop thermotolerance. *Plant Cell Environ.* **38**, 1881–1895.
<https://doi.org/10.1111/pce.12396>
 39. Tian F., Hu X.-L., Yao T., Yang X., Chen J.-G., Lu M.-Z., Zhang J. (2021) Recent advances in the roles of HSFs and HSPs in heat stress response in woody plants. *Front. Plant Sci.* **12**, 704905.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.704905>
 40. Liu H., Charny Y. (2013) Common and distinct functions of *Arabidopsis* class A1 and A2 heat shock factors in diverse abiotic stress responses and development. *Plant Physiol.* **163**, 276–290.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.221168>
 41. Guo M., Liu J.-H., Ma X., Luo D.-X., Gong Z.-H., Lu M.-H. (2016) The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Front Plant Sci.* **7**, 114.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00114>
 42. Miller G., Mittler R. (2006) Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann. Botany.* **98**, 279–288.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcl107>
 43. Reddy P.S., Kavi Kishor P.B., Seiler C., Kuhlmann M., Eschen-Lippold L., Lee J., Reddy M.K., Sreenivasulu N. (2014) Unraveling regulation of the small heat shock proteins by the heat shock factor HvHsfB2c in barley: its implications in drought stress response and seed development. *PLoS One.* **9**, e89125.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089125>
 44. Yang Z., Wang Y., Gao Y., Zhou Y., Zhang E., Hu Y., Yuan Y., Liang G., Xu C. (2014) Adaptive evolution and divergent expression of heat stress transcription factors in grasses. *BMC Evol. Biol.* **14**, 147.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-147>
 45. Agarwal P., Khurana P. (2019) Functional characterization of HSFs from wheat in response to heat and other abiotic stress conditions. *Funct. Integrat. Genom.* **19**, 497–513.
<https://doi.org/10.1007/s10142-019-00666-3>
 46. Zhang H., Li G., Fu C., Duan S., Hu D., Guo X. (2020) Genome-wide identification, transcriptome analysis and alternative splicing events of *Hsf* family genes in maize. *Sci. Rep.* **10**, 8073.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65068-z>
 47. Jin G.H., Gho H.J., Jung K.H. (2013) A systematic view of rice heat shock transcription factor family using phylogenomic analysis. *J. Plant Physiol.* **170**, 321–329.
 48. Wang X., Shi X., Chen S., Ma C., Xu S. (2018) Evolutionary origin, gradual accumulation and functional divergence of heat shock factor gene family with plant evolution. *Front. Plant Sci.* **9**, 71.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00071>
 49. Lin Y.-X., Jiang H.-Y., Chu Z.-X., Tang X.-L., Zhu S.-W., Cheng B.-J. (2011) Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize. *BMC Genomics.* **12**, 76.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-76>
 50. Zhang L., Zhao H.-K., Dong Q.-L., Zhang Y.-Y., Wang Y.-M., Li H.-Y., Xing G.-J., Li Q.-Y., Dong Y.-S. (2015) Genome-wide analysis and expression profiling under heat and drought treatments of *HSP70* gene family in soybean (*Glycine max* L.). *Front. Plant Sci.* **6**, 773.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00773>

51. Scharf K.D., Berberich T., Ebersberger I., Nover L. (2012) The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochim. Biophys. Acta*. **1819**, 104–119.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.002>
52. Zhu J.-K. (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*. **167**, 313–324.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
53. Rejeb I., Pastor V., Mauch-Mani B. (2014) Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants*. **3**, 458–475.
<https://doi.org/10.3390/plants3040458>
54. Li P.S., Yu T.F., He G.H., Chen M., Zhou Y.B., Chai S.C., Xu Z.S., Ma Y.Z. (2014) Genome-wide analysis of the Hsf family in soybean and functional identification of GmHsf-34 involvement in drought and heat stresses. *BMC Genomics*. **15**, 1009.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1009>
55. Li M., Doll J., Weckermann K., Oecking C., Berndzen K.W., Schöffl F. (2010) Detection of *in vivo* interactions between *Arabidopsis* class A-HSFs, using a novel BiFC fragment, and identification of novel class B-HSF interacting proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 126–132.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.10.012>
56. Albihl W.S., Obomighie I., Blein T., Persad R., Cherenukhin I., Crespi M., Bechtold U., Mullineaux P.M. (2018) *Arabidopsis* heat shock transcription factor A1b regulates multiple developmental genes under benign and stress conditions. *J. Exp. Bot.* **69**, 2847–2862.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery142>
57. Qu A.L., Ding Y.F., Jiang Q., Zhu C. (2013) Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 203–207.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.104>
58. Ikeda M., Mitsuda N., Ohme-Takagi M. (2011) *Arabidopsis* HsfB1 and HsfB2b act as repressors of the expression of heat-inducible Hsfs but positively regulate the acquired thermotolerance. *Plant Physiol.* **157**, 1243–1254.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.179036>
59. Bian X., Li W., Niu C., Wei W., Hu Y., Han J.-Q., Lu X., Tao J.-J., Jin M., Qin H., Zhou B., Wan-Ke Zhang W.-R., Ma B., Wang G.-D., Yu D.-Y., Lai Y.-C., Chen S.-Y., Zhang J.-S. (2020) A class B heat shock factor selected for during soybean domestication contributes to salt tolerance by promoting flavonoid biosynthesis. *New Phytol.* **225**, 268–283.
<https://doi.org/10.1111/nph.16104>
60. Zhao J., Lu Z., Wang L., Jin B. (2021) Plant responses to heat stress: physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 117.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010117>
61. Zhuang L., Cao W., Wang J., Yu J., Yang Z., Huang B. (2018) Characterization and functional analysis of FaHsfC1b from *Festuca arundinacea* conferring heat tolerance in *Arabidopsis*. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2702.
<https://doi.org/10.3390/ijms19092702>
62. Ding Y.L., Shi Y.T., Yang S.H. (2020) Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures. *Mol. Plant*. **13**, 544–564.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.004>
63. Schmidt R., Schippers J.H.M., Welker A., Mieulet D., Guiderdoni E., Mueller-Roeber B. (2012) Transcription factor OsHsfC1b regulates salt tolerance and development in *Oryza sativa* ssp. japonica. *AoB PLANTS*. pls011.
<https://doi.org/10.1093/aobpla/pls011>
64. Xue G.P., Sadat S., Drenth J., McIntyre C.L. (2014) The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes. *J. Exp. Bot.* **65**, 539–557.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert399>
65. Huang X.Y., Tao P., Li B.Y., Wang W.H., Yue Z.C., Lei J.L., Zhong X.M. (2015) Genome-wide identification, classification, and analysis of heat shock transcription factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa pekinensis*). *Genet. Mol. Res.* **14**, 2189–2204.
<https://doi.org/10.4238/2015>
66. Mishra S.K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L., Scharf K.D. (2002) In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Develop.* **16**, 1555–1567.
<https://doi.org/10.1101/gad.228802>
67. Yoshida T., Ohama N., Nakajima J., Kidokoro S., Mizoi J., Nakashima K., Maruyama K., Kim J.-M., Seki M., Todaka D., Osakabe Y., Sakuma Y., Schöffl F., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2011) *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock responsive gene expression. *Mol. Genet. Genom.* **286**, 321–332.
<https://doi.org/10.1007/s00438-011-0647-7>
68. Li X.D., Wang X.L., Cai Y.M., Wu J.H., Mo B.T., Yu E.R. (2017) *Arabidopsis* heat stress transcription factors A2 (HSFA2) and A3 (HSFA3) function in the same heat regulation pathway. *Acta Physiol. Plantarum*. **39**, 39–67.
<https://doi.org/10.1007/s11738-017-2351-7>
69. Singh A., Mittal D., Lavania D., Agarwal M., Mishra R.C., Grover A. (2012) OsHsfA2c and OsHsfB4b are involved in the transcriptional regulation of cytoplasmic *OsClpB* (Hsp100) gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Cell Stress Chaperones*. **17**, 243–254.
<https://doi.org/10.1007/s12192-011-0303-5>
70. Nishizawa A., Yabuta Y., Yoshida E., Maruta T., Yoshimura K., Shigeoka S. (2006) *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J.* **48**, 535–547.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02889.x>
71. Yoshida T., Sakuma Y., Todaka D., Maruyama K., Qin F., Mizoi J., Kidokoro S., Fujita Y., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2008) Functional analysis of an *Arabidopsis* heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of

- the DREB2A stress-regulatory system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 515–521.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.134>
72. Huang H.Y., Chang K.Y., Wu S.J. (2018) High irradiance sensitive phenotype of *Arabidopsis* hit2/xpo1a mutant is caused in part by nuclear confinement of AtHsfA4a. *Biol. Plantarum.* **62**, 69–79.
<https://doi.org/10.1007/s10535-017-0753-4>
 73. András N., Rigó G., Zsigmond L., Pérez-Salamó I., Papdi C., Klement E., Pettkó-Szandtner A., Baba A.I., Ayaydin F., Dasari R., Cséplő A., Szabados L. (2019) The mitogen-activated protein kinase 4-phosphorylated heat shock factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses. *J. Exp. Botany.* **70**, 4903–4918.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz217>
 74. Pérez-Salamó I., Papdi C., Rigó G., Zsigmond L., Vilela B., Lumbreras V., Nagy I., Horváth B., Domoki M., Darula Z., Medzihradsky K., Bögre L., Koncz C., Szabados L. (2014) The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogenactivated protein kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiol.* **165**, 319–334.
<https://doi.org/10.1104/pp.114.237891>
 75. Zhu M.D., Zhang M., Gao D.J., Zhou K., Tang S.J., Zhou B., Lv Y.M. (2020) Rice *OsHSFA3* gene improves drought tolerance by modulating polyamine biosynthesis depending on abscisic acid and ROS levels. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1857.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051857>
 76. Lang S., Liu X., Xue H., Li X., Wang X. (2017) Functional characterization of BnHSFA4a as a heat shock transcription factor in controlling the re-establishment of desiccation tolerance in seeds. *J. Exp. Botany.* **68**, 2361–2375.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx097>
 77. Busch W., Wunderlich M., Schöffl F. (2005) Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **41**, 1–14.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02272.x>
 78. Schramm F., Ganguli A., Kiehlmann E., Englich G., Walch D., von Koskull-Döring P. (2006) The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **60**, 759–772.
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-5750-x>
 79. Giesguth M., Sahm A., Simon S., Dietz K.J. (2015) Redox-dependent translocation of the heat shock transcription factor AtHSFA8 from the cytosol to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **589**, 718–725.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.01.039>
 80. Li H.C., Zhang H.N., Li G.L., Liu Z.H., Zhang Y.M., Zhang H.M., Guo X.L. (2015) Expression of maize heat shock transcription factor gene *ZmHsf06* enhances the thermotolerance and drought-stress tolerance of transgenic *Arabidopsis*. *Funct. Plant Biol.* **42**, 1080–1091.
<https://doi.org/10.1071/FP15080>
 81. Chen S., Yu M., Li H., Wang H., Lu Z., Zhang Y., Liu M. et al. (2020) SaHsfA4c from *Sedum alfredii* Hance enhances cadmium tolerance by regulating ROS-scavenger activities and heat shock proteins expression. *Front. Plant Sci.* **11**, 142.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00142>
 82. Banti V., Loreti E., Novi G., Santaniello A., Alpi A., Perata P. (2008) Heat acclimation and cross-tolerance against anoxia in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* **31**, 1029–1037.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01816.x>
 83. Hu Y., Mesihovic A., Jiménez-Gómez J.M., Röth S., Gebhardt P., Bublak D., Bovy A., Scharf K.D., Schleiff E., Fragkostefanakis S. (2020) Natural variation in HsfA2 pre-mRNA splicing is associated with changes in thermotolerance during tomato domestication. *New Phytologist.* **225**, 1297–1310.
<https://doi.org/10.1111/nph.16221>
 84. Bigeard J., Hirt H. (2018) Nuclear signaling of plant MAPKs. *Front. Plant Sci.* **9**, 469.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00469>
 85. Evrard A., Kumar M., Lecourieux D., Lucks J., von Koskull-Döring P., Hirt H. (2013) Regulation of the heat stress response in *Arabidopsis* by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *Peer J.* **1**, e59.
<https://doi.org/10.7717/peerj.59>
 86. Rytz T.C., Miller M.J., McLoughlin F., Augustine R.C., Marshall R.S., Juan Y.T., Charng Y.Y., Scalf M., Smith L.M., Vierstra R.D. (2018) SUMOylome profiling reveals a diverse array of nuclear targets modified by the SUMO ligase SIZ1 during heat stress. *Plant Cell.* **30**, 1077–1099.
<https://doi.org/10.1105/tpc.17.00993>
 87. Liu J., Feng L., Li J., He Z. (2015) Genetic and epigenetic control of plant heat responses. *Front. Plant Sci.* **6**, 267.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00267>
 88. Xu Y., Zhang S., Lin S., Guo Y., Deng W., Zhang Y., Xue Y. (2017) WERAM: a database of writers, erasers and readers of histone acetylation and methylation in eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **45**, D264–D270.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1011>
 89. Lämke J., Brzezinka K., Altmann S., Bäurle I. (2016) A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *EMBO J.* **35**, 162–175.
<https://doi.org/10.15252/embj.201592593>
 90. He Y., Li Z. (2018) Epigenetic environmental memories in plants: establishment, maintenance, and reprogramming. *Trends Genet.* **34**, 856–866.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.07.006>
 91. Liu H.C., Lämke J., Lin S.Y., Hung M.J., Liu K.M., Charng Y.Y., Bäurle I. (2018) Distinct heat shock factors and chromatin modifications mediate the organautonomous transcriptional memory of heat stress. *Plant J.* **95**, 401–413.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13958>

92. Stief A., Brzezinka K., Lämke J., Bäurle I. (2014) Epigenetic responses to heat stress at different time scales and the involvement of small RNAs. *Plant Signal. Behav.* **9**, e970430.
<https://doi.org/10.4161/15592316.2014.970430>
93. Singh R.K., Jaishankar J., Muthamilarasan M., Shweta S., Dangi A., Prasad M. (2016) Genome-wide analysis of heat shock proteins in C4 model, foxtail millet identifies potential candidates for crop improvement under abiotic stress. *Sci. Rep.* **6**, 32641,
<https://doi.org/10.1038/srep32641>
94. Kim T., Samraj S., Jiménez J., Gómez C., Liu T., Begcy K. (2021) Genome-wide identification of heat shock factors and heat shock proteins in response to UV and high intensity light stress in lettuce. *BMC Plant Biol.* **17**, 185.
<https://doi.org/10.1186/s12870-021-02959-x>
95. Kumar A., Sharma S., Chunduri V., Kaur A., Kaur S., Malhotra N., Kumar A., Kapoor P., Kumari A., Kaur J., Sonah H., Garg M. (2020) Genome-wide identification and characterization of heat shock protein family reveals role in and stress conditions in *Triticum aestivum* L. *Sci. Repts.* **10**, 7858.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64746-2>
96. Duan S., Liu B., Zhang Y., Li G., Guo X. (2019) Genome-wide identification and abiotic stress-responsive pattern of heat shock transcription factor family in *Triticum aestivum* L. *BMC Genomics.* **20**, 257.
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5617-1>
97. Huang J., Hai Z., Wang R., Yu Y., Chen X., Liang W., Wang H. (2022) Genome-wide analysis of *HSP20* gene family and expression patterns under heat stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Front. Plant. Sci.* **13**, 968418.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.968418>
98. Hu Y., Zhang T., Liu Y., Li Y., Wang M., Zhu B., Liao D., Yun T., Huang W., Wen Zhang W., Yang Zhou Y. (2021) Pumpkin (*Cucurbita moschata*) *HSP20* gene family identification and expression under heat stress. *Front. Genet.* **12**, 753953.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915100053>
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.753953>
99. Metzger D.C.H., Hemmer-Hansen J., Schulte P.M. (2016) Conserved structure and expression of Hsp70 paralogs in teleost fishes. *Compar. Biochem. Physiol. D Genom. Proteomics.* **18**, 10–20.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.01.007>
100. Tang T., Yu A., Li P., Yang H., Liu G., Liu L. (2016) Sequence analysis of the Hsp70 family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses. *Sci. Rep.* **6**, 33650.
<https://doi.org/10.1038/srep33650>
101. Liu J., Wang R., Liu W., Zhang H., Guo Y., Wen R. (2018) Genome-wide characterization of heat-shock protein 70s from *Chenopodium quinoa* and expression analyses of Cqhsp70s in response to drought stress. *Genes (Basel).* **9**, 35.
<https://doi.org/10.3390/genes9020035>
102. Su H., Xing M., Liu X., Fang Z., Yang L., Zhuang M., Zhang Y., Wang Y., Lv H. (2019) Genome-wide analysis of HSP70 family genes in cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) reveals their involvement in floral development. *BMC Genomics.* **20**, 369.
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5757-3>
103. Rowarth N.M., Dauphinee A.N., Denbigh G.L., Gunawardena A.H. (2020) Hsp70 plays a role in programmed cell death during the remodelling of leaves of the lace plant (*Aponogeton madagascariensis*). *J. Exp. Botany.* **71**, 907–918.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz447>
104. Schroda M., Vallon O., Wollman F.-A., Beck C.F. (1999) A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell.* **11**, 1165–1178.
<https://doi.org/10.1105/tpc.11.6.1165>
105. Chen Y., Chen X., Wang H., Bao Y., Zhang W. (2014) Examination of the leaf proteome during flooding stress and the induction of programmed cell death in maize. *Proteome Sci.* **12**, 33.
<https://doi.org/10.1186/1477-5956-12-33>
106. Yu L., Wang W., Zeng S., Chen Z., Yang A., Shi J., Zhao X., Song B. (2018) Label-free quantitative proteomics analysis of cytosinepeptidomycin responses in Southern rice black-streaked dwarf virus-infected rice. *Pestic. Biochem. Physiol.* **147**, 20–26.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.06.005>
107. Lavania D., Dhingra A., Siddiqui M.H., Al-Whaihi M.H., Grover A. (2015) Current status of the production of high temperature tolerant transgenic crops for cultivation in Warmer Climates. *Plant Physiol. Biochem.* **86**, 100–108.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.11.019>
108. Rochaix J.-D. (2022) Chloroplast protein import machinery and quality control. *FEBS J.* **289**, 6908–6918.
<https://doi.org/10.1111/febs.16464>
109. Suzuki N. (2023) Fine tuning of ROS, redox and energy regulatory systems associated with the functions of chloroplasts and mitochondria in plants under heat stress. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 1356.
<https://doi.org/10.3390/ijms24021356>
110. Zhu X., Huang C., Zhang L., Liu H., Yu J., Hu Z., Hua W. (2017) Systematic analysis of HsF family genes in the *Brassica napus* genome reveals novel responses to heat, drought and high CO₂ stresses. *Front. Plant Sci.* **8**, 1174.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01174>
111. Mishra D., Shekhar S., Singh D., Chakraborty S., Chakrabort N. (2018) Heat shock proteins and abiotic stress tolerance in plants. In: *Regulation of Heat Shock Protein Responses, Heat Shock Proteins.* **13**, 41–69.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-74715-6_3
112. Lohani N., Jain D., Singh M.B., Bhalla P.L. (2020) Engineering multiple abiotic stress tolerance in canola, *Brassica napus*. *Front. Plant Sci.* **11**, 3.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00003>

The Role of Heat Shock Proteins in Plant Protection from Oxidative Stress

N. P. Yurina*

Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

**e-mail: nyurina@inbi.ras.ru*

The review considers the recent progress on the role of heat shock proteins (HSPs), as well as transcription factors of heat shock proteins (HSFs) in protecting plants from oxidative stress induced by various types of abiotic and biotic stresses. HSPs are pleiotropic proteins involved in various intracellular processes and performing many important functions. In particular, HSPs increase plant resistance to stress by protecting the structure and activity of proteins of the antioxidant system. Overexpression of *Hsps* genes under stressful conditions, leading to an increased content of HSP, can be used as a marker of oxidative stress. Plant HSFs are encoded by large gene families with variable sequences, expression and function. Plant HSFs regulate transcription of a wide range of stress-induced genes, including HSPs and other chaperones, reactive oxygen species scavengers, enzymes involved in protective metabolic reactions and osmolytic biosynthesis, or other transcriptional factors. Genome-wide analysis of *Arabidopsis*, rice, poplar, lettuce and wheat revealed a complex network of interaction between *Hsps* and *Hsfs* gene families that form plant protection against oxidative stress. Plant protection systems are discussed, with special emphasis on the role of HSPs and HSFs in plant response to stress, which will be useful for the development of technologies to increase productivity and stress resistance of plant crops.

Keywords: oxidative stress, reactive oxygen species (ROS), heat shock proteins (HSPs), transcription factors of heat shock proteins (HSFs), antioxidant enzymes

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ

УДК 579.842.11:579.22

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ СИСТЕМ *Escherichia coli* ПРИ ФОСФАТНОМ ГОЛОДАНИИ

© 2023 г. Г. В. Смирнова^а, А. В. Тюленев^а, Н. Г. Музыка^а,
Л. В. Сутормина^а, О. Н. Октябрьский^{а, *}

^аИнститут экологии и генетики микроорганизмов, “Пермский федеральный исследовательский центр”
Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, 614081 Россия

*e-mail: oktyabr@iegm.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 02.06.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

Изучены изменения активности антиоксидантных систем у бактерий *Escherichia coli* при фосфатном голодании. Показано, что голодание сопровождалось снижением интенсивности дыхания, увеличением скорости продукции супероксида и падением уровня АТР. Одновременно наблюдалось снижение H_2O_2 в среде и значительное увеличение экспрессии генов *katG* и *katE*, кодирующих соответственно каталазы HPI и HPII. В то же время не отмечено падения мембранного потенциала, что может свидетельствовать о сохранении нормальной активности мембран в голодающих клетках. Впервые показано, что переход *E. coli* к голоданию по фосфату сопровождается значительными изменениями статуса глутатиона. Наиболее важные из них связаны со снижением уровня восстановленного глутатиона (GSH) в среде и с одновременным увеличением его содержания в цитоплазме, а также сдвигом соотношения восстановленный/окисленный глутатион в цитоплазме ($GSH_{in}/GSSG_{in}$) в сторону редуктивных значений, а в культуральной среде ($GSH_{out}/GSSG_{out}$) — в сторону окислительных значений. Среди используемых в работе мутантов выделялся двойной мутант *gor trxB*, дефицитный по синтезу глутатионредуктазы и тиоредоксинредуктазы. По сравнению с родительским штаммом этот мутант показывал многократно более высокую экспрессию *katG::lacZ*, наибольший уровень окисленного внутри- и внеклеточного глутатиона и соответственно самое низкое соотношение GSH/GSSG в обоих компартментах. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что при фосфатном голодании взаимодействие редокс-системы глутатиона и регулонов, контролирующей защиту от активных форм кислорода (АФК), создает условия, позволяющие поддерживать концентрацию последних ниже токсического уровня. В результате голодающие по фосфату клетки *E. coli* могут длительное время сохранять высокую жизнеспособность, позволяющую им быстро возобновлять рост после добавления фосфата.

Ключевые слова: антиоксидантная система, *Escherichia coli*, фосфатное голодание

DOI: 10.31857/S0026898423060198, **EDN:** QKQOQF

В естественной среде обитания бактерии сталкиваются с различными стрессами, в том числе вызванными истощением основных субстратов. Большинство стрессов сопровождается торможением роста, поэтому клетки располагают универсальными механизмами для борьбы с негативными последствиями резкого замедления обменных процессов. Эти последствия могут включать увеличение продукции активных форм кислорода (АФК), таких как анион супероксида (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал

($HO^\bullet$), которые могут повредить ДНК, белки и клеточные мембраны. Во избежание повреждающего действия возможного окислительного стресса, клетки стремятся поддерживать АФК на безопасном уровне. Бактерии обладают набором ферментов, нейтрализующих АФК и восстанавливающих поврежденные макромолекулы, а также сенсоров и сигнальных путей, воспринимающих изменения редокс-состояния и активирующих механизмы его гомеостаза [1].

Escherichia coli содержит три супероксиддисмутазы (SOD): цитоплазматические MnSOD (*sodA*) и Fe-SOD (*sodB*) и периплазматическую Cu-Zn-SOD (*sodC*). К основным ферментам, удаляющим H_2O_2 *in vivo*, относятся алкилгидропероксидредуктаза Ahp (*ahpCF*) и каталазы HPI (*katG*) и HPII

Сокращения. АФК — активные формы кислорода; GSH (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) — восстановленная форма глутатиона; GSSG — окисленная форма глутатиона; in/out — в цитоплазме/в культуральной среде; SOD (superoxide dismutase) — супероксиддисмутаза.

(*katE*), экспрессия генов которых находится под контролем транскрипционных регуляторов OxyR и RpoS [2].

Кроме того, в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза участвуют низкомолекулярные тиолы. Цитозоль *E. coli* содержит две основные редокс-системы на основе тиолов, функции которых значительно перекрываются: систему глутатион-глутаредоксины и тиоредоксиновую систему [3, 4]. Глутатион представляет собой главный тиоловый окислительно-восстановительный буфер. В цитоплазме глутатион находится преимущественно в восстановленном состоянии и его внутриклеточная концентрация составляет приблизительно 5 мМ. Окисленный глутатион (GSSG) восстанавливается глутатионредуктазой (GOR), которая кодируется геном *gor* и входит в состав регулона OxyR [3]. При экспоненциальном росте в аэробных условиях глутатион может накапливаться в среде на микромолярном уровне и подвергаться непрерывной трансмембранной циркуляции [5].

Тиоредоксиновая система *E. coli* состоит из двух тиоредоксинов (Trx1 и Trx2), кодируемых генами *trxA* и *trxC*, и тиоредоксинредуктазы (TrxR), кодируемой геном *trxB* [3, 4, 6]. *E. coli* содержит также три глутаредоксина (Grx1, Grx2 и Grx3), кодируемых генами *grxA*, *grxB* и *grxC* соответственно, и два глутаредоксиноподобных белка Grx4 (*grxD*) и NrdH (*nrdH*). Окисленные глутаредоксины, за исключением Grx4 и NrdH, неферментативно восстанавливаются глутатионом [4, 6].

Одна из стрессовых ситуаций, которая потенциально может сопровождаться нарушением редокс-гомеостаза и продукцией АФК, — голодание по фосфату (P_i). Фосфат необходим клеткам всех живых организмов для структурных и энергетических целей. В естественных условиях содержание фосфата может изменяться в значительном диапазоне — вплоть до его полного отсутствия. Когда фосфат отсутствует в среде, *E. coli* активирует адаптивный ответ, который включает синтез нескольких десятков белков, часть из которых входит в регулон Pho, представляющий глобальную регуляторную сеть, взаимодействующую с биосинтезом полифосфатов, RpoS и ppGpp [7, 8]. Протеомный анализ показал, что общий ответ *E. coli* на голодание по фосфату может включать до 400 генов, составляющих почти 10% генома этой бактерии [9].

Ранее были представлены доказательства того, что клетки *E. coli*, растущие на среде MOPS с глюкозой и шестью аминокислотами, поддерживают активный метаболизм в течение примерно 3 суток голодания по фосфату. Отмечено, что голодающие по фосфату клетки утилизируют не только глюкозу, но и присутствующие в питательной среде аминокислоты, продуцируя такие метаболиты, как путресцин и спермидин, которые принимают участие в защите нуклеиновых кислот от окислительного повреждения [10–12].

На основании экспериментов с мутантами было предположено, что регулоны RpoS и LexA, а также белок H-NS важны для сохранения жизнеспособности бактерий [10]. Известно, что экспрессия *katG* и *katE* возрастает при вступлении *E. coli* в стационарную фазу [2]. Учитывая, что фосфатное голодание вызывает остановку роста бактерий и переход в стационарную фазу, логично было ожидать индукции KatG и KatE в таких клетках. Однако R. VanBogelen и соавт. [9] не обнаружили индукции этих каталаз в ответ на голодание *E. coli* по фосфату. А Р. Moreau и соавт. [11] обнаружили, что дефицит по синтезу алкилгидропероксидредуктазы (Ahp) и каталазы HPI (KatG) значительно снижал выживаемость голодающих по фосфату клеток, однако инактивация генов *oxyR* и *rpoS* оказывала лишь небольшой эффект на выживаемость. О продукции АФК авторы судили косвенно, измеряя концентрации соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Этот метод часто критикуют за недостаточную специфичность.

В экспериментах с другой бактерией, *Sinorhizobium meliloti*, показано, что фосфатное голодание стимулировало в клетках экспрессию гена H₂O₂-индуцибельной каталазы (*kataA*). Обнаружено, что для транскрипции гена *kataA* был необходим регулятор PhoB, а инициация происходила на промоторе, отличном от OxyR-зависимого — активирующего транскрипцию *kataA* в ответ на добавление H₂O₂ [13]. Подобный эффект авторы наблюдали и для голодающих по фосфату клеток *Agrobacterium tumefaciens* и *Pseudomonas aeruginosa*. На основании того, что *phoB*-мутанты были более чувствительны к H₂O₂, чем мутанты *kataA*, Z. Yuan и соавт. [13] предположили, что помимо *kataA* при фосфатном голодании индуцируются другие PhoB-регулируемые гены, играющие важную роль в защите клеток от H₂O₂.

В целом, полученные ранее данные оставляют открытым вопрос о продукции АФК и роли окислительного стресса у бактерий, голодающих по фосфату.

Недавно мы показали, что при аминокислотном голодании клеток *E. coli*, растущих в аэробных условиях, важную роль в ответе на стресс играет глутатион [14]. Бактерии поддерживают низкий уровень внутриклеточного свободного цистеина из-за его высокой восстанавливающей активности по отношению к ионам Fe³⁺, что способствует реакции Фентона [15, 16]. В отличие от цистеина, GSH — слабый восстановитель железа в высшей степени окисления [15], поэтому включение цистеина в глутатион служит эффективным механизмом поддержания гомеостаза цистеина при повышении его внутриклеточной концентрации,

Таблица 1. Штаммы *Escherichia coli* и плазмиды, использованные в работе

Название	Генотип	Источник
BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda^{-}, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514$	CGSC ^a
JW2663	как BW25113, но <i>gshA</i>	CGSC
JW3467	как BW25113, но <i>gor</i>	CGSC
JW5856	как BW25113, но <i>trxA</i>	CGSC
JW0871	как BW25113, но <i>trxB</i>	CGSC
DM4000	<i>hisG4 argE3 thr-1⁻ ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 ilv TS rpsL31 sulA::Mud1(bla lac)cam</i>	VMR ^b
NM3655	<i>gshA trxA</i>	ИЭГМ ^c
NM3761	<i>gor trxB</i>	ИЭГМ
pKT1033	<i>katG::lacZ</i>	ТК ^d
pRS katE16	<i>katE::lacZ</i>	LPC ^e
pColV-K30	<i>iucC::lacZ</i>	IJA ^f

^a *E. coli* Genetic Stock Center.^b Материал любезно предоставлен проф. Volkert M.R. (University of Massachusetts Medical School, Worcester, США).^c Музей лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов (Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермь, Россия).^d Материал любезно предоставлен проф. Tao K. (Laboratory of Radiation Biology, Kyoto University, Kyoto, Япония).^e Материал любезно предоставлен проф. Loewen P.C. (Department of Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Канада).^f Материал любезно предоставлен проф. Imlay J.A. (Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, Illinois, США).

наблюдаемой при остановке синтеза белка [14]. Снижение избытка цистеина в клетках достигается также его экспортом в среду и десульфуризацией с образованием H₂S [14, 16, 17]. Ранее нами показано, что аминокислотное голодание стимулирует увеличение внутри- и внеклеточного пула глутатиона, а также изменение соотношения восстановленный/окисленный глутатион в цитоплазме (GSH_{in}/GSSG_{in}) [14]. Известно, что редокс-статус глутатиона и других тиоловых редокс-систем тесно взаимосвязаны как друг с другом, так и с экспрессией ферментов, нейтрализующих АФК [3].

На основании приведенных данных можно заключить, что понимание динамики изменения редокс-статуса глутатиона расширит наши знания по механизмам ответа бактерий на стрессы, индуцируемые голоданием. В этой работе нами изучены изменения активности антиоксидантных систем при фосфатном голодании бактерий *E. coli*. Оценивали такие показатели, как редокс-статус глутатиона, продукция H₂O₂ и экспрессия антиоксидантных ферментов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. В работе использовали реагенты фирмы “Sigma Chemical Co.”: 3-[N-морфолин]пропансульфокислота (MOPS), 2-нитрофенил-β-D-галактопиранозид, дезоксихолат, меркаптоэтанол, пероксидаза хрена (Horseradish peroxidase; HRP), Amplex Red, DiBAC₄(3), феррицитохром c,

супероксиддисмутаза, 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота, глутатионредуктаза; а также агар (“Fluka”, США), среда LB (“Amresco”, США), диметилсульфоксид (DMSO) (“Scharlau”, Испания) и этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) (BioFroxx, ФРГ); остальные реагенты были квалификации “чда” российских производителей.

Бактериальные штаммы и условия роста. Родительский штамм *Escherichia coli* BW25113 (wt) и одиночные мутанты: *gshA*, *gor*, *trxA* и *trxB* — были из коллекции Keio [18] (табл. 1). Двойные мутанты: *gshA trxA* и *gor trxB* — были сконструированы путем трансдукции фагом P1 с использованием соответствующих штаммов Keio. Родительский штамм и перечисленные выше мутанты, несущие транскрипционные генные слияния *katG::lacZ* [19], *katE::lacZ* [20], *sulA(sfiA)::lacZ* [21] и *iucC::lacZ* [22], были созданы методами трансформации и трансдукции.

Клетки выращивали в среде MOPS с добавлением 8.5 мМ глюкозы и 2 мМ KН₂РO₄ (или 2 мМ NaН₂РO₄ при использовании среды с низким содержанием K⁺) [23]. Ночные культуры центрифугировали и разводили в 50 мл свежей среды до оптической плотности 0.1 при 600 нм (OD₆₀₀), а затем выращивали до OD₆₀₀ 0.6 при 37°C в колбах на 250 мл, встряхивая при 150 об./мин. После центрифугирования клетки разводили до OD₆₀₀ 0.25 в 100 мл предварительно нагретой свежей среды с фосфатом (контроль) или без фосфата (P_i-голодание) и выращивали от 2 до 48 ч, как указано выше.

Удельную скорость роста (μ) рассчитывали по уравнению $\mu = \Delta \ln OD_{600} / \Delta t$, где t — время (ч).

Измерение кислорода (pO_2) и калия (K^+). Мониторинг растворенного кислорода (pO_2) выполняли в режиме реального времени непосредственно в колбах с помощью кислородного электрода Кларка InPro 6800 (“Mettler Toledo”, Швейцария). Изменения уровня внеклеточного калия регистрировали с помощью K^+ -селективного электрода ЭЛИС-121К (“ИТ”, Россия) непосредственно в колбах в среде с низкой концентрацией K^+ (0.2 мМ), куда вносили клетки *E. coli*, подготовленные, как указано выше. Синхронную обработку всех первичных данных от сенсоров вели по протоколам RS-232 и Modbus программного комплекса Advantech OPC Server v3.0 (<https://advantech-modbus-opc-server.software.informer.com/3.0/>).

Определение АТФ и мембранного потенциала. Концентрацию АТФ измеряли люциферин-люциферазным методом, используя ATP Determination Kit (“Molecular Probes”, США). Для экстракции АТФ 50 мкл клеточной суспензии смешивали с 450 мкл DMSO. Экстракцию проводили в течение 5 мин и определяли концентрацию АТФ в соответствии с протоколом производителя.

Изменения мембранного потенциала оценивали с использованием $\Delta\psi$ -чувствительного флуоресцентного красителя DiBAC₄(3) [24, 25]. Образцы клеток, обработанные протонофором карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразоном (20 мкМ), использовали в качестве положительного контроля. Флуоресцирующие клетки подсчитывали на флуоресцентном микроскопе Leica DM2000 (“Leica”, Германия), как описано ранее [25]. Общее число клеток подсчитывали в проходящем свете. Для каждой пробы подсчитывали около 1000 клеток. Все эксперименты проводили 3–6 раз независимо друг от друга.

Измерение внеклеточного супероксида и H_2O_2 . Внеклеточный супероксид определяли, используя его способность восстанавливать цитохром *c* [26]. Для определения H_2O_2 клетки выращивали, как описано выше. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты культуры объемом 2 мл, пропускали через мембранные фильтры и измеряли концентрацию H_2O_2 в фильтратах с помощью системы Amplex Red—Horseradish peroxidase [27] с использованием спектрофлуориметра Shimadzu RF-1501 (“Shimadzu”, Япония) (λ_{ex} 563 нм и λ_{em} 587 нм). Концентрацию H_2O_2 в пробах рассчитывали по калибровочной кривой.

Измерение глутатиона и экспрессии генов. Внеклеточный и внутриклеточный глутатион определяли спектрофотометрически циклическим методом с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) и глутатионредуктазой [28], модифицированным,

как описано ранее [5]. Для определения внеклеточного глутатиона образцы клеточных суспензий пропускали через мембранные фильтры (0.45 мкм). Одну часть фильтрата анализировали на общий глутатион, другую — на содержание GSSG. Для определения внутриклеточного глутатиона 10 мл культуры центрифугировали при 8000 *g* в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 5 мл холодного водного раствора 20 мМ EDTA и разрушали ультразвуком при 0°C. Осаждение белка и определение GSH и GSSG проводили, как описано ранее [5]. Калибровочные кривые строили по известным концентрациям GSH и GSSG, которые обрабатывали как образцы клеточных суспензий. Концентрацию глутатиона выражали как отношение величины, полученной по калибровочным кривым к значению OD_{600} в момент отбора пробы.

Изменения в экспрессии анализируемых генов оценивали путем определения активности β -галактозидазы [29] штаммов *E. coli*, несущих соответствующие генные слияния.

Определение колониеобразующих единиц (КОЕ). Для подсчета КОЕ готовили серийные разведения (от 10^{-1} до 10^{-8}) каждой пробы в 0.9%-ном стерильном NaCl. Один миллилитр разведенной культуры (обычно 10^{-6} и 10^{-7} , чтобы получить отдельные колонии) смешивали с 3 мл расплавленного мягкого LB-агара (0.8%) при 42°C и выливали на чашки Петри с твердым LB-агаром (1.5%). Число колоний на чашках подсчитывали после 24-часовой инкубации при 37°C.

Статистический анализ. Каждый результат представлен как среднее значение (не менее 3 независимых экспериментов) $\pm$ стандартная ошибка среднего. Для анализа использовали *t*-критерий Стьюдента. Значения $p < 0.05$ рассматривали как статистически значимые. Результаты проанализированы с помощью программы Statistica 8.0.360 (Statsoft Inc. 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние фосфатного голодания на ростовые и энергетические параметры E. coli

В отсутствие лимитации по фосфату максимальная удельная скорость роста (μ_{max}) экспоненциально растущих культур *E. coli* родительского штамма (wt) и мутантов *gshA*, *gor*, *trxA*, *trxB*, *gshA trxA* и *gor trxB* составляла 0.69 ± 0.02 , 0.71 ± 0.01 , 0.65 ± 0.01 , 0.54 ± 0.01 , 0.63 ± 0.01 , 0.63 ± 0.01 и 0.57 ± 0.01 ч⁻¹ соответственно (рис. 1а). При достижении плотности ~ 1 о.е. при длине волны 600 нм скорость роста постепенно снижалась у всех штаммов вследствие падения концентрации кислорода и накопления кислых продуктов метаболизма.

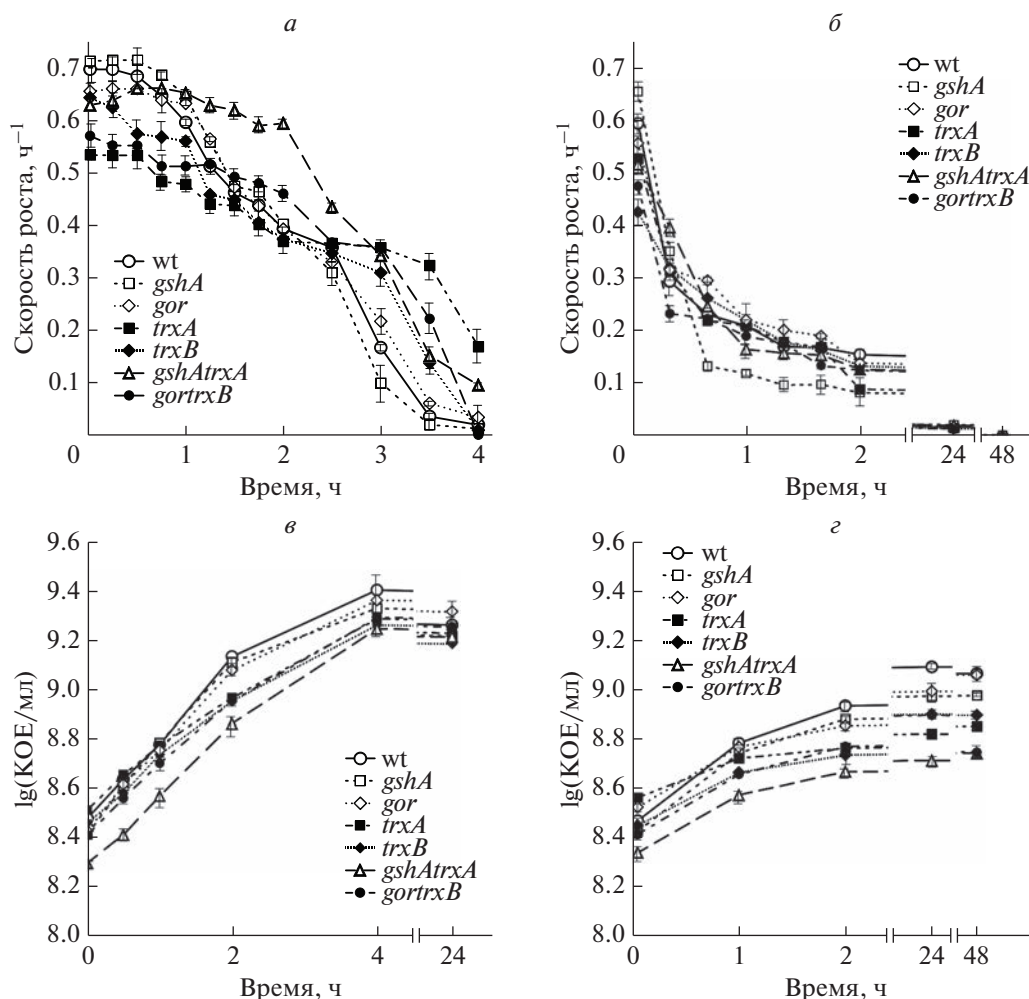


Рис. 1. Изменения скорости роста и числа КОЕ в растущих и голодающих по фосфату культурах *E. coli*. Удельная скорость роста в среде с фосфатом (а) и без фосфата (б); КОЕ в среде с фосфатом (в) и без фосфата (г).

После переноса бактерий из растущей культуры на среду без фосфата скорость роста быстро снижалась, достигая через 20–40 мин значения около 0.25 ч^{-1} , после чего у всех штаммов (включая родительский) наблюдалась фаза более медленного снижения скорости роста (рис. 1б). Наблюдаемый на первой фазе рост, по-видимому, был связан с потреблением следовых количеств P_i , поступивших в среду вместе с центрифугируемыми клетками. Через 24 ч рост прекращался у всех штаммов. Добавление фосфата приводило к возобновлению роста со скоростью, наблюдаемой в растущей культуре (данные не приведены). Замедление роста в культурах, растущих в условиях голодания по фосфату, регистрировали также по снижению КОЕ при сравнении с культурой, потребляющей фосфат (рис. 1в, г). За первые 2 ч инкубации в клетках родительского штамма на среде с фосфатом число КОЕ увеличивалось в 4.5 раза, в то время как в голодающей культуре этот показатель возрастал в 2.9, а у мутантов — в

среднем в 2.1 раза. Наименьшее повышение КОЕ (в 1.5 раза) наблюдалось для мутанта *trxA*, дефектного по синтезу тиоредоксина-1.

Родительский штамм и мутанты *gshA*, *gor*, *trxA*, *trxB*, *gshAtrxA* и *gor trxB*, экспоненциально растущие на среде с фосфатом, содержали 3.07 ± 0.08 , 2.85 ± 0.06 , 3.13 ± 0.1 , 2.34 ± 0.11 , 2.80 ± 0.1 , 2.84 ± 0.06 и 2.3 ± 0.06 мкМ АТФ/ОД₆₀₀ соответственно (нулевое время на рис. 2а). При истощении фосфата синхронно с падением скорости роста уровень АТФ снижался у всех штаммов в среднем в 2.3 раза через 1 ч и в 5.3 раза через 24 ч (рис. 2а).

Во всех штаммах, включая родительский, при росте в присутствии фосфата доля клеток, окрашенных флуоресцентным красителем DiBAC₄(3), варьировала от 2.0 до 3.2% и мало изменялась в течение роста (нулевое время на рис. 2б). Обработка протонатором карбонилцианид-*м*-хлорофенилгидразоном (20 мкМ CCCP) увеличивала количество клеток, проницаемых для DiBAC₄(3),

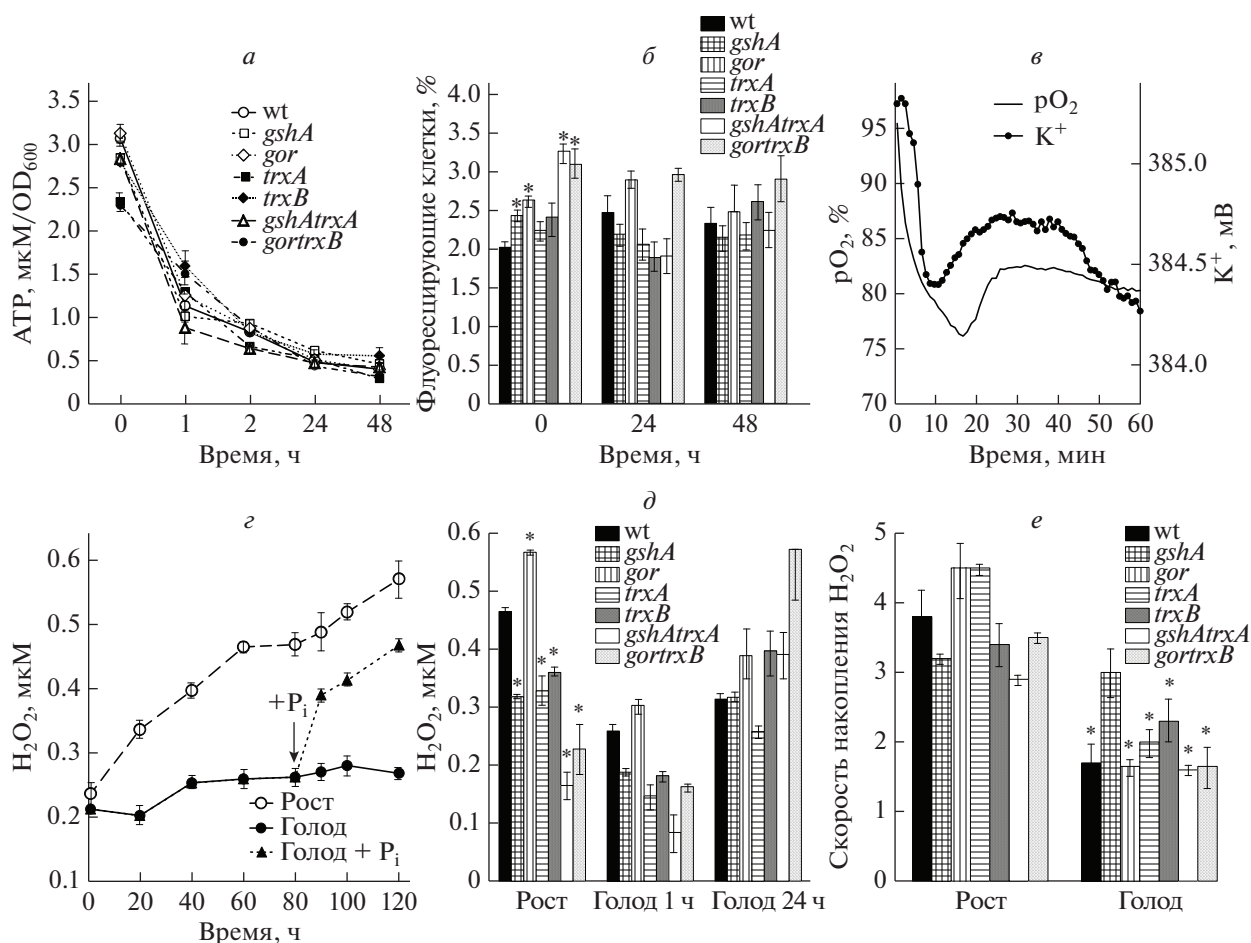


Рис. 2. Изменения физиологических параметров *E. coli* при голодании по фосфату. *a* — Уровень АТФ; *б* — процент клеток, утративших мембранный потенциал (окрашенных флуоресцентным красителем DiBAC₄(3)); *в* — содержание растворенного кислорода (pO₂) и внеклеточного калия (K⁺) в культуре *E. coli* BW25113 (wt), 0.5 мВ соответствует 8 мМ K⁺; *г* — внеклеточная концентрация H₂O₂ в культуре *E. coli* BW25113 (wt); *д* — накопление H₂O₂ в культуральной среде мутантов по тиоловым редокс-системам; *е* — скорость накопления H₂O₂ в среде исследуемых штаммов в течение 2 ч роста или голодания (нмоль · OD₆₀₀⁻¹ мин⁻¹). **p* < 0.05 между значениями параметров, полученных для мутантов, относительно родительского штамма (*б*, *д*) или между значениями в растущей и голодающей культурах для каждого штамма (*е*).

до 54% в течение 20 мин (не показано). В течение 48 ч голодания по фосфату не наблюдалось увеличения числа окрашенных клеток у всех штаммов, что свидетельствует о том, что голодающие клетки сохраняли мембранный потенциал.

Снижение скорости роста на начальной фазе инкубации в культуральной среде без фосфата сопровождалось падением уровня кислорода в ней (рис. 2в). Мы предполагаем, что это может быть следствием аэробного метаболизма глюкозы. Скорость падения pO₂ для родительского штамма на этой фазе составляла 4.3% OD₆₀₀⁻¹ мин⁻¹ по сравнению с 6.3% OD₆₀₀⁻¹ мин⁻¹ за аналогичный период после переноса бактерий в среду с фосфатом. У всех штаммов, включая родительский, через 10–20 мин от начала инкубации, истощение фосфата приводило к резкому повышению pO₂ и

уровня K⁺ в среде, что свидетельствует о снижении потребления кислорода и выходе части K⁺ из клеток (рис. 2в). Далее возобновлялось медленное потребление кислорода и K⁺, соответствующее росту бактерий с низкой скоростью. Скорость снижения pO₂ на этой фазе (через 40–60 мин после переноса в среду без фосфата) составляла 0.27% OD₆₀₀⁻¹ мин⁻¹, что было почти в 5 раз ниже соответствующей скорости в среде с фосфатом (1.28% OD₆₀₀⁻¹ мин⁻¹).

Влияние фосфатного голодания на продукцию оксидантов и экспрессию антиоксидантных генов *E. coli*

Рост бактерий в присутствии фосфата сопровождался накоплением H₂O₂ в среде. В голодаю-

шей культуре концентрация внеклеточной перекиси водорода удерживалась на низком уровне, при добавлении фосфата возобновление роста сопровождалось быстрым повышением H_2O_2 в среде (рис. 2а). В присутствии фосфата у всех мутантов (кроме *gor*) внеклеточная концентрация H_2O_2 была ниже, чем у родительского штамма. Наиболее низкий уровень H_2O_2 был у двойного мутанта *gshA trxA* и составлял 35% от родительского показателя. У мутанта *gor*, дефицитного по глутатионредуктазе, внеклеточная концентрация H_2O_2 было на 12% выше, чем у родительского штамма (рис. 2д). Скорость накопления H_2O_2 в среде, рассчитанная как $\text{нмоль} \cdot \text{OD}_{600}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, была минимальна у мутантов *gshA* и *gshA trxA*. В остальных случаях достоверная разница с родителем отсутствовала (рис. 2е). Через 1 ч от начала голодания уровень H_2O_2 у всех штаммов был в среднем на 44% ниже, чем в растущей культуре. Степень снижения в целом была пропорциональна содержанию H_2O_2 до начала голодания, за исключением двойного мутанта *gor trxB*, у которого уровень H_2O_2 снизился на 29% от исходного. Скорость накопления H_2O_2 в голодающей культуре также была ниже, чем в растущей, у всех штаммов, кроме *gshA* (рис. 2е). При дальнейшем наблюдении выявлено, что через 24 ч голодания внеклеточный уровень H_2O_2 у мутантов *gshA* и *trxB* восстанавливался до значений, близких к таковым в растущей культуре, а у родительского штамма и мутантов *gor* и *trxA* несколько повышался, но не достигал значений в растущей культуре. Обращает внимание резкое увеличение (более чем в 2 раза) продукции H_2O_2 у двойных мутантов (рис. 2д).

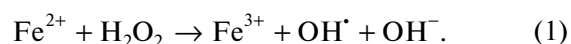
В противоположность H_2O_2 , продукция супероксида при голодании по фосфату не только не уменьшалась, но даже увеличивалась в 2–3 раза по сравнению с культурой, не лимитированной по фосфату (рис. 3а). Этот эффект в равной степени наблюдался как в родительском штамме, так и у мутантов *gshA* и *gshA trxA*. Увеличению продукции супероксида соответствовало замедление дыхания при голодании (рис. 2в). Добавление фосфата приводило к снижению образования супероксида до уровня, наблюдаемого в культуре с фосфатом (рис. 3а).

Снижение внеклеточных уровней H_2O_2 , наблюдаемое при голодании по фосфату, может быть результатом как снижения продукции перекиси, так и повышения активности ферментов, разрушающих перекись водорода, таких как каталазы G и E. Экспрессия гена *katG*, кодирующего каталазу G, регулируется транскрипционным фактором OxyR, который активируется при повышении H_2O_2 , и регулятором общего стрессового ответа RpoS при переходе в стационарную фазу [30]. Ген *katE*, кодирующий каталазу E, экспрессируется

под контролем RpoS, уровень которого обратно пропорционален удельной скорости роста [31].

При росте на фосфате экспрессия *katG::lacZ* поддерживалась на постоянном уровне, но быстро увеличивалась с началом голодания (рис. 3б). Добавление фосфата снижало экспрессию гена *katG* до уровня, наблюдаемого в растущей культуре. В растущей культуре экспрессия *katG::lacZ* у одиночных мутантов была выше, чем у родительского штамма в среднем на 25%, а у двойных мутантов *gshA trxA* и *gor trxB* — в 5.6 и 2.7 раза соответственно (рис. 3в). Голодание в течение 1 ч приводило к повышению экспрессии *katG::lacZ* у всех штаммов, в том числе у родительского на 76%, у одиночных мутантов в среднем на 47%. Двойные мутанты сохраняли высокий уровень экспрессии *katG::lacZ*. Примечательно, что у двойных мутантов, растущих с фосфатом и голодающих в течение 1 ч, низким уровням H_2O_2 соответствовала самая высокая экспрессии *katG::lacZ*. Хотя через 24 ч от начала голодания уровень экспрессии *katG::lacZ* у всех штаммов несколько снижался по сравнению со значениями, наблюдаемыми после 1 ч голодания, он все еще оставался выше, чем у бактерий, растущих на среде с фосфатом (рис. 3в). Также зарегистрировано индуцируемое голоданием повышение экспрессии *katE::lacZ* (рис. 3г). В фосфатсодержащей культуре родительского штамма *E. coli* экспрессия этого слияния за 2 ч увеличивалась на 17% (с 8852 ± 851 до 10377 ± 72 единиц Миллера), в то время как в голодающей культуре на 86% (до 16486 ± 220).

Основная причина повреждения ДНК и гибели *E. coli* при пероксидном стрессе — образование высокотоксичных гидроксильных радикалов в реакции Фентона [32]:



Пул свободного железа в *E. coli* поддерживается на низком уровне и строго контролируется транскрипционным регулятором Fur [33]. Один из членов регулона Fur — ген *iucC*, кодирующий белок, участвующий в синтезе сидерофора аэробактерии. Снижение содержания внутриклеточного свободного железа стимулирует экспрессию *iucC*. Использование слияния *iucC::lacZ* [22] позволяет отследить степень индукции регулона Fur и получить косвенную оценку состояния пула свободного железа. Как видно из рис. 3д, у родительского штамма *E. coli* и мутанта *gshA* через 2 ч голодания экспрессия *iucC::lacZ* повышалась на 21% по сравнению с клетками, растущими на фосфате ($p < 0.05$). Это может свидетельствовать о некотором снижении содержания свободного железа в цитоплазме.

В ответ на повреждение ДНК клетки *E. coli* индуцируют SOS-регулон, контролирующий гены,

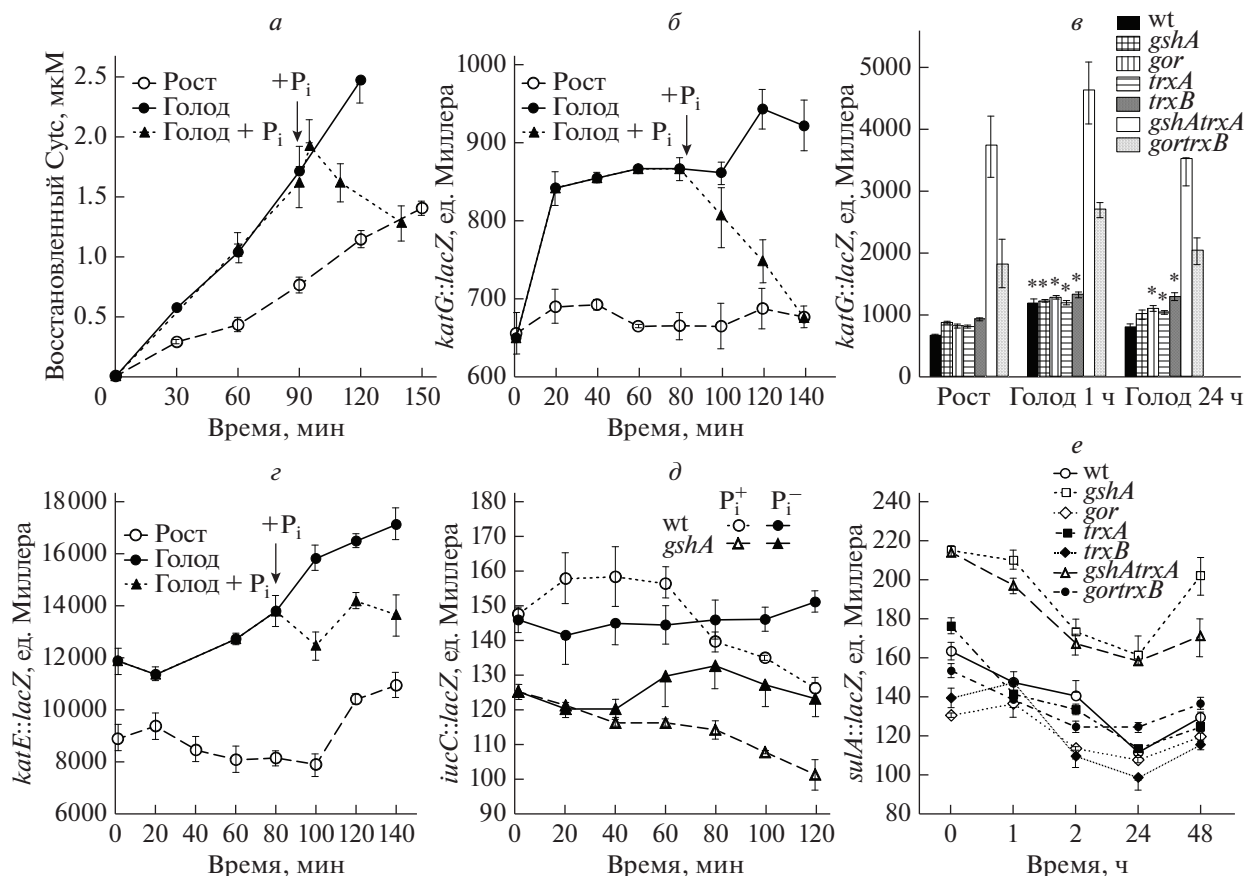


Рис. 3. Продукция супероксида и экспрессия антиоксидантных генов в растущих и голодающих по фосфату культурах *E. coli*. *a* – Продукция супероксида в штамме BW25113 (wt), измеренная по методу [26] как концентрация восстановленного цитохрома с (Cytc); *b* – экспрессия *katG::lacZ* в штамме BW25113 (wt); *c* – экспрессия *katE::lacZ* у мутантов по тиоловым редокс-системам (* $p < 0.01$ между значениями параметров в растущей и голодающей культурах для каждого штамма); *d* – экспрессия *katE::lacZ* в штамме BW25113 (wt); *e* – экспрессия *iucC::lacZ* в штаммах BW25113 (wt) и JW2663 (*gshA*); *e* – экспрессия *sulA::lacZ* у исследуемых мутантов при голодании по фосфату.

участвующие в репарации ДНК [34]. Для исследования экспрессии генов SOS мы использовали транскрипционное слияние гена *sulA*, медиатора филаментации в ответе SOS, с геном *lacZ* [21]. В культурах *E. coli*, растущих на среде с фосфатом, наиболее высокий уровень экспрессии *sulA::lacZ* был у штаммов *gshA* и *gshA trxA* (215 ± 4 единиц Миллера), что на 32% выше, чем в родительском штамме (163 ± 4) (рис. 3e). Наиболее низкая экспрессия была у штамма *gor* (130 ± 1). У всех штаммов (включая родительский) в течение 24 ч голодания по фосфату наблюдалось статистически достоверное снижение экспрессии *sulA::lacZ* – в среднем на 26%, что может свидетельствовать об уменьшении повреждения ДНК. Через 48 ч голодания у всех исследованных штаммов уровень экспрессии *sulA::lacZ* несколько повышался по сравнению с 24-часовой точкой (максимально на 25% у мутанта *gshA*), но не достигал значений, характерных для растущей культуры.

Влияние фосфатного голодания на уровень и редокс-статус глутатиона в клетках *E. coli*

Ранее нами показано, что уровни внутриклеточного (GSH_{in}) и внеклеточного (GSH_{out}) глутатиона, а также редокс-статус глутатиона значительно изменяются при различных стрессах [3, 5, 14, 35, 36]. Представляло интерес проверить влияние голодания по фосфату на указанные параметры.

В растущих на фосфате клетках *E. coli* наибольшая концентрация GSH_{in} выявлена в мутанте *gor* ($11.1 \pm 0.07 \text{ мкМ}/\text{OD}_{600}$), наименьшая – в мутанте *trxA* (3.3 ± 0.6). В мутантах *gor trxB*, *trxB* и родительском штамме содержалось соответственно 4.7 ± 0.4 , 7.2 ± 0.2 и $7.7 \pm 0.3 \text{ мкМ}/\text{OD}_{600}$. Через 1 ч культивирования в среде без фосфата у всех штаммов наблюдалось статистически достоверное ($p < 0.05$) повышение уровня GSH_{in} . Наименьшее увеличение (в 1.6 раза) было у родитель-

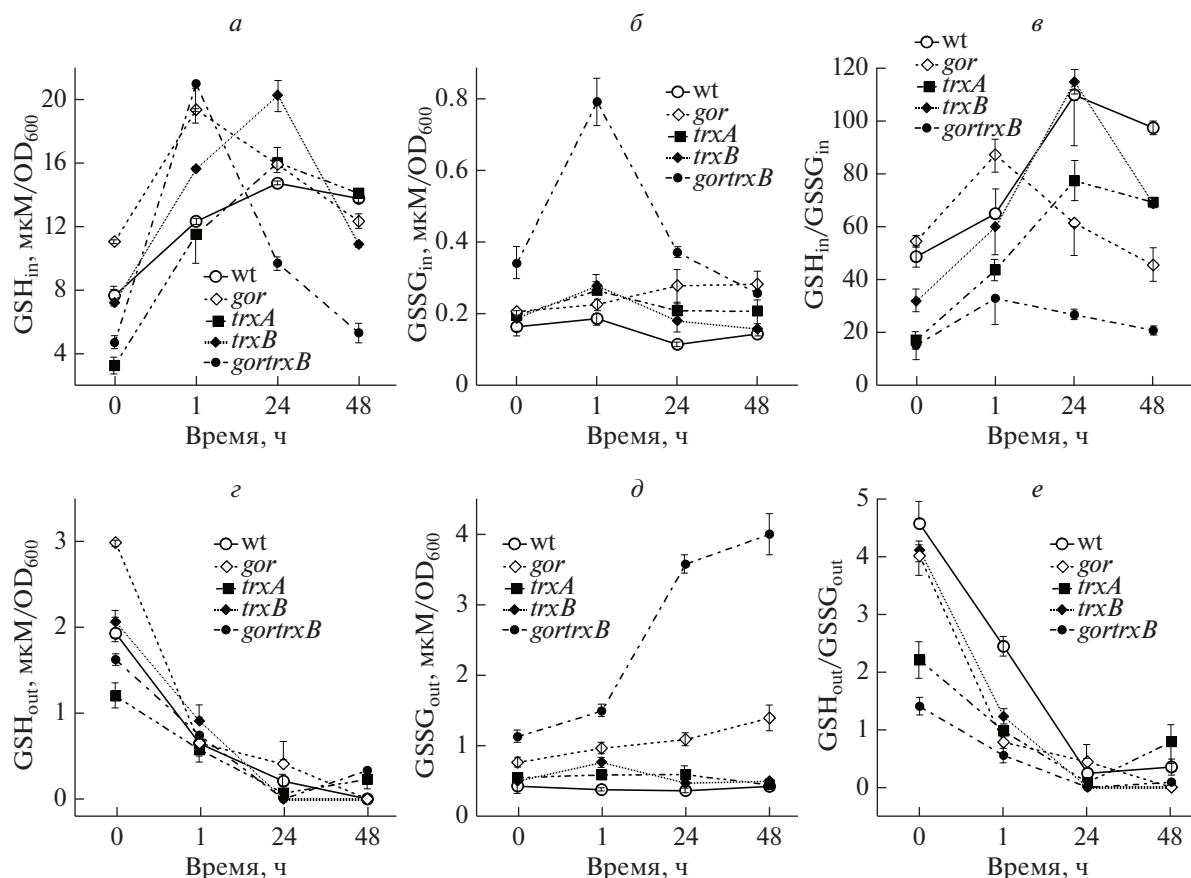


Рис. 4. Изменение статуса глутатиона в голодающих по фосфату культурах *E. coli*. *a* – Внутриклеточный восстановленный глутатион (GSH_{in}); *б* – внутриклеточный окисленный глутатион (GSSG_{in}); *в* – соотношение GSH_{in}/GSSG_{in}; *г* – внеклеточный восстановленный глутатион (GSH_{out}); *д* – внеклеточный окисленный глутатион (GSSG_{out}), *е* – соотношение GSH_{out}/GSSG_{out}.

ского штамма, наибольшее – у *gor trxB* (в 4.4 раза) (рис. 4а). Повышенный уровень GSH_{in} сохранялся у всех штаммов после 24 ч голодания. К 48 ч голодания у всех штаммов наблюдалась тенденция к снижению внутриклеточного GSH, хотя и в разной степени. У родительского штамма, а также у мутантов *trxA* и *trxB* уровень GSH_{in} оставался все еще выше, чем в культурах, растущих на фосфате, а у *gor* и *gor trxB* приблизился к этому значению (рис. 4а).

Известно, что клетки *E. coli* аккумулируют в среде глутатион в микромолярных концентрациях [37]. Уровень внеклеточного глутатиона зависит от условий культивирования и может значительно изменяться в стрессовых ситуациях [3]. Нами показано, что в течение роста на среде с фосфатом уровень GSH_{out} поддерживался в диапазоне от 1.2 ± 0.15 (*trxA*) до 3.0 ± 0.03 (*gor*) мкМ/OD₆₀₀ и коррелировал со значениями GSH_{in} ($r = 0.95$). Голодание по фосфату у всех штаммов сопровождалось снижением уровня GSH_{out}, более быстрым в течение первого часа (рис. 4г). К

этому времени и далее, до конца культивирования, различия в значениях GSH_{out} между штаммами резко уменьшались. Через 48 ч голодания уровень GSH_{out} приближался к следовым количествам (рис. 4г). Как следует из сравнения данных, представленных на рис. 4а и 4г, существенный вклад в увеличение пула GSH_{in} в процессе голодания может вносить его импорт из среды.

Уровень внутриклеточного окисленного глутатиона (GSSG_{in}) в среде с фосфатом у родительского штамма составлял 0.16 ± 0.02 мкМ/OD₆₀₀ (рис. 4б). Близкие к этому значению концентрации GSSG_{in} обнаружены у штаммов *gor*, *trxA* и *trxB*: 0.20 ± 0.06 , 0.19 ± 0.04 и 0.19 ± 0.01 соответственно. Лишенный обоих редуктаз мутант *gor trxB* заметно отличался от остальных штаммов, показывая уровень GSSG_{in} в два раза более высокий, чем у родительского штамма ($p < 0.05$). Не выявлено статистически достоверного изменения концентрации GSSG_{in} в процессе голодания у всех штаммов, кроме *gor trxB*. В этом штамме через 1 ч после начала голодания уровень GSSG_{in}

увеличился в 2.3 раза ($p < 0.05$), а затем, в течение дальнейшего культивирования, снизился до уровня, близкого к начальному значению (рис. 4б).

У штаммов, растущих в присутствии фосфата, концентрация окисленного внеклеточного глутатиона ($GSSG_{out}$) была в среднем в 3 раза ниже, чем GSH_{out} (рис. 4д). У родительского штамма и у мутантов *trxA* и *trxB* низкий уровень $GSSG_{out}$ сохранялся и при голодании. Исключение составлял мутант *gor trxB*, у которого концентрация $GSSG_{out}$ в растущих на фосфате клетках была только в 1.5 раза ниже, чем GSH_{out} , а при голодании увеличивалась 3.6 раза, достигая уровня GSH_{in} , который наблюдался в растущей культуре и через 48 ч голодания. У мутанта *gor* при голодании уровень $GSSG_{out}$ увеличивался почти в два раза (рис. 4д).

Редокс-статус глутатиона хорошо отражает соотношение $GSH/GSSG$. В связи с тем, что начальные уровни $GSSG_{in}$ у всех штаммов изменялись в узком диапазоне, различия в $GSH_{in}/GSSG_{in}$ коррелировали со значениями GSH_{in} , которые варьировали в более широком диапазоне (рис. 4е). В проведенных нами экспериментах в среде с фосфатом значение $GSH_{in}/GSSG_{in}$ для родительского штамма составляло 48.6 ± 3.9 . Отсутствие обеих редуктаз у штамма *gor trxB* резко снижало этот показатель более чем в три раза. В течение голодания по фосфату отмечалось значительное увеличение соотношения $GSH_{in}/GSSG_{in}$ в сторону редутивных значений и достигало максимума для *gor* через 1 ч (87 ± 6), а для *trxA*, *trxB* и родительского штамма (77 ± 13 , 114 ± 6 и 110 ± 19 соответственно) — через 24 ч от начала культивирования (рис. 4е). Наименьшее увеличение наблюдалось у *gor trxB* (32 ± 10), что связано с наименьшим среди других штаммов содержанием GSH_{in} и наибольшим $GSSG_{in}$. У всех штаммов, растущих на фосфате, соотношение $GSH_{out}/GSSG_{out}$ изменялось от 1.4 ± 0.16 у *gor trxB* до 4.6 ± 0.3 у родительского штамма, составляя в среднем около 3.3, что в 10 раз меньше, чем соотношение $GSH_{in}/GSSG_{in}$. В противоположность $GSH_{in}/GSSG_{in}$, соотношение $GSH_{out}/GSSG_{out}$ у всех штаммов при голодании значительно снижалось в сторону окислительных значений (рис. 4е).

Следует отметить, что полученные в этой работе значения $GSH_{in}/GSSG_{in}$ значительно ниже тех, которые наблюдались ранее при выращивании *E. coli* BW25113 на среде M9, где в нормальных ростовых условиях это соотношение варьировало от 330 до 500 [14]. В проведенной нами работе у тех же бактерий, растущих на среде MOPS, соотношение $GSH_{in}/GSSG_{in}$ было примерно в 5 раз ниже, что связано с увеличением уровня $GSSG_{in}$. Это увеличение $GSSG_{in}$ может свидетельствовать о большей интенсивности окислительных про-

цессов в среде MOPS, где концентрация ионов Fe^{2+} в 5 раз больше, чем в M9.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В качестве показателей, свидетельствующих о наличии окислительного стресса при ответе бактерий на стрессы, прямо не связанные с действием АФК, обычно рассматривают увеличение продукции АФК, активацию компонентов антиоксидантных систем и окислительное повреждение биомолекул — в совокупности со снижением выживаемости или скорости роста. В результате исследования динамики изменения содержания кислорода в среде нами показано, что после истощения фосфата в присутствии глюкозы бактерии сохраняли дыхательную активность, хотя и на более низком уровне, чем растущие с фосфатом.

В аэробных условиях клетки *E. coli* продуцируют супероксид и H_2O_2 , когда молекулярный кислород случайно получает электроны от восстановленных кофакторов флавопротеинов. Возможны и другие, в том числе внеклеточные, источники АФК [38]. В выбранных нами условиях переход к голоданию по фосфату сопровождался снижением накопления H_2O_2 в среде у всех изученных штаммов. Это могло быть следствием понижения интенсивности дыхания, о чем свидетельствовало повышение содержания кислорода. Однако увеличение скорости продукции супероксида и экспрессии генов *katG* и *katE* при переходе к голоданию свидетельствует о повышении продукции АФК. Экспрессия обоих генов находится под контролем RpoS, реагирующего на снижение скорости роста и переход в стационарную фазу [30]. Экспрессия *katG* может контролироваться также транскрипционным регулятором OxyR, который откликается на повышение внутриклеточного H_2O_2 и помимо *katG* активирует транскрипцию и других генов (*ahpFC*, *gorA* и др.), участвующих в защите *E. coli* от пероксидного стресса [39]. Таким образом, наблюдаемое при голодании по фосфату снижение накопления H_2O_2 в среде может быть следствием индукции антиоксидантных ферментов.

Особый интерес представляют обнаруженные при фосфатном голодании значительные изменения редокс-статуса глутатиона. Наиболее важные из них связаны со снижением уровня GSH в среде и с увеличением его содержания в цитоплазме, а также со сдвигом соотношения $GSH_{in}/GSSG_{in}$ в сторону редутивных значений, а $GSH_{out}/GSSG_{out}$ — в сторону окислительных значений.

Ранее увеличение GSH_{in} было обнаружено у *E. coli*, растущих в аэробных условиях на среде M9, при действии ципрофлоксацина [40, 41] и хлорамфеникола [14], при аминокислотном голодании [14] и при исчерпании глюкозы [35]. Кроме

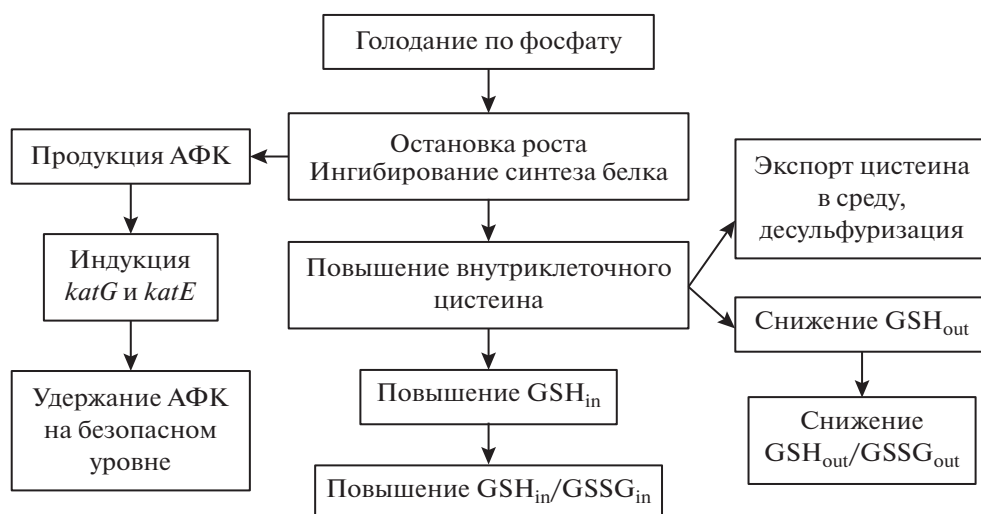


Рис. 5. Предполагаемая схема ответа антиоксидантных систем *E. coli* на голодание по фосфату.

того, при действии ципрофлоксацина и хлорамфеникола одновременно наблюдалось увеличение GSH_{out} , тогда как при аминокислотном голодании изменения в GSH_{out} отсутствовали. Выявленные нами изменения статуса глутатиона при фосфатном голодании аналогичны тем, которые происходили при остановке роста *E. coli* вследствие истощения глюкозы — когда одновременно происходило увеличение GSH_{in} и снижение GSH_{out} [35]. Ранее было показано, что факторы, снижающие энергетический статус клеток, ингибируют трансмембранный цикл GSH и стимулируют импорт GSH из среды [5]. Это может объяснить одинаковые изменения статуса глутатиона внутри и снаружи клетки при истощении глюкозы и фосфата. В обоих случаях голодание сопровождалось значительным снижением уровня ATP [35, и эта работа]. Повышение уровня ATP отмечено при действии ципрофлоксацина [41] и хлорамфеникола [42].

В цитируемых выше работах установлено, что индуцируемые стрессом изменения статуса глутатиона связаны с его участием в гомеостазе цистеина. Бактерии поддерживают низкий уровень внутриклеточного свободного цистеина из-за его высокой редокс-активности и способности восстанавливать внутриклеточное железо, тем самым поставляя субстрат для реакции Фентона [15, 16]. GSH относится к слабым восстановителям железа [15], поэтому включение цистеина в молекулу глутатиона служит одним из эффективных механизмов поддержания гомеостаза цистеина при повышении его внутриклеточной концентрации, наблюдаемой при остановке синтеза белка [14]. Снижение избытка цистеина в клетках достигается также его экспортом в среду и десульфуризацией с образованием H_2S [14, 16, 17]. На-

блюдаемое нами повышение уровня GSH_{in} при фосфатном голодании также может быть следствием интенсификации синтеза глутатиона при возникновении избытка цистеина вследствие торможения синтеза белка и других метаболических процессов, потребляющих цистеин.

Известно, что редокс-системы глутатиона и тиоредоксина в функциональном отношении в значительной мере перекрываются и дублируют друг друга. Вследствие этого отсутствие компонентов одной из систем часто не проявляется фенотипически и только множественные мутации, затрагивающие обе системы, ведут к существенным нарушениям метаболизма. Кроме того, редокс-системы глутатиона и тиоредоксина тесно взаимодействуют с регулоном OxyR, активируемым H_2O_2 . Так, при пероксидном стрессе потеря глутатионредуктазы или тиоредоксинредуктазы может компенсироваться увеличением экспрессии *katG* (и синтеза GSH в первом случае) [6].

Поведение одиночных мутантов при фосфатном голодании в целом соответствует тому, что наблюдалось ранее при пероксидном стрессе. По такому интегральному показателю как скорость роста мутанты (за исключением *gshA*) незначительно отличались от родительского штамма и друг от друга. Особый интерес представляют данные по двойному мутанту *gor trxB*. По сравнению с родительским и одиночными мутантами этот штамм характеризовался многократно более высокой экспрессией *katG::lacZ*, наибольшим уровнем окисленного внутри- и внеклеточного глутатиона и соответственно самым низким соотношением $GSH/GSSG$ в обоих компартментах. Через 48 ч голодания по фосфату у этого штамма (как и у *gshA trxA*) было самое низкое значение КОЕ. Близкие свойства были у двойного мутанта

gshA trxB (исключая показатели, относящиеся к статусу глутатиона). Данные о поведении мутанта *gor trxB* дают дополнительные доказательства о наличии окислительного стресса при фосфатном голодании. Учитывая все перечисленные свойства, двойной мутант *gor trxB* можно рассматривать как удобную модель для изучения ответа бактерий на стрессы, не связанные с прямым действием АФК.

Полученные результаты суммированы на рис. 5.

На основании полученных результатов можно говорить о том, что при фосфатном голодании у *E. coli* увеличивается скорость продукции АФК, однако индукция каталазы предотвращает накопление H_2O_2 выше токсического уровня. В сочетании с низким уровнем свободного железа это позволяет бактериям поддерживать условия, снижающие риск повреждения ДНК, о чем свидетельствует отсутствие в голодающих клетках повышения экспрессии гена *sulA*, входящего в SOS-регулон. Примечательно также, что значительное снижение пула АТР, наблюдаемое по мере падения скорости роста клеток, не сопровождается адекватным падением мембранного потенциала и полным вытеканием калия, что может свидетельствовать о сохранении нормальной активности мембран в голодающих клетках. Фосфатное голодание вызывает значительный сдвиг статуса глутатиона внутри и снаружи клеток, что, по-видимому, отражает работу механизмов гомеостаза внутриклеточного цистеина. Совокупность происходящих изменений приводит к тому, что в описываемых условиях клетки *E. coli* могут длительное время поддерживать высокую жизнеспособность, позволяющую им быстро возобновлять рост после введения фосфата в среду. Мутации по отдельным компонентам тиоловых редокс-систем не приводят к критическим нарушениям, вызывающим гибель клеток, благодаря координированным изменениям активности других антиоксидантных систем.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-14-00093).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sevilla E., Bes M.T., Gonzalez A., Peleato M.L., Fillat M.F. (2019) Redox-based transcriptional regulation in prokaryotes: revisiting model mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **30**, 1651–1696. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7442>
- Imlay J.A. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Ann. Rev. Biochem.* **77**, 755–776. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>
- Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. (2005) Глутатион у бактерий. *Биохимия.* **70**, 1459–1473.
- Vlamiš-Gardikas A. (2008) The multiple functions of the thiol-based electron flow pathways of *Escherichia coli*: eternal concepts revised. *Biochim. Biophys. Acta.* **1780**, 1170–1200. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.013>
- Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. (2012) Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells. *Microbiol. Res.* **167**, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.05.005>
- Carmel-Harel O., Storz G. (2000) Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 439–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.439>
- Wanner B.L. (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Eds Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umbrager H.E. Washington DC: Am. Soc. Microbiol., pp. 1357–1381.
- Lamarche M.G., Wanner B.L., Crepin S., Harel J. (2008) The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**(3), 461–473. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>
- VanBogelen R.A., Olson E.R., Wanner B.L., Neidhardt F.C. (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**(15), 4344–4366. <https://doi.org/10.1128/jb.178.15.4344-4366.1996>
- Gerard F., Dri A.M., Moreau P.L. (1999) Role of *Escherichia coli* RpoS, LexA and H-NS global regulators in metabolism and survival under aerobic, phosphate-starvation conditions. *Microbiology.* **145**, 1547–1562. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-7-1547>
- Moreau P.L., Gerard F., Lutz N.W., Cozzone P. (2001) Non-growing *Escherichia coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress. *Mol. Microbiol.* **39**, 1048–1060. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02303.x>
- Moreau P.L. (2004) Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during glucose metabolism in nongrowing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions. *J. Bacteriol.* **186**, 7364–7368. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7364-7368.2004>
- Yuan Z.C., Zaheer R., Finan T.M. (2005) Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* **58**(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04874.x>

14. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternykh K.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. (2019) Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells. *Amino Acids*. **51**, 1577–1592.
<https://doi.org/10.1007/s00726-019-02795-2>
15. Park S., Imlay, J.A. (2003) High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* **185**, 1942–1950.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1942-1950.2003>
16. Imlay K.R.C., Korshunov S., Imlay J.A. (2015) The physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **197**, 3629–3644.
<https://doi.org/10.1128/JB.00277-15>
17. Korshunov S., Imlay K.R.C., Imlay J.A. (2020) Cystine import is a valuable but risky process whose hazards *Escherichia coli* minimizes by inducing a cysteine exporter. *Mol. Microbiol.* **113**, 22–39.
<https://doi.org/10.1111/mmi.14403>
18. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008.
<https://doi.org/10.1038/msb4100050>
19. Tao K., Makino K., Yonei S., Nacata A., Shinagawa H. (1989) Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 371–376.
<https://doi.org/10.1007/bf00332397>
20. Mulvey M.R., Switala J., Borys A., Loewen P.C. (1990) Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 6713–6720.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.12.6713-6720.1990>
21. Volkert M.R., Gately F.H., Hajec L.I. (1989) Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents. *Mutation. Res.* **217**, 109–115.
[https://doi.org/10.1016/0921-8777\(89\)90062-1](https://doi.org/10.1016/0921-8777(89)90062-1)
22. Maringanti S., Imlay J.A. (1999) An intracellular iron chelator pleiotropically suppresses enzymatic and growth defects of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 3792–3802.
<https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3792-3802.1999>
23. Neidhardt F.C., Bloch P.L., Smith D.F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.* **119**, 736–747.
<https://doi.org/10.1128/jb.119.3.736-747.1974>
24. Wickens H.J., Pinney R.J., Mason D.J., Gant V.A. (2000) Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 682–687.
<https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.676-681.2000>
25. Smirnova G.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Tyulenev A.V., Oktyabrsky O.N. (2015) Extracellular superoxide provokes glutathione efflux from *Escherichia coli* cells. *Res. Microbiol.* **166**, 609–617.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.07.007>
26. Korshunov S., Imlay J.A. (2006) Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 6326–6334.
<https://doi.org/10.1128/JB.00554-06>
27. Seaver L.C., Imlay J.A. (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 7173–7181.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001>
28. Tietze F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**, 502–522.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5)
29. Miller J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press.
30. Ivanova A., Miller C., Glinsky G., Eisenstark A. (1994) Role of the *rpoS(katF)* in *oxyR* independent regulation of hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**, 571–578.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01043.x>
31. Ihssen J., Egli T. (2004) Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli*. *Microbiology*. **150**, 1637–1648.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.26849-0>
32. Imlay J.A., Linn S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science*. **240**, 640–642.
<https://doi.org/10.1126/science.2834821>
33. Hantke K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172–177.
[https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00184-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00184-3)
34. Maslowska K.H., Makiela-Dzbenka K., Fijalkowska I.J. (2019) The SOS system: a complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* **60**, 368–384.
<https://doi.org/10.1002/em.22267>
35. Tyulenev A.V., Smirnova G.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. (2018) The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures. *Bioelectrochemistry*. **121**, 11–17.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.12.012>
36. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. (2018) The sharp phase of respiratory inhibition during amino acid starvation in *Escherichia coli* is RelA-dependent and associated with regulation of ATP synthase activity. *Res. Microbiol.* **169**, 157–165.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.02.003>
37. Owens R.A., Hartman P.E. (1986) Export of glutathione by some widely used *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* **168**, 109–114.
<https://doi.org/10.1128/jb.168.1.109-114.1986>
38. Imlay J.A. (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 443–454.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>
39. Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 6161–6165.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6161>

40. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Muzyka N.G., Peters M.A., Oktyabrsky O.N. (2017) Ciprofloxacin provokes SOS-dependent changes in respiration and membrane potential and causes alterations in the redox status of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **168**, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.008>
41. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. (2022) Study of the contribution of active defense mechanisms to ciprofloxacin tolerance in *Escherichia coli* growing at different rates. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **115**, 233–251. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01693-6>
42. Smirnova G., Tyulenev A., Muzyka N., Ushakov V., Samoilova Z., Oktyabrsky O. (2023) Influence of growth medium composition on physiological responses of *Escherichia coli* to the action of chloramphenicol and ciprofloxacin. *BioTech.* **12**, 43. <https://doi.org/10.3390/biotech12020043>

Changes in Activity of Antioxidant Systems of *Escherichia coli* under Phosphate Starvation

G. V. Smirnova¹, A. V. Tyulenev¹, N. G. Muzyka¹, L. V. Sutormina¹, and O. N. Oktyabrsky¹, *

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, "Perm Federal Research Center",
Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

*e-mail: oktyabr@iegm.ru

Changes in the activity of antioxidant systems in *Escherichia coli* during phosphate starvation were studied. It was shown that starvation was accompanied by a decrease in the intensity of respiration, an increase in the rate of superoxide production, and a decrease in the level of ATP. Simultaneously, there was a decrease in H₂O₂ in the medium and a significant increase in the expression of the *katG* and *katE* genes encoding the HPI and HPII catalases, respectively. At the same time, there was no drop in the membrane potential, which may indicate the retention of normal membrane activity in starving cells. It has been shown for the first time that the transition of *E. coli* to phosphate starvation is accompanied by significant changes in the status of glutathione. The most important of them are associated with a decrease in the level of glutathione reductive form (GSH) in the medium (GSH_{out}) and with a simultaneous increase in its content in the cytoplasm (GSH_{in}), as well as a shift in the GSH_{in} to oxidized glutathione form (GSSG_{in}) ratio towards reductive values, and GSH_{out}/GSSG_{out} towards oxidative values. Among the mutants used in the work, the double mutant *gor trxB*, deficient in the synthesis of glutathione reductase and thioredoxin reductase, showed the most pronounced distinctive features. Compared to the parental strain, this mutant showed a multiple higher expression of *katG::lacZ*, the highest level of oxidized intra- and extracellular glutathione, and, accordingly, the lowest GSH/GSSG ratio in both compartments. In general, the data obtained indicate that during phosphate starvation the interaction of the glutathione redox-system and regulons that control protection against reactive oxygen species creates conditions that allow maintaining the concentration of ROS below the toxic level. As a result, phosphate-starved *E. coli* cells can maintain a high viability for a long time that allows them quickly to resume growth after the addition of phosphate.

Keywords: antioxidant systems, *Escherichia coli*, phosphate starvation

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ

УДК 57.017.6, 57.017.8, 57.042

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ГЕРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА ПЛОДОВ РЯБИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*Sorbus aucuparia* L.)

© 2023 г. Е. Ю. Платонова^{a, b}, Д. А. Голубев^{a, b}, Н. В. Земская^a, О. Г. Шевченко^a, С. А. Патов^c,
М. В. Шапошников^a, А. А. Москалев^{a, *}

^aИнститут биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук,
Сыктывкар, 167982 Россия

^bСыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина, Сыктывкар, 167001 Россия

^cИнститут химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук,
Сыктывкар, 167000 Россия

*e-mail: amoskalev@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 05.06.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

Растительные полифенолы характеризуются широким спектром биологической активности, включая антиоксидантные свойства, и имеют высокий геропротекторный потенциал. Целью работы было исследование влияния экстракта ягод рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.) на продолжительность жизни и стрессоустойчивость *Drosophila melanogaster* с выявлением возможных механизмов его биологической активности. Установлено, что этанольный экстракт ягод *S. aucuparia*, основные компоненты которого рутин и цианидин-3-рутинозид, обладает выраженной антиоксидантной активностью *in vitro*. Обработка экстрактом ягод рябины увеличивала устойчивость самцов *D. melanogaster* к голоданию, но снижала устойчивость к гипертермии. У самок экстракт снижал устойчивость к окислительному стрессу, но повышал устойчивость к гипертермии. Эффекты экстракта ягод рябины на продолжительность жизни зависели как от концентрации экстракта, так и от пола дрозофил. В ответ на обработку экстрактом ягод рябины у самцов и самок *D. melanogaster* обнаружены незначительные различия в фоновом уровне экспрессии генов клеточного ответа на стресс, включая гены теплового шока (*Hsp27*, *Hsp68*, *Hsp83*), устойчивости к окислительному стрессу (*tgo/Hif1*, *cnc/Nrf2*, *Sod1*), циркадных ритмов (*Clk*, *per*) и ген долголетия *Sirt1*, что может объяснять различия в наблюдаемых эффектах.

Ключевые слова: рябина обыкновенная, экстракт, *Drosophila melanogaster*, геропротектор, продолжительность жизни, антиоксидантная активность

DOI: 10.31857/S0026898423060149, EDN: SMTGEI

Продление здорового долголетия — одна из главных задач современной биомедицины и биогеронтологии [1, 2]. Достижения в исследовании молекулярных механизмов старения приближают к решению этой проблемы [3–5]. Многочисленные экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о возможности увеличения продолжительности жизни модельных организмов с помощью фармакологических препаратов (геропротекторов), нацеленных на связанные со старением процессы [6–8].

Сокращения. AAPH (2,2'-azobis(амидинопропан) dihydrochloride) — 2,2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлорид; ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiozolin-6-sulfonic acid)) — 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислота); DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) — 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил; ПОЛ — перекисное окисление липидов.

База данных геропротекторных соединений Geroprotectors.org (<http://geroprotectors.org/>) включает данные о более чем 250 соединениях, которые увеличивают продолжительность жизни у 11 модельных организмов, включая дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), нематод (*Caenorhabditis elegans*), мух (*Drosophila melanogaster*) и мышей (*Mus musculus*) [9]. Кроме того, база данных DrugAge (<http://genomics.senescence.info/drugs/>) содержит описание более 400 препаратов, соединений и добавок (включая натуральные продукты и нутрицевтики), оказывающих положительное влияние на продолжительность жизни [10].

Следует отметить, что потенциальные геропротекторы могут быть не только синтетическими лекарствами, но и поступать в организм с пищей или выделяться симбиотической кишечной

микробиотой [2]. Наибольший интерес представляют источники потенциальных геропротекторов природного происхождения, прежде всего из уже известных лекарственных и пищевых растений [11–16].

Согласно недавно проведенному исследованию [6], геропротекторы могут быть разделены по механизму действия на следующие группы: средства, предотвращающие окислительное повреждение макромолекул (антиоксиданты); регуляторы протеостаза; супрессоры нестабильности генома; эпигенетические препараты; средства, сохраняющие функцию митохондрий; ингибиторы связанных со старением сигнальных путей; горметины; сенолитики/сеностатики; противовоспалительные препараты; антифибротические средства; нейротрофические факторы; факторы, предотвращающие нарушение барьерной функции; иммуномодуляторы; пребиотики, метаболиты и энтеросорбенты.

Благодаря исследованиям, связанным с экспериментальным обоснованием свободнорадикальной теории старения Денхама Хармана [17], эффекты экзогенных антиоксидантов на продолжительность жизни модельных организмов и возрастные заболевания всесторонне изучены [18, 19]. Заметим, что, несмотря на экспериментальное подтверждение повреждающего действия избытка свободных радикалов на эндогенные макромолекулы и клеточные структуры, ведущего к ускорению процесса старения [20] и повышению риска развития возрастзависимых патологий [21], экзогенные антиоксиданты могут не влиять на продолжительность жизни модельных организмов или оказывать как негативный [22, 23], так и позитивный эффект [24–26]. Неоднозначное действие антиоксидантов на продолжительность жизни может быть связано с разносторонней ролью свободных радикалов в важных физиологических процессах [27], включая передачу сигналов внутри клетки [28], метаболизм глюкозы и липидов [29], клеточный рост и пролиферацию [30].

Согласно современным представлениям, геропротекторное действие экзогенных антиоксидантов в большей степени связано с активацией внутриклеточных механизмов антиоксидантной защиты, а не с прямой нейтрализацией свободных радикалов [6, 22]. Кроме того, соединения, называемые “антиоксидантами”, могут вызывать множество эффектов *in vivo*, не связанных с их антиоксидантной активностью, включая обусловленные хелатирующими свойствами, синергическим взаимодействием с продуктами метаболизма, связыванием с малыми макромолекулами, влиянием на микробиоту и противовоспалительным действием [22, 31, 32].

Рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.) является представителем семейства Розовые (*Rosa*

сеae), ее плоды содержат различные биологически активные вещества, обладающие антиоксидантной активностью и геропротекторным потенциалом, в том числе полифенолы, включая флавоноиды (кверцетин и его гликозиды, рутин, изокверцетин и гиперозид), кофейилхиновые кислоты (неохлорогеновая и хлорогеновая кислоты), а также токоферолы, хлорофиллы и каротиноиды (лютеин, зеаксантин, ликопин, β -каротин, α -каротин) [33].

Ранее нами установлено, что экстракты ягод черноплодной рябины (*× Sorbaronia mitschurinii*) [34] и жимолости (*Lonicera pallasii* L.) [35] проявляли антиоксидантную активность как *in vitro*, так и *in vivo*, а также способствовали увеличению продолжительности жизни *D. melanogaster*. Учитывая потенциальную связь между окислительным повреждением и старением, мы предположили, что антиоксидантная активность экстрактов растений — один из механизмов их адаптогенного и геропротекторного действия. Цель представленной работы состояла в исследовании влияния этанольного экстракта ягод рябины обыкновенной (*S. aucuparia* L.) на стрессоустойчивость и продолжительность жизни *D. melanogaster*, а также оценке его антиоксидантного потенциала на моделях *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экстракция плодов рябины обыкновенной. Ягоды рябины обыкновенной (*S. aucuparia* L.) были собраны в Сыктывдинском районе Республики Коми в 2019 году. Получение экстрактов плодов и ВЭЖХ-анализ их состава проводили согласно лабораторным методикам, описанным ранее [34].

Для получения экстракта плоды рябины измельчали до однородной массы, центрифугировали и полученный супернатант смешивали с сухим порошком молотой глины (“Терракот”, Россия). Полученную смесь обрабатывали 0.1 М соляной кислотой (“СигмаТек”, Россия) и снова центрифугировали. Надосадочную жидкость удаляли, а сорбент смешивали с экстрагентом (1%-ным раствором концентрированной соляной кислоты в 95%-ном этаноле) и центрифугировали полученную смесь. Экстрагент удаляли из экстракта на вакуумном ротационном испарителе ИР-1М (“Химлаборприбор”, Россия) при температуре 35°C, а затем выпаривали при температуре 65°C. Сухой остаток растворяли в 95%-ном этаноле при помощи ультразвуковой ванны УЗВ-21/150-ТН (“РЭЛТЕК”, Россия). Антоциановый раствор помещали в чашку Петри и оставляли в вытяжном шкафу до полного высыхания.

ВЭЖХ-МС-анализ экстрактов. Высокоэффективную жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (ВЭЖХ-МС) этанольных экстрактов плодов проводили на жидкостном хроматографе

Thermo Finnigan (“Thermo Fisher Scientific”, США) с использованием диодно-матричного детектора (200–600 нм) в тандеме с масс-селективным детектором той же компании.

Оценка антиоксидантной, антирадикальной активности и эритротоксичности экстрактов. Для оценки антиоксидантной активности спиртового экстракта ягод рябины использован комплекс методов, широко применяющихся в мировой практике и описанных нами в предыдущих исследованиях [35–41]. В качестве клеточной тест-системы использовали эритроциты млекопитающих, которые находят широкое применение при исследовании механизмов токсичности и биологической активности различных соединений.

Инкубацию эритроцитов и субстрата на основе гомогената головного мозга лабораторных животных проводили в термостатируемом шейкере Biosan ES-20 (“Biosan”, Латвия). Поглощение измеряли с помощью спектрофотометра Thermo Spectronic Genesys 20 (“Thermo Fisher Scientific”). Спектры поглощения анализировали с использованием мультипланшетного ридера BMG LABTECH CLARIOstar Plus (“BMG LABTECH”, Германия).

Антирадикальную активность экстракта оценивали по способности взаимодействовать с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH) [42] и диаммониевой солью 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) (ABTS) по стандартным методикам [42–45]. Антиоксидантную активность экстракта оценивали по способности ингибировать накопление продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, — ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) Fe^{2+} /аскорбат-инициированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) в субстрате (эмульсии масло : вода), полученном на основе гомогената головного мозга лабораторных мышей [35, 46–49].

Для анализа эритротоксичности, антиоксидантной и мембранпротекторной активности экстракта использовали также 0.5%-ную (v/v) суспензию эритроцитов лабораторных мышей в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.4). Эритротоксичность оценивали по их способности индуцировать гемолиз. Мембранпротекторную и антиоксидантную активность определяли по степени ингибирования окислительного гемолиза, инициированного 2,2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлоридом (AAPH) либо H_2O_2 [50], торможения накопления вторичных продуктов ПОЛ (ТБК-АП) и окисления оксигемоглобина в эритроцитах [51]. В качестве стандарта использовали раствор тролокса. Каждый эксперимент проводили в 4–10 повторах.

Линия *Drosophila melanogaster*. Для проведения экспериментов использовали линию дикого типа *Canton-S*, полученную из коллекции линий *Dro-*

sophila melanogaster Индианского университета (Bloomington Stock Center at Indiana University, Bloomington, США).

Обработка питательной среды экстрактами ягод. Стоковые растворы экстракта ягод рябины в 95%-ном этаноле в концентрациях 0.01, 0.1, 1.0, 2.0, 2.5, 5.0 и 10.0 мг/мл наносили на поверхность питательной среды в объеме 30 мкл на пробирку и оставляли для абсорбции на 24 ч. В качестве контроля использовали среду с добавлением 30 мкл 95%-ного этанола. Для подтверждения абсорбции экстракта в питательной среде использовали описанную ранее методику [52], в которой учитывается процесс диффузии. В качестве индикатора диффузии использовали 2.5%-ный раствор пищевого красителя бриллиантового голубого FCF (“Roha Dyechem”, Индия) в 95%-ном этаноле. Согласно проведенному исследованию, экстракт равномерно распределялся по поверхности среды, что обеспечивало его равномерное потребление всеми дрозофилами.

Анализ стрессоустойчивости *D. melanogaster*. Перед проведением оценки стрессоустойчивости дрозофил на протяжении 10 сут содержали на среде с добавлением экстракта ягод рябины обыкновенной (эксперимент) или без него (контроль). Для изучения устойчивости к окислительному стрессу мух содержали на питательной среде, состоящей из 2% агара, 5% сахарозы с добавлением 20 мМ параквата (“Sigma-Aldrich”, США). При оценке устойчивости к голоданию мух содержали на 2%-ной агаровой среде без добавления сахарозы. Гипертермию у *D. melanogaster* вызывали постоянным воздействием температуры 35°C.

Для оценки стрессоустойчивости использовали монитор локомоторной активности дрозофилы DAM2 (“Trikinetics”, США). При проведении анализа мух по одной особи рассаживали в прозрачные стеклянные капилляры размером 5 мм × 65 мм. В один конец каждого капилляра помещали агаровую питательную среду в соответствии с условиями эксперимента. С помощью программного обеспечения DAMSystem3 (“Trikinetics”) вели постоянный мониторинг активности отдельных мух путем подсчета числа пересечений инфракрасного датчика посередине капилляра. Мух до конца жизни содержали в стрессовых условиях и считали погибшими, когда они прекращали двигаться. Показатели стрессоустойчивости оценивали по динамике смертности мух и по времени медианной выживаемости в неблагоприятных условиях. Для каждого варианта эксперимента было проанализировано 32 самца и 32 самки. Каждый эксперимент повторяли дважды. Всего проанализировано 64 особи на каждый вариант.

Анализ продолжительности жизни *D. melanogaster*. Мухи были собраны в течение 24 ч после вылупления имаго. С использованием углекислот-

Таблица 1. Исследованные в работе гены и праймеры для оценки их экспрессии

Полное название гена (FlyBase)	Символ (UniProt)	Праймер 5'–3' (прямой/обратный)
<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2</i>	<i>eEF1alpha2</i>	AGGGCAAGAAGTAGCTGGTTTGC/ GCTGCTACTACTGCGTGTGTGTTG
<i>beta-Tubulin at 56D</i>	<i>betaTub56D</i>	GCAACTCCACTGCCATCC/ CCTGCTCCTCCTCGAACT
<i>Ribosomal protein L32</i>	<i>RpL32</i>	GAAGCGCACCAAGCACTTCATC/ CGCCATTTGTGCGACAGCTTAG
<i>Clock</i>	<i>Clk</i>	ATGATGACGCACGTCAGTTCGC/ TCGATGGTGTCTCTCGGTGATGC
<i>period</i>	<i>per</i>	GGGATCATATCGCACGTGGAC/ CTGCGGCCAATCAGGTCCTG
<i>Sirtuin 1</i>	<i>Sirt1</i>	TCCAGGACAGTTAGCAGCAGTG/ GGCTACGATTTTCGCAGCTTCTC
<i>tango</i>	<i>tgo/Hif1</i>	TGAGCACAGGCGACCCAAATTAC/ TGTCTGTATGTTTCGCCTCGTC
<i>cap-n-collar</i>	<i>Cnc/Nrf2</i>	GAGGTGGAAATCGGAGATGA/ CTGCTTGTAGAGCACCTCAGC
<i>Superoxide dismutase 1</i>	<i>Sod1</i>	TGCACGAGTTCGGTGACAACAC/ TCCTTGCCATACGGATTGAAGTGC
<i>Heat shock protein 27</i>	<i>Hsp27</i>	ACTGGGTCGTCGTCGTTATTTCG/ CGCGCGACGTGACATTTGATTG
<i>Heat shock protein 68</i>	<i>Hsp68</i>	TGGGCACATTCGATCTCACTGG/ TAACGTCGATCTTGGGCACTCC
<i>Heat shock protein 83</i>	<i>Hsp83</i>	AAGATGCCAGAAGAAGCAGAGACC/ ATCTTGTCCAGGGCATCGGAAG

ного наркоза (“Genesee Scientific”, США) мух сортировали по полу и случайным образом распределяли в контрольные или экспериментальные пробирки – по 30 особей на пробирку. Начиная с первого дня жизни имаго, ежедневно вели подсчет числа умерших особей, 2 раза в неделю мух переносили на свежую среду. Контрольных и опытных мух содержали при температуре 25°C и 12-часовом режиме освещения. Для поддержания стабильных условий содержания использовали климатические камеры Binder KBF720-ICH (“Binder”, Германия). Состав питательной среды, на которой содержали контрольных и опытных животных при проведении всех экспериментов, был адаптирован из работы Xia & de Belle [53]: вода – 1 л, кукурузная мука – 92 г, сухие дрожжи – 32.1 г, агар-агар – 5.2 г, глюкоза – 136.9 г, раствор 10%-ного нипагина в этаноле – 10 мл, раствор 50%-ной пропионовой кислоты – 10 мл.

Количественная ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции. Перед проведением анализа уровня экспрессии генов стресс-ответа мух на протяжении 14 сут содержали в условиях, аналогичных эксперименту по анализу продолжительности жизни. Для анализа отбирали по 20 самцов и 10 самок на каждый вариант эксперимента.

Экспрессию генов оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции. РНК выделяли с помощью Augum Total RNA Mini Kit (“Bio-Rad”, США) по инструкции изготовителя. Концентрацию РНК измеряли при помощи Quant-iT RNA Assay Kit (“Invitrogen”, США) по инструкции производителя. Из полученной РНК синтезировали кДНК с помощью набора iScript cDNA Synthesis Kit (“Bio-Rad”) по инструкции производителя. Реакционную смесь для проведения ПЦР готовили с использованием qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) и праймеров (“Евроген”) (табл. 1).

ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 (“Bio-Rad”), используя следующую программу: 1) 95°C в течение 30 с; 2) 95°C в течение 10 с; 3) 60°C в течение 30 с; 4) этапы 2 и 3 повторяли 49 раз; 5) этап плавления ДНК. Экспрессию исследуемых генов рассчитывали относительно экспрессии генов “домашнего хозяйства”: *betaTub56D*, *eEF1alpha2*, *RpL32* – с использованием программного обеспечения CFX Manager 3.1 (“Bio-Rad”).

Статистический анализ результатов. Статистическую значимость различий параметров, характеризующих антиоксидантную активность экс-

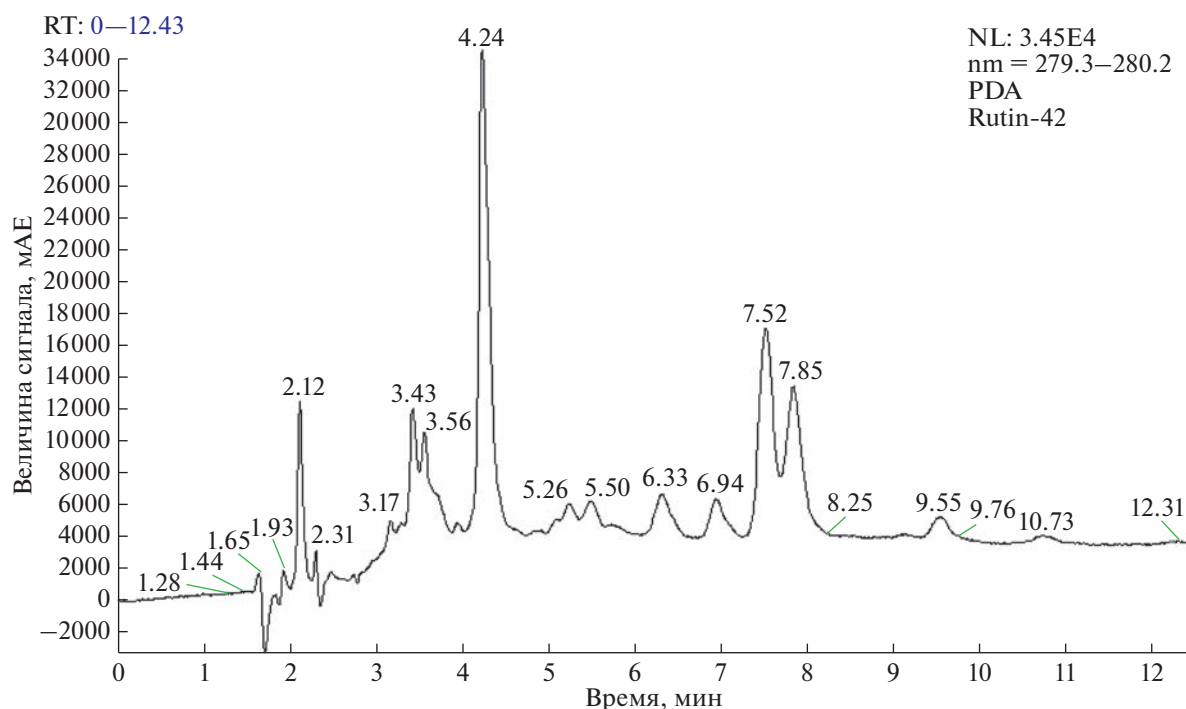


Рис. 1. Хроматограмма экстракта ягод *S. aucuparia*. Рутин (2.12 мин); цианидин-3-рутинозид (4.24 мин). На минутах 6.33, 6.94, 7.52 и 7.85 наблюдался скачок, но идентифицировать соединение не удалось. Калибровка проведена по содержанию в экстракте рутина.

тракта, оценивали по критерию Манна–Уитни. Для статистической оценки различий между кривыми дожития использовали критерий Колмогорова–Смирнова [54]. Для оценки статистической значимости отличий по медианной продолжительности жизни использовали логранговый критерий Манталя–Кокса и критерий Гехана–Бреслоу–Вилкоксона [55, 56]. Достоверность различий по максимальной продолжительности жизни оценивали с помощью метода Ванг–Аллисона [57]. Различия в уровне экспрессии генов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. В случае множественных сравнений использовали поправку Бонферрони. Анализ статистических данных выполняли с помощью программ Excel (“Microsoft”, США), Statistica, версия 6.1 (“StatSoft”, США), статистической среды R, версия 2.15.1 (The R Foundation) и онлайн приложения для анализа выживаемости OASIS 2 [58].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ состава экстракта ягод рябины обыкновенной (*S. aucuparia*)

Анализ экстракта ягод *S. aucuparia* с использованием ВЭЖХ–МС позволил выявить полифенолы рутина (витамин Р) и цианидин-3-рутинозид (рис. 1). Из данных литературы известно, что рутин проявляет нейропротекторное [59] и проти-

водиабетическое действие [60], имеет терапевтический потенциал при болезни Альцгеймера [61], а также увеличивает продолжительность жизни мышей на 10% [62]. Антоциан цианидин-3-рутинозин менее изучен, чем рутин, однако есть данные по его антиоксидантной активности, полученные с использованием культуры клеток эндотелия человека [63]. Нами исследована антиоксидантная активность экстракта ягод рябины методами *in vitro* и *in vivo*.

Антиоксидантная активность экстракта рябины обыкновенной

Установлено, что экстракт ягод рябины в концентрации 0.5 мг/мл проявляет высокую антирадикальную активность в тесте со стабильным радикалом DPPH, а также в тесте с более активным катион-радикалом ABTS⁺ (табл. 2), незначительно уступая стандартному антиоксиданту троллоксу. Полученный результат согласуется с ранее опубликованными данными, согласно которым полифенолы рябины обыкновенной проявляли высокую активность по поглощению радикалов DPPH со значениями концентрации 50%-ного ингибирования (IC₅₀) в диапазоне от 0.3 до 4.3 мг/мл [33, 64].

В концентрации 0.5 мг/мл экстракт ягод рябины статистически значимо ($p = 0.021$) ингиби-

Таблица 2. Показатели, характеризующие антирадикальную и антиоксидантную активность этанольного экстракта рябины в субстрате на основе гомогената головного мозга мышей

Вариант ^a	[Экстракт], мг/мл	Показатель ^b		
		АРА ^c (DPPH), %	АРА (ABTS), %	ТБК-АП ^d , мкМ
Контроль	—	—	—	65.0 ± 0.4
Интактный	—	—	—	32.2 ± 0.6
Эксперимент	0.05	43.6 ± 0.8	63.3 ± 0.1	70.8 ± 0.5
	0.50	88.2 ± 0.2	95.5 ± 0.1	15.9 ± 0.2
Тролокс	0.05	94.9 ± 0.0	99.2 ± 0.1	4.3 ± 0.3
	0.50	95.3 ± 0.1	99.2 ± 0.1	5.1 ± 0.2

^a Контроль — необработанный субстрат, интактный — субстрат, в котором не индуцировали ПОЛ.

^b Данные представлены в виде среднеарифметических значений с указанием стандартной ошибки выборки.

^c Антирадикальная активность.

^d Способность экстракта ингибировать накопление ТБК-АП в субстрате оценивали через 1 ч после Fe²⁺/аскорбат-иницирования ПОЛ.

вал Fe²⁺/аскорбат-иницированное ПОЛ в субстрате на основе гомогената головного мозга лабораторных животных, что следует из снижения в нем концентрации вторичных продуктов окисления — ТБК-АП (табл. 2). В концентрации 0.05 мг/мл экстракт проявлял незначительную прооксидантную активность ($p = 0.021$).

Один из методов, используемых для оценки антиоксидантной активности химических соединений и различных экстрактов, — окислительный гемолиз эритроцитов крови млекопитающих. Вследствие высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот в липидах мембран и наличия гемоглобина — потенциального промотора окислительных процессов — эритроциты чрезвычайно чувствительны к окислительным повреждениям [50, 51, 65]. Этот удобный и доступный подход нашел широкое применение в мировой практике и основан на способности антиоксидантов увеличивать выживаемость эритроцитов и препятствовать окислительной деградации мембранных структур и гемоглобина в условиях окислительного стресса, инициированного различными химическими соединениями, в том числе ААРН и H₂O₂ [50, 66, 67]. Указанные инициаторы различаются по способности проникать в клетку, первичным мишеням воздействия, механизмам и динамике развития окислительного стресса [51, 66].

Прежде чем использовать эритроциты в качестве модельного объекта для оценки антиоксидантной и мембранпротекторной активности экстракта, необходимо было убедиться в отсутствии у него существенной эритротоксичности. По нашим данным, уровень гемолиза интактных эритроцитов через 5 ч инкубации составил $5.91 \pm 0.2\%$, а в присутствии экстракта ягод рябины — $8.2 \pm 0.4\%$. Незначительная эритротоксичность экстракта ягод

рябины, обусловленная присутствием фенольных кислот, обладающих поверхностноактивными свойствами, не препятствовала дальнейшему исследованию его биологической активности с использованием в качестве тест-объекта эритроцитов крови лабораторных животных.

В условиях H₂O₂-индуцированного стресса этанольный экстракт ягод рябины обладал высокой статистически значимой ($p = 0.009$) мембранпротекторной активностью, что следует из снижения интенсивности окислительного гемолиза в его присутствии в течение всего периода инкубации (табл. 3). Экстракт ягод рябины в концентрации 0.05 мг/мл не только увеличивал выживаемость клеток, но и тормозил окисление оксигемоглобина ($p \leq 0.002$), сопровождающееся образованием мет- и феррилгемоглобина, а также препятствовал ($p = 0.009$) накоплению в клетках вторичных продуктов ПОЛ — ТБК-АП (табл. 3). Между тем тролокс в указанной концентрации, хотя и более активно увеличивал выживаемость эритроцитов, проявлял прооксидантную активность ($p = 0.001$) по отношению к их основному белку — гемоглобину (табл. 3).

Высокая статистически значимая ($p = 0.009$) мембранпротекторная активность экстракта ягод рябины выявлена и в условиях ААРН-индуцированного гемолиза (табл. 3). В присутствии и экстракта ягод, и тролокса в течение всего периода проведения эксперимента (5 ч) наблюдали существенное увеличение выживаемости эритроцитов под воздействием пероксильных радикалов, генерируемых при термическом разложении ААРН. О наличии высокой антиоксидантной активности у экстракта ягод рябины свидетельствует и статистически значимое снижение ($p = 0.001$) в его присутствии соотношений metHb/oxuHb и ferrylHb/oxuHb в эритроцитах, характеризующее содержание окислен-

Таблица 3. Мембранпротекторная и антиоксидантная активность этанольного экстракта рябины в концентрации 0.05 мг/мл*

Образец	Гемолиз, %					ТБК-АП, мкМ	metHb/ oxyHb	ferrylHb/ oxyHb
	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч			
Инициатор H ₂ O ₂								
Контроль	25.2 ± 0.2	39.0 ± 0.5	49.4 ± 0.3	58.0 ± 0.3	62.6 ± 0.4	2.01 ± 0.03	0.670 ± 0.017	0.245 ± 0.002
Экстракт рябины	16.3 ± 0.4	28.4 ± 0.4	35.4 ± 0.5	43.0 ± 0.9	47.2 ± 0.6	1.66 ± 0.04	0.583 ± 0.016	0.214 ± 0.004
Тролокс	2.8 ± 0.1	3.6 ± 0.1	4.3 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.3	1.24 ± 0.01	2.096 ± 0.108	0.450 ± 0.020
Инициатор AAPH								
Контроль	2.0 ± 0.0	17.6 ± 0.5	66.4 ± 0.5	88.1 ± 0.9	96.9 ± 0.6	4.10 ± 0.05	0.555 ± 0.028	0.231 ± 0.004
Экстракт рябины	2.4 ± 0.1	3.2 ± 0.0	4.9 ± 0.3	18.6 ± 0.7	55.1 ± 1.1	3.46 ± 0.05	0.309 ± 0.014	0.151 ± 0.003
Тролокс	2.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.5 ± 0.1	4.5 ± 0.2	5.4 ± 0.2	2.33 ± 0.07	0.738 ± 0.028	0.179 ± 0.004

*Примечание. Данные представлены в виде среднеарифметических значений с указанием стандартной ошибки выборки. Представлен уровень H₂O₂- и ААРН-индуцированного гемолиза через 1–5 ч инкубации клеток, а также соотношение окисленных (metHb, ferrylHb) и нативной (oxyHb) форм гемоглобина в эритроцитах.

ной и нативной форм этого белка, а также уменьшение концентрации ТБК-АП ($p = 0.009$) по сравнению с контролем (табл. 3). Отметим, что и в этом эксперименте тролокс проявлял прооксидантную активность по отношению к гемоглобину ($p = 0.001$).

Принимая во внимание высокую антиоксидантную активность этанольного экстракта рябины *in vitro*, на следующем этапе мы оценили эффект экстракта рябины обыкновенной на устойчивость дрозophil к неблагоприятным факторам среды, включая воздействие параквата.

Влияние экстракта рябины обыкновенной на стрессоустойчивость D. melanogaster

Исследовано влияние экстракта рябины обыкновенной *S. aucuparia* в концентрациях 0.1, 1.0, 2.0 и 5.0 мг/мл на устойчивость мух к индуктору окислительного стресса параквату, голоданию и гипертермии (рис. 2, табл. 4).

Установлено, что экстракт ягод рябины не оказывал влияния на устойчивость самцов *D. melanogaster* к окислительному стрессу (рис. 2а, табл. 4). В тоже время у самок экстракт в концентрации 5 мг/мл существенно снижал устойчивость к окислительному стрессу, проявляя прооксидантную активность (рис. 2б, табл. 4). Интересно, что экстракт ягод *S. aucuparia* при использовании во всех изученных концентрациях позитивно влиял на устойчивость самцов к голоданию (рис. 2в, табл. 4), не оказывая статистически значимого эффекта на устойчивость к голоданию самок (рис. 2г, табл. 4). При обработке самцов экстрактом в концентрации 5 мг/мл их устойчивость к гипертермии снижалась (рис. 2д, табл. 4), в то

время как у самок в концентрациях 2 и 5 мг/мл повышал устойчивость к термическому стрессу (рис. 2е, табл. 4).

Таким образом, адаптогенные эффекты экстракта ягод рябины зависели от концентрации препарата и от пола дрозophil. Антиоксиданты, присутствующие в ягодах и фруктах, в отдельных случаях могут оказывать не только антиоксидантный, но и прооксидантный эффект, приводя к окислительному повреждению и гибели клеток [68]. Учитывая неоднозначное действие антиоксидантов на продолжительность жизни модельных организмов, далее исследовали геропротекторный потенциал экстракта ягод *S. aucuparia*.

Влияние экстракта ягод рябины обыкновенной на продолжительность жизни D. melanogaster

Исследованы эффекты этанольного экстракта ягод *S. aucuparia* в концентрациях 0.01, 0.1, 1.0, 2.0, 2.5, 5.0 и 10.0 мг/мл на продолжительность жизни *D. melanogaster* (рис. 3, табл. 5). Установлено, что экстракт увеличивал медианную продолжительность жизни у самцов на 3% ($p < 0.0001$) при концентрации 2, 5 и 10 мг/мл. Однако при концентрации 2.5 мг/мл медианная продолжительность жизни снижалась на 7% ($p < 0.001$). Увеличение максимальной продолжительности жизни зарегистрировано на 6% ($p < 0.0001$) при концентрации экстракта 0.1 мг/мл и на 4% ($p < 0.01$) при концентрации 2 мг/мл. В то время как у самок экстракт ягод *S. aucuparia* увеличивал медианную продолжительность жизни на 6% ($p < 0.01$) при концентрации 1 мг/мл и на 5% ($p < 0.05$) при 2 мг/мл, максимальная продолжительность жизни

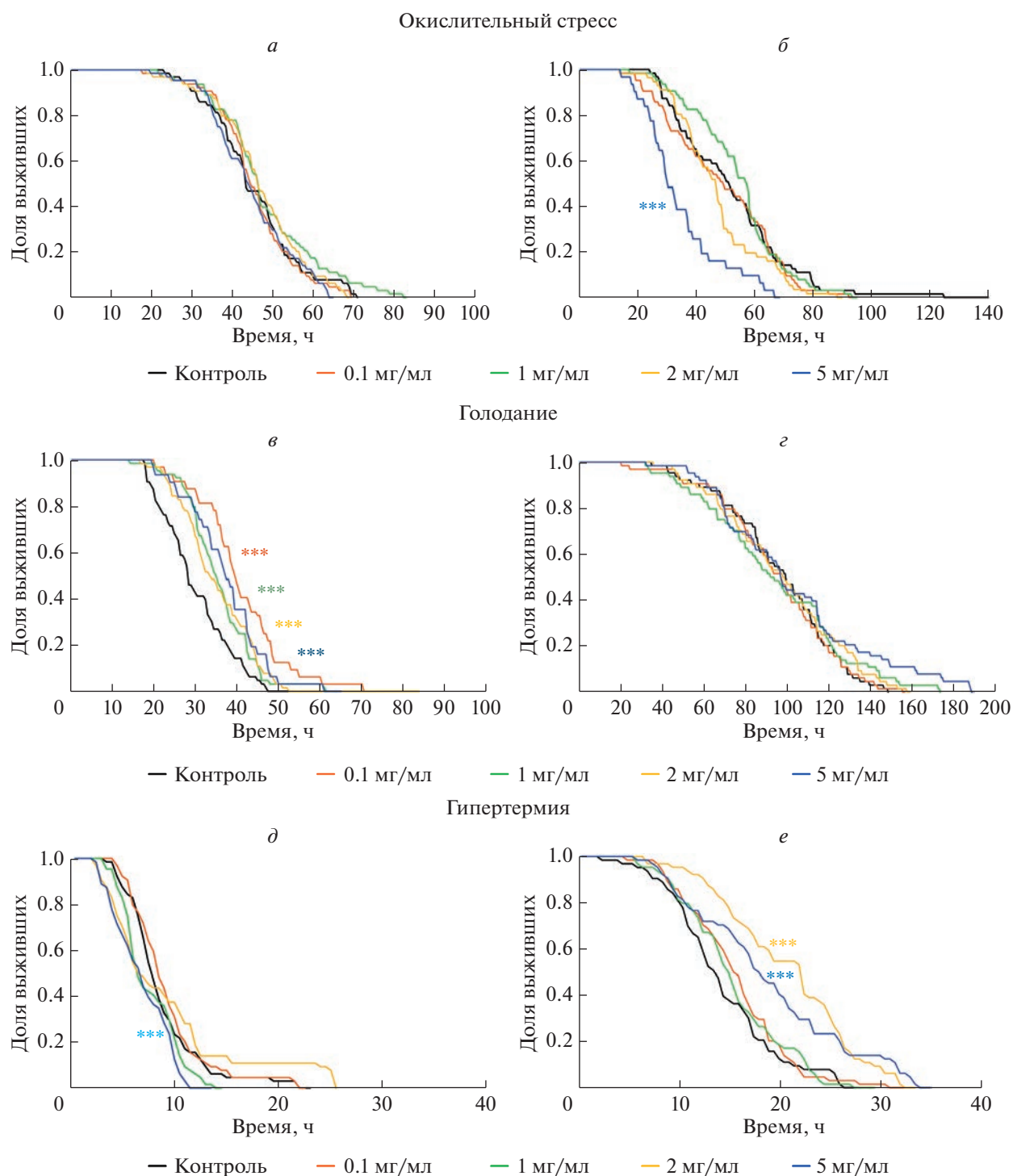


Рис. 2. Влияние этанольного экстракта ягод *S. aucuparia* на устойчивость самцов (а, в, д) и самок (б, г, е) *D. melanogaster* к окислительному стрессу (а, б), голоданию (в, г) и гипертермии (д, е). Внизу рисунка указаны концентрации экстракта. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (логранговый критерий).

ни была значительно увеличена на 8% ($p < 0.01$) при концентрации 1 мг/мл.

В опубликованных ранее исследованиях по влиянию экстрактов растений семейства Розоцветных на модельных животных также показаны геропротекторные эффекты. Так, обработка экс-

трактом яблока сорта Ред Делишес приводила к увеличению средней продолжительности жизни *Caenorhabditis elegans* на 39% [69]. Экстракт розы дамасской (*Rosa damascena*) вызывал увеличение средней продолжительности жизни *D. melanogaster* до 32% у самок и до 22% у самцов [70].

Таблица 4. Влияние экстракта рябины обыкновенной на медианную выживаемость самцов и самок *D. melanogaster* в неблагоприятных условиях*

[Экстракт], мг/мл	Пол	М, ч	dM, %	ВА, <i>p</i>	Φ, <i>p</i>	ЛР, <i>p</i>	<i>N</i>
<i>Окислительный стресс</i>							
0 (контроль)	♂	46	n/a	n/a	n/a	n/a	64
0.1	♂	46	+2	>0.05	>0.05	>0.05	64
1.0	♂	49	+7	>0.05	>0.05	>0.05	63
2.0	♂	47	+7	>0.05	>0.05	>0.05	64
5.0	♂	45	0	>0.05	>0.05	>0.05	64
0 (контроль)	♀	52	n/a	n/a	n/a	n/a	63
0.1	♀	49	–4	>0.05	>0.05	>0.05	63
1.0	♀	55	+12	>0.05	>0.05	>0.05	63
2.0	♀	48	+10	>0.05	>0.05	>0.05	56
5.0	♀	35	+40	<0.001	<0.001	<0.001	31
<i>Голодание</i>							
0 (контроль)	♂	30	n/a	n/a	n/a	n/a	63
0.1	♂	41	+38	<0.001	<0.001	<0.001	64
1.0	♂	36	+21	<0.05	<0.05	<0.001	64
2.0	♂	35	+17	>0.05	>0.05	<0.001	64
5.0	♂	38	+31	<0.001	<0.001	<0.001	31
0 (контроль)	♀	99	n/a	n/a	n/a	n/a	64
0.1	♀	98	–2	>0.05	>0.05	>0.05	64
1.0	♀	98	–3	>0.05	>0.05	>0.05	64
2.0	♀	103	+2	>0.05	>0.05	>0.05	64
5.0	♀	104	–3	>0.05	>0.05	>0.05	64
<i>Гипертермия</i>							
0 (контроль)	♂	9	n/a	n/a	n/a	n/a	64
0.1	♂	10	+13	>0.05	>0.05	>0.05	64
1.0	♂	8	–13	>0.05	>0.05	>0.05	64
2.0	♂	10	+13	>0.05	>0.05	>0.05	64
5.0	♂	7	–13	>0.05	>0.05	<0.05	63
0 (контроль)	♀	15	n/a	n/a	n/a	n/a	63
0.1	♀	16	+14	>0.05	>0.05	>0.05	64
1.0	♀	16	+7	>0.05	>0.05	>0.05	64
2.0	♀	21	+64	<0.001	<0.001	<0.001	64
5.0	♀	19	+29	<0.001	<0.001	<0.001	64

*Примечание. ♂ – самцы; ♀ – самки; М – медианная выживаемость (ч); dM – различия между медианной выживаемостью контрольных и экспериментальных мух (%); ВА – тест Ванг–Аллисона; Φ – точный критерий Фишера; ЛР – логранговый критерий; *N* – число особей в выборке; n/a – неприменимо; (+) – положительный эффект; (–) – отрицательный эффект.

Влияние экстракта рябины обыкновенной на уровень экспрессии генов ответа на стресс у D. melanogaster

Ранее в многочисленных исследованиях установлено, что долгоживущие мутанты дрожжей, нематод, мух и мышей характеризуются повышенной устойчивостью к голоданию, окислительному стрессу, тепловому и холодовому шоку

[71–74]. Нами проведен анализ эффектов экстракта ягод *S. aucuparia* на уровень активности генов клеточного ответа на стресс, ассоциированных со старением, включая гены теплового шока (*Hsp27*, *Hsp68*, *Hsp83*), гены устойчивости к окислительному стрессу (*tgo/Hif1*, *cnc/Nrf2*, *Sod1*), гены циркадных ритмов (*Clk*, *per*) и ген долголетия *Sirt1*.

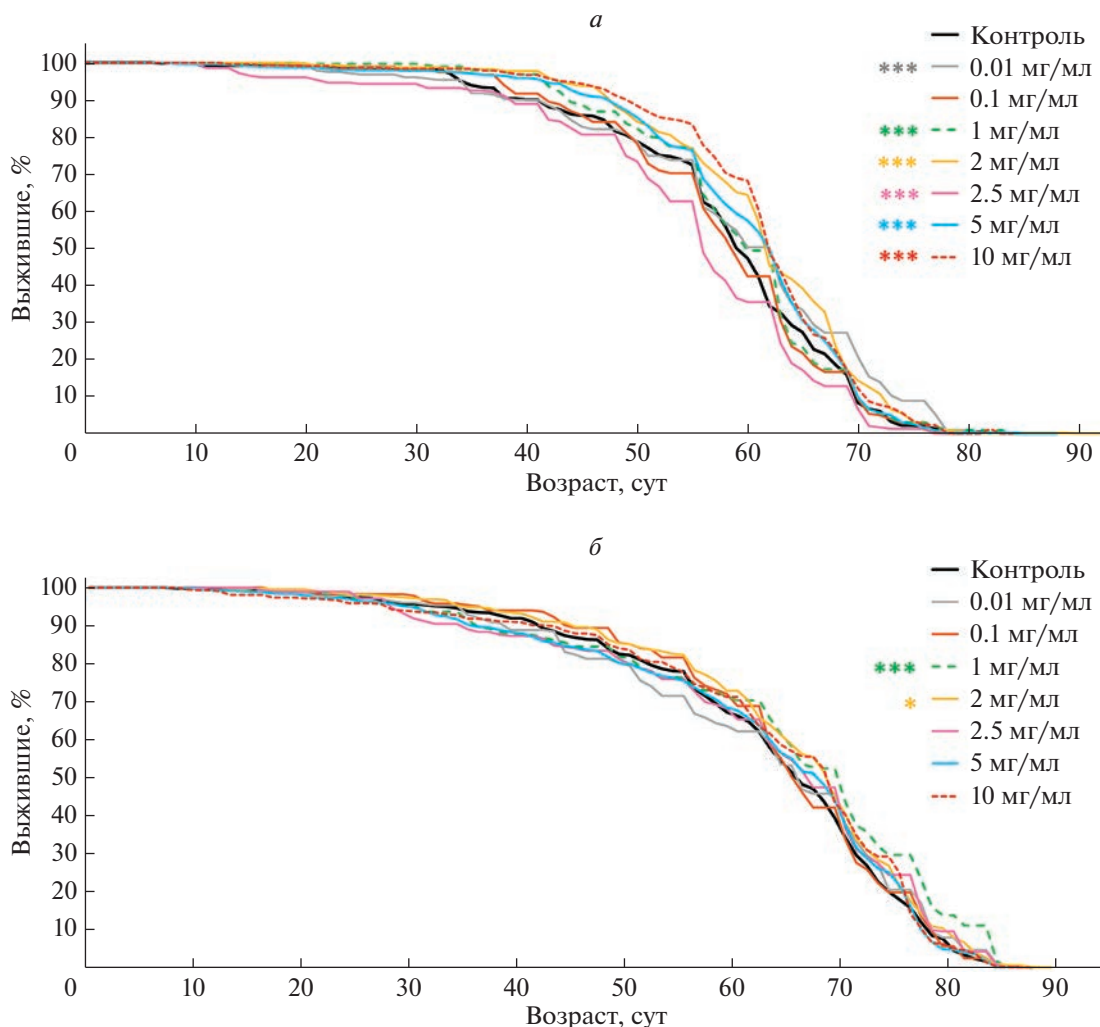


Рис. 3. Влияние экстракта рябины обыкновенной (*S. aucuparia*) на продолжительность жизни самцов (а) и самок (б) *D. melanogaster*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (критерий Колмогорова–Смирнова).

Установлено, что у самцов *D. melanogaster* обработка экстрактом ягод *S. aucuparia* статистически значимо снижала уровень экспрессии большинства генов, включая *Clk* (на 67%, $p < 0.001$), *Sirt1*, *igo/Hif1*, *cnc/Nrf2* и *Sod1* (более чем на 70%, $p < 0.01$), *Hsp68* и *Hsp83* (до 61%, $p < 0.01$), однако вызывала увеличение уровня экспрессии генов *per* (на 45%, $p < 0.001$) и *Hsp27* (на 16%, $p < 0.05$) (рис. 4а, табл. 6). В свою очередь, у самок обработка экстрактом ягод *S. aucuparia* вызывала снижение уровня экспрессии генов *Hsp27*, *Hsp83*, *igo/Hif1*, *Sod1* (более чем на 65%, $p < 0.001$) и *per* (на 53%, $p < 0.001$), однако увеличивала активность *Sirt1* (на 54%, $p < 0.05$) (рис. 4б, табл. 6).

Таким образом, экстракт рябины обыкновенной *S. aucuparia* оказывает разнонаправленный (как увеличивает, так и подавляет) эффект на уровень экспрессии изученных нами генов клеточного ответа на стресс у особей *D. melanogaster*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современным представлениям, старение — сложный биологический процесс, который сопровождается зависимым от возраста постепенным снижением физиологических функций организма [75]. Продолжительность жизни организма зависит от генетических факторов, условий окружающей среды и образа жизни [16, 76]. Долголетие нераздельно связано с правильным питанием, предполагающим употребление растительных соединений, способствующих поддержанию здоровья организма [11–13, 77]. Определение потребностей организма в конкретном веществе или сочетании веществ для поддержания здоровья в течение всей жизни — задача исследований, связанных с долголетием.

В представленной работе мы оценили антиоксидантную активность спиртового экстракта ягод рябины обыкновенной с использованием различ-

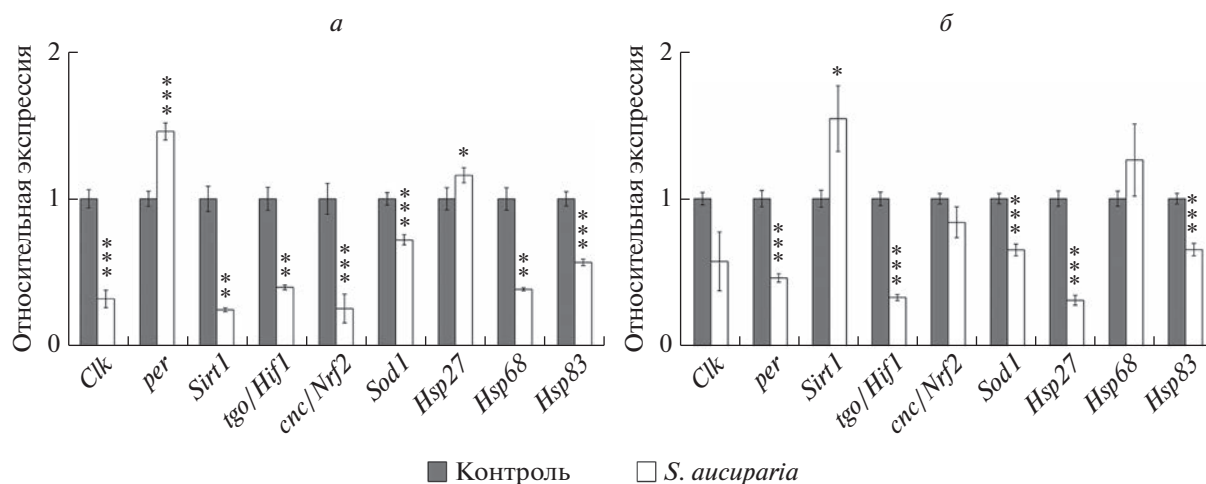


Рис. 4. Влияние экстракта ягод *S. aucuparia* в концентрации 5 мг/мл на уровень экспрессии генов ответа на стресс у самцов (а) и самок (б) *D. melanogaster*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (t -критерий Стьюдента).

ных тест-систем, включая эритроциты крови млекопитающих. Показано, что полученный экстракт отличается высокой антирадикальной активностью в тестах с DPPH и ABTS⁺, а также эффективно ингибирует Fe²⁺/аскорбат-иницированное окисление ПОЛ в гетерогенном субстрате

(эмульсии масло : вода), содержащем липиды головного мозга лабораторных животных (табл. 2). Установлено, что экстракт ягод рябины проявляет высокую мембранпротекторную и антиоксидантную активность на модели окислительного гемолиза, инициированного H₂O₂ и AAPH (табл. 3),

Таблица 5. Влияние экстракта ягод рябины обыкновенной *S. aucuparia* на продолжительность жизни *D. melanogaster**

[Экстракт], мг/мл	М, сут	dM, %	МК, p	ГБВ, p	90%, сут	d90%, %	ВА, p	N
<i>Самцы</i>								
0 (контроль)	61	n/a	n/a	n/a	71	n/a	n/a	569
0.01	64	+5	<0.001	>0.05	75	+6	<0.0001	278
0.1	60	-2	>0.05	>0.05	71	0	>0.05	275
1.0	61	0	>0.05	>0.05	71	0	>0.05	281
2.0	63	+3	<0.0001	<0.0001	74	+4	<0.01	395
2.5	57	-7	<0.001	<0.001	71	0	>0.05	278
5.0	63	+3	<0.05	<0.001	71	0	>0.05	676
10.0	63	+3	<0.001	<0.0001	72	+1	>0.05	421
<i>Самки</i>								
0 (контроль)	67	n/a	n/a	n/a	79	n/a	n/a	719
0.01	67	0	>0.05	>0.05	79	0	>0.05	277
0.1	67	0	>0.05	>0.05	79	0	>0.05	282
1.0	71	+6	<0.0001	<0.01	85	+8	<0.01	296
2.0	70	+5	<0.05	<0.05	81	+3	>0.05	423
2.5	68	+2	>0.05	>0.05	79	0	>0.05	282
5.0	69	+3	>0.05	>0.05	78	-1	>0.05	965
10.0	70	+5	>0.05	>0.05	79	0	>0.05	413

* Примечание. М – медианная продолжительность жизни (сут); dM – различия между медианной продолжительностью жизни контрольных и экспериментальных мух (%); МК – критерий Мантеля–Кокса; ГБВ – критерий Гехана–Бреслоу–Вилкоксона; 90% – возраст гибели 90% особей выборки (сут); d90% – различия между возрастом гибели 90% особей в контрольной и экспериментальной выборке (%); ВА – тест Ванг–Аллисона; N – число особей в выборке; n/a – неприменимо; (+) – положительный эффект; (–) – отрицательный эффект.

Таблица 6. Влияние экстракта ягод рябины обыкновенной в концентрации 5 мг/мл на относительный уровень экспрессии генов клеточного ответа на стресс

Ген	Относительная экспрессия ^a			
	самцы		самки	
	контроль	эксперимент	контроль	эксперимент
<i>Clk</i>	1.00 ± 0.06	0.323 ± 0.06***	1.00 ± 0.04	0.577 ± 0.2***
<i>per</i>	1.00 ± 0.05	1.459 ± 0.06***	1.00 ± 0.06	0.465 ± 0.03*
<i>Sirt1</i>	1.00 ± 0.09	0.249 ± 0.01**	1.00 ± 0.06	1.545 ± 0.2***
<i>tgo/Hif1</i>	1.00 ± 0.08	0.402 ± 0.02**	1.00 ± 0.05	0.332 ± 0.02
<i>cnc/Nrf2</i>	1.00 ± 0.11	0.258 ± 0.09***	1.00 ± 0.04	0.842 ± 0.1**
<i>Sod1</i>	1.00 ± 0.04	0.724 ± 0.03***	1.00 ± 0.04	0.655 ± 0.04***
<i>Hsp27</i>	1.00 ± 0.08	1.161 ± 0.05*	1.00 ± 0.05	0.313 ± 0.03***
<i>Hsp68</i>	1.00 ± 0.08	0.388 ± 0.01**	1.00 ± 0.05	1.263 ± 0.25
<i>Hsp83</i>	1.00 ± 0.05	0.572 ± 0.02***	1.00 ± 0.04	0.657 ± 0.04***

^a **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 (*t*-критерий Стьюдента).

увеличивая выживаемость клеток, а также препятствуя накоплению в них вторичных продуктов ПОЛ и окислению гемоглобина. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования спиртового экстракта ягод рябины в качестве эффективного ингибитора свободнорадикальных процессов.

Показано, что экстракт ягод рябины обыкновенной (*S. aucuparia*) может оказывать разнонаправленные эффекты на стрессоустойчивость и продолжительность жизни — в зависимости от его концентрации и пола *D. melanogaster* (рис. 2 и 3). Наибольшее увеличение как медианной, так и максимальной продолжительности жизни самцов и самок наблюдалось при обработке экстрактом ягод рябины в концентрациях менее 2.5 мг/мл, в то время как при концентрациях от 2.5 мг/мл и выше эффекты были менее выражены или вызывали снижение продолжительности жизни (рис. 3, табл. 5). Зависимость эффекта от дозы, при которой воздействие малых концентраций вещества оказывает благотворное или стимулирующее действие, но может быть токсично в больших концентрациях, в целом характерна для фитосоединений и, согласно данным литературы, объясняется явлением гормезиса [78–80]. В настоящее время гормезис связывают с умеренной активацией механизмов внутриклеточной защиты, включая аутофагию, репарацию ДНК, белки теплового шока, сиртуины и антиоксидантную систему [80, 81]. Наблюдаемые различия в эффектах у самцов и самок могут быть связаны с гендерными особенностями активности различных сигнальных путей, таких как инсулин/IGF1 и mTOR [82–84], участвующих в определении стрессоустойчивости и продолжительность жизни.

Эффекты экстракта рябины на уровень экспрессии генов ответа на стресс у дрозофил также имели небольшие различия у особей разного пола (рис. 4). Гены *per* и *Clk* относятся к ключевым компонентам циркадных ритмов, которые регулируют такие биологические процессы, как обмен веществ, циклы сна и бодрствования, а также вовлечены в процессы старения [85]. Известно, что снижение экспрессии гена *per* может привести к снижению устойчивости к неблагоприятным факторам среды, ускоренному старению и уменьшению продолжительности жизни мух и мышей [86, 87]. Это может быть связано с защитным действием *per* против окислительного стресса и связанных с ним возрастных повреждений клеточных макромолекул. По нашим данным, снижение уровня экспрессии *per* происходило только у самок, но не у самцов *D. melanogaster* (рис. 4). Мутации или нокдаун *Clk* могут увеличить продолжительность жизни различных организмов, включая мышей и *C. elegans* [88, 89], что может быть связано с повышением их устойчивости к окислительному стрессу и повреждению ДНК.

Несмотря на важную роль генов *tgo/Hif1* и *Sod1* в поддержании стрессоустойчивости и долголетия, в некоторых случаях сниженный уровень их экспрессии [90, 91] коррелировал с высокой продолжительности жизни. Так, мутация с потерей функции *tgo/Hif1* увеличивала продолжительность жизни нематод и была ассоциирована с низким уровнем стресса эндоплазматической сети [90]. У долгоживущих самок (до 28 лет) урания *Lasius niger* обнаружено подавление уровня экспрессии гена *Sod1* по сравнению с короткоживущими рабочими особями (несколько недель) и самцами (1–2 года), что предполагает также по-

ниженный уровень образования активных форм кислорода в митохондриях [91]. Аналогичным образом снижение уровня экспрессии генов белков теплового шока (Hsp), представляющих из себя молекулярные шапероны, может свидетельствовать об ингибировании фоновой стресс-нагрузки на клетку у экспериментальных особей *D. melanogaster*. Нами показано, что у самцов устойчивость к гипертермии уменьшена, а у самок, напротив, повышена (рис. 2*д* и 2*е*).

Деацетилаза *sirt1*, участвующая в регуляции различных клеточных процессов, включая метаболизм, репарацию ДНК и воспаление, также связана со старением и продолжительностью жизни. Ранее показано, что у мышей с тканеспецифической сверхэкспрессией *Sirt1* в мозге продолжительность жизни увеличена по сравнению с животными дикого типа [92]. Обнаружено, что высокий уровень экспрессии *Sirt1* может быть защитным механизмом против ожирения и липогенеза во время длительного голодания [93] и у некоторых организмов этот ген, будучи вовлечен в сигнальные пути воспалительного и окислительного стресса, ассоциирован с продолжительностью жизни [92, 94].

На основании полученных данных можно предположить, что изменения в экспрессии генов под действием соединений, содержащихся в этанольном экстракте рябины, играют роль в регуляции стрессоустойчивости и продолжительности жизни дрозофил.

Таким образом, экстракт плодов рябины обыкновенной (*S. aucuparia*) проявляет геропротекторную активность, так как соответствует основным (увеличивает продолжительность жизни модельного организма, обладает низкой токсичностью и минимальными побочными эффектами) и вторичным (повышение устойчивости к факторам стресса окружающей среды) критериям геропротектора [95]. Однако необходимы дополнительные исследования, чтобы всесторонне понять влияние пищевых антиоксидантов на процессы старения и продолжительность жизни организма.

Оценка антиоксидантной активности проведена с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Молекулярная биология” Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН).

В работе были использованы мухи (<http://www.skr-rf.ru/usu/471927/>) и мыши (<http://www.skr-rf.ru/usu/471933/>) из научных коллекций экспериментальных животных ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Все исследования с использованием мышей были выполнены *in vitro* на тканях интактных лабораторных животных, без использования животных в качестве объектов эксперимента.

Исследования выполнены в рамках государственного задания ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН по теме “Генетические и функциональные исследования эффектов геропротекторных интервенций на модели *Drosophila melanogaster*” (№ 122040600022-1).

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Partridge L., Deelen J., Slagboom P.E. (2018) Facing up to the global challenges of ageing. *Nature*. **561**, 45–56.
2. Partridge L., Fuentealba M., Kennedy B.K. (2020) The quest to slow ageing through drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 513–532.
3. Moskalev A. (2020) Is anti-ageing drug discovery becoming a reality? *Exp. Opin. Drug Discov.* **15**, 135–138.
4. Yuan L., Alexander P.B., Wang X.F. (2020) Cellular senescence: from anti-cancer weapon to anti-aging target. *Sci. China Life Sci.* **63**, 332–342.
5. Xu K., Guo Y., Li Z., Wang Z. (2019) Aging biomarkers and novel targets for anti-aging interventions. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1178**, 39–56.
6. Moskalev A., Guvatova Z., Lopes I.D.A., Beckett C.W., Kennedy B.K., De Magalhães J.P., Makarov A.A. (2022) Targeting aging mechanisms: pharmacological perspectives. *Trends Endocrinol. Metabolism*. **33**, 266–280.
7. Taormina G., Ferrante F., Vieni S., Grassi N., Russo A., Mirisola M.G. (2019) Longevity: lesson from model organisms. *Genes (Basel)*. **10**, 518.
8. de Magalhães J.P. (2021) Longevity pharmacology comes of age. *Drug Discov. Today*. **26**, 1559–1562.
9. Moskalev A., Chernyagina E., de Magalhães J.P., Barardo D., Thoppil H., Shaposhnikov M., Budovsky A., Fraifeld V.E., Garazha A., Tsvetkov V., Bronovitsky E., Bogomolov V., Scerbacov A., Kuryan O., Gurinovich R., Jellen L.C., Kennedy B., Mamoshina P., Dobrovol'skaya E., Aliper A., Kaminsky D., Zhavoronkov A. (2015) Geroprotectors.org: a new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease. *Aging (Albany NY)*. **7**, 616–628.
10. Barardo D., Thornton D., Thoppil H., Walsh M., Sharifi S., Ferreira S., Anžič A., Fernandes M., Monteiro P., Grum T., Cordeiro R., De-Souza E.A., Budovsky A., Araujo N., Gruber J., Petrascheck M., Fraifeld V.E., Zhavoronkov A., Moskalev A., de Magalhães J.P. (2017) The DrugAge database of aging-related drugs. *Aging Cell*. **16**, 594–597.
11. Moskalev A. (2021) Nutritional regulation of aging and longevity. In: *Nutrition, Food and Diet in Ageing and Longevity*. Eds Rattan S.I.S., Kaur G. Cham. Springer International Publishing, pp. 439–464.
12. Fan X., Fan Z., Yang Z., Huang T., Tong Y., Yang D., Mao X., Yang M. (2022) Flavonoids-natural gifts to promote health and longevity. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 2176.
13. Mechchate H., El Allam A., El Omari N., El Hachlafi N., Shariati M.A., Wilairatana P., Mubarak M.S., Bouyahya A. (2022) Vegetables and their bioactive compounds as anti-aging drugs. *Molecules*. **27**, 2316.

14. Forni C., Facchiano F., Bartoli M., Pieretti S., Facchiano A., D'Arcangelo D., Norelli S., Valle G., Nisini R., Beninati S., Tabolacci C., Jadeja R.N. (2019) Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. *Biomed. Res. Int.* **2019**, 8748253.
15. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**, 118–126.
16. Sharifi-Rad M., Anil Kumar N.V., Zucca P., Varoni E.M., Dini L., Panzarini E., Rajkovic J., Tsouh Fokou P.V., Azzini E., Peluso I., Prakash Mishra A., Nigam M., El Rayess Y., Beyrouthy M.E., Polito L., Iriti M., Martins N., Martorell M., Docea A.O., Setzer W.N., Calina D., Cho W.C., Sharifi-Rad J. (2020) Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Front. Physiol.* **11**, 694.
17. Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300.
18. Beckman K.B., Ames B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547–581.
19. Lin M.T., Flint Beal M. (2003) The oxidative damage theory of aging. *Clin. Neurosci. Res.* **2**, 305–315.
20. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging.* **13**, 757–772.
21. Luo J., Mills K., le Cessie S., Noordam R., van Heemst D. (2020) Ageing, age-related diseases and oxidative stress: what to do next? *Ageing Res. Rev.* **57**, 100982.
22. Sadowska-Bartosz I., Bartosz G. (2014) Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 404680.
23. Shields H.J., Traa A., Van Raamsdonk J.M. (2021) Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: a comprehensive review of comparative and experimental studies. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 628157.
24. Magwere T., West M., Riyahi K., Murphy M.P., Smith R.A., Partridge L. (2006) The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 356–370.
25. Zou Y.X., Ruan M.H., Luan J., Feng X., Chen S., Chu Z.Y. (2017) Anti-aging effect of riboflavin via endogenous antioxidant in fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Nutr. Health Aging.* **21**, 314–319.
26. Le Bourg É. (2001) Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* **498**, 183–186.
27. Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95.
28. Lander H.M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* **11**, 118–124.
29. Yang Y., Wu Y., Sun X.-D., Zhang Y. (2021) Reactive oxygen species, glucose metabolism, and lipid metabolism. In: *Oxidative Stress: Human Diseases and Medicine*. Eds Huang C., Zhang Y. Singapore: Springer Singapore, pp. 213–235.
30. Burdon R.H. (1994) Free radicals and cell proliferation. In: *New Comprehensive Biochemistry*, vol. 28. Eds Rice-Evans C.A., Burdon R.H. Elsevier. Chapter 6, pp. 155–185.
31. Kotha R.R., Tareq F.S., Yildiz E., Luthria D.L. (2022) Oxidative stress and antioxidants – a critical review on *in vitro* antioxidant assays. *Antioxidants.* **11**, 2388.
32. Deledda A., Annunziata G., Tenore G.C., Palmas V., Manzin A., Velluzzi F. (2021) Diet-derived antioxidants and their role in inflammation, obesity and gut microbiota modulation. *Antioxidants* (Basel). **10**, 708.
33. Šavikin K.P., Zdunić G.M., Krstić-Milošević D.B., Šircelj H.J., Stešević D.D., Pljevljakušić D.S. (2017) *Sorbus aucuparia* and *Sorbus aria* as a source of antioxidant phenolics, tocopherols, and pigments. *Chem. Biodivers.* **14**, e1700329.
34. Platonova E.Y., Zemskaya N.V., Shaposhnikov M.V., Golubev D.A., Kukuman D.V., Pakshina N.R., Ulyasheva N.S., Punegov V.V., Patov S.A., Moskalev A. (2022) Geroprotective effects of *Sorbaronia mitschurinii* fruit extract on *Drosophila melanogaster*. *J. Berry Res.* **12**, 73–92.
35. Golubev D., Zemskaya N., Shevchenko O., Shaposhnikov M., Kukuman D., Patov S., Punegov V., Moskalev A. (2022) Honeysuckle extract (*Lonicera pallasii* L.) exerts antioxidant properties and extends the lifespan and healthspan of *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology.* **23**, 215–235.
36. Buravlev E.V., Shevchenko O.G., Anisimov A.A., Suponitsky K.Y. (2018) Novel Mannich bases of α - and γ -mangostins: synthesis and evaluation of antioxidant and membrane-protective activity. *Eur. J. Med. Chem.* **152**, 10–20.
37. Martakov I.S., Shevchenko O.G., Torlopov M.A., Gerasimov E.Y., Sitnikov P.A. (2019) Formation of gallic acid layer on γ -AlOOH nanoparticles surface and their antioxidant and membrane-protective activity. *J. Inorg. Biochem.* **199**, 110782.
38. Martakov I.S., Shevchenko O.G., Torlopov M.A., Sitnikov P.A. (2022) Colloidally stable conjugates of phenolic acids with γ -AlOOH nanoparticles as efficient and biocompatible nanoantioxidants. *J. Mol. Struct.* **1248**, 131471.
39. Popova S.A., Pavlova E.V., Shevchenko O.G., Chukicheva I.Y., Kutchin A.V. (2021) Isobornylchalcones as scaffold for the synthesis of diarylpyrazolines with antioxidant activity. *Molecules.* **26**, 3579.
40. Nikonova N.N., Hurshkainen T.V., Kuchin A.V., Shevchenko O.G. (2022) “Green technology” processing of pine (*Pinus sylvestris* L.) and larch (*Larix sibirica* Ledeb.) wood greenery to produce bioactive extracts. *Holzforschung.* **76**, 276–284.
41. Torlopov M., Shevchenko O., Drozd N., Udoratina E. (2023) Cationic starch-based hemocompatible polymeric antioxidant: synthesis, *in vitro*, and *in vivo* study. *React. Funct. Polym.* **182**, 105457.
42. Sevgi K., Tepe B., Sarikurkcu C. (2015) Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem. Toxicol.* **77**, 12–21.
43. Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.-O., Dommes J. (2009) Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* **113**, 1226–1233.
44. Celik S.E., Ozyürek M., Güçlü K., Apak R. (2010) Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta.* **81**, 1300–1309.

45. Boulebd H., Zine Y., Khodja I.A., Mermer A., Demir A., Debache A. (2022) Synthesis and radical scavenging activity of new phenolic hydrazone/hydrazide derivatives: experimental and theoretical studies. *J. Mol. Struct.* **1249**, 131–146.
46. Chawla R., Arora R., Kumar R., Sharma A., Prasad J., Singh S., Sagar R., Chaudhary P., Shukla S., Kaur G., Sharma R.K., Puri S.C., Dhar K.L., Handa G., Gupta V.K., Qazi G.N. (2005) Antioxidant activity of fractionated extracts of rhizomes of high-altitude *Podophyllum hexandrum*: role in radiation protection. *Mol. Cell Biochem.* **273**, 193–208.
47. Acker C.I., Brandão R., Rosário A.R., Nogueira C.W. (2009) Antioxidant effect of alkynylselenoalcohol compounds on liver and brain of rats *in vitro*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **28**, 280–287.
48. Kim J. (2013) Preliminary evaluation for comparative antioxidant activity in the water and ethanol extracts of dried citrus fruit (*Citrus unshiu*) peel using chemical and biochemical *in vitro* assays. *Food Nutrition Sci.* **4**, 177–188.
49. Stefanello S.T., Prestes A.S., Ogunmoyole T., Salman S.M., Schwab R.S., Brender C.R., Dornelles L., Rocha J.B., Soares F.A. (2013) Evaluation of *in vitro* antioxidant effect of new mono and diselenides. *Toxicol. In Vitro.* **27**, 1433–1439.
50. Takebayashi J., Chen J., Tai A. (2010) A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Methods Mol. Biol.* **594**, 287–296.
51. van den Berg J.J., Op den Kamp J.A., Lubin B.H., Roelofs B., Kuypers F.A. (1992) Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* **12**, 487–498.
52. Landis G.N., Doherty D., Tower J. (2020) Analysis of *Drosophila melanogaster* Lifespan. In: *Aging: Methods and Protocols*. Ed. Curran S.P. New York: Springer US, pp. 47–56.
53. Xia B., de Belle J.S. (2016) Transgenerational programming of longevity and reproduction by post-eclosion dietary manipulation in *Drosophila*. *Aging (Albany NY)*. **8**, 1115–1134.
54. Fleming T.R., O'Fallon J.R., O'Brien P.C., Harrington D.P. (1980) Modified Kolmogorov–Smirnov Test procedures with application to arbitrarily right-censored data. *Biometrics.* **36**, 607–625.
55. Bland J.M., Altman D.G. (1998) Survival probabilities (the Kaplan–Meier method). *BMJ.* **317**, 1572.
56. Mantel N. (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother. Rep.* **50**, 163–170.
57. Wang C., Li Q., Redden D.T., Weindruch R., Allison D.B. (2004) Statistical methods for testing effects on “maximum lifespan”. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 629–632.
58. Han S.K., Lee D., Lee H., Kim D., Son H.G., Yang J.S., Lee S.V., Kim S. (2016) OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget.* **7**, 56147–56152.
59. Budzyska B., Faggio C., Kruk-Slomka M., Samec D., Nabavi S.F., Sureda A., Devi K.P., Nabavi S.M. (2019) Rutin as neuroprotective agent: from bench to bedside. *Curr. Med. Chem.* **26**, 5152–5164.
60. Ghorbani A. (2017) Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomed. Pharmacother.* **96**, 305–312.
61. Habtemariam S. (2016) Rutin as a natural therapy for alzheimer's disease: insights into its mechanisms of action. *Curr. Med. Chem.* **23**, 860–873.
62. Li S., Li J., Pan R., Cheng J., Cui Q., Chen J., Yuan Z. (2022) Sodium rutin extends lifespan and health span in mice including positive impacts on liver health. *Br. J. Pharmacol.* **179**, 1825–1838.
63. Ockermann P., Lizio R., Hansmann J. (2022) Healthberry 865® and a subset of its single anthocyanins attenuate oxidative stress in human endothelial *in vitro* models. *Nutrients.* **14**, 2917.
64. Sarv V., Venskutonis P.R., Rätsep R., Aluvee A., Kaznavičiūtė R., Bhat R. (2021) Antioxidants characterization of the fruit, juice, and pomace of sweet rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.) cultivated in Estonia. *Antioxidants (Basel)*. **10**, 1779.
65. Clemens M.R., Waller H.D. (1987) Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Physics Lipids.* **45**, 251–268.
66. Ko F.N., Hsiao G., Kuo Y.H. (1997) Protection of oxidative hemolysis by demethyldiisoeugenol in normal and beta-thalassemic red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 215–222.
67. Krokosz A., Grebowski J., Szveda-Lewandowska Z., Rodacka A., Puchala M. (2013) Can melatonin delay oxidative damage of human erythrocytes during prolonged incubation? *Adv. Med. Sci.* **58**, 134–142.
68. Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud L.L., Simonetti R.G., Gluud C. (2012) Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, Cd007176.
69. Vayndorf E.M., Lee S.S., Liu R.H. (2013) Whole apple extracts increase lifespan, healthspan and resistance to stress in *Caenorhabditis elegans*. *J. Funct. Foods.* **5**, 1236–1243.
70. Schriener S.E., Katoozi N.S., Pham K.Q., Gazarian M., Zarban A., Jafari M. (2012) Extension of *Drosophila* lifespan by *Rosa damascena* associated with an increased sensitivity to heat. *Biogerontology.* **13**, 105–117.
71. Fabrizio P., Pozza F., Pletcher S.D., Gendron C.M., Longo V.D. (2001) Regulation of longevity and stress resistance by *Sch9* in yeast. *Science.* **292**, 288–290.
72. Johnson T.E., de Castro E., Hegi de Castro S., Cypser J., Henderson S., Tedesco P. (2001) Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* **36**, 1609–1617.
73. Longo V.D. (2003) The Ras and Sch9 pathways regulate stress resistance and longevity. *Exp. Gerontol.* **38**, 807–811.
74. Perez V.I., Bokov A., Van Remmen H., Mele J., Ran Q., Ikeno Y., Richardson A. (2009) Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**, 1005–1014.
75. Rose M., Flatt T., Graves J., Jr., Greer L.F., Martínez D., Matos M., Mueller L., Shmookler Reis R., Shahrestani P. (2012) What is aging? *Front. Genetics.* **3**, 134.
76. Ekmekcioglu C. (2020) Nutrition and longevity – from mechanisms to uncertainties. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **60**, 3063–3082.
77. Ohlhorst S.D., Russell R., Bier D., Klurfeld D.M., Li Z., Mein J.R., Milner J., Ross A.C., Stover P., Konopka E. (2013) Nutrition research to affect food and a healthy life span. *J. Nutr.* **143**, 1349–1354.

78. Calabrese E.J. (2003) The maturing of hormesis as a credible dose-response model. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* **1**, 319–343.
79. Son T.G., Camandola S., Mattson M.P. (2008) Hormetic dietary phytochemicals. *Neuromolecular Med.* **10**, 236–246.
80. Martel J., Ojcius D.M., Ko Y.F., Ke P.Y., Wu C.Y., Peng H.H., Young J.D. (2019) Hormetic effects of phytochemicals on health and longevity. *Trends Endocrinol. Metab.* **30**, 335–346.
81. Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova A.T., Iavicoli I., Di Paola R., Koverech A., Cuzzocrea S., Rizzarelli E., Calabrese E.J. (2012) Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1822**, 753–783.
82. Tower J. (2017) Sex-specific gene expression and life span regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 735–747.
83. Garratt M. (2020) Why do sexes differ in lifespan extension? Sex-specific pathways of aging and underlying mechanisms for dimorphic responses. *Nutr. Healthy Aging.* **5**, 247–259.
84. Lushchak O., Strilbytska O., Storey K.B. (2023) Gender-specific effects of pro-longevity interventions in *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* **209**, 111754.
85. Dubowy C., Sehgal A. (2017) Circadian rhythms and sleep in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **205**, 1373–1397.
86. Krishnan N., Kretschmar D., Rakshit K., Chow E., Giebultowicz J.M. (2009) The circadian clock gene *period* extends healthspan in aging *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY).* **1**, 937–948.
87. Fu L., Pelicano H., Liu J., Huang P., Lee C. (2002) The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response *in vivo*. *Cell.* **111**, 41–50.
88. Liu X., Jiang N., Hughes B., Bigras E., Shoubridge E., Hekimi S. (2005) Evolutionary conservation of the *clk-1*-dependent mechanism of longevity: loss of *mclk1* increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes Dev.* **19**, 2424–2434.
89. Wong A., Boutis P., Hekimi S. (1995) Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics.* **139**, 1247–1259.
90. Chen D., Thomas E.L., Kapahi P. (2009) HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genetics.* **5**, e1000486.
91. Parker J.D., Parker K.M., Sohal B.H., Sohal R.S., Keller L. (2004) Decreased expression of Cu–Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 3486–3489.
92. Satoh A., Brace C.S., Rensing N., Clifton P., Wozniak D.F., Herzog E.D., Yamada K.A., Imai S. (2013) Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab.* **18**, 416–430.
93. Higgins C.B., Mayer A.L., Zhang Y., Franczyk M., Ballentine S., Yoshino J., DeBosch B.J. (2022) SIRT1 selectively exerts the metabolic protective effects of hepatocyte nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Nat. Commun.* **13**, 1074.
94. Pardo P.S., Boriek A.M. (2020) SIRT1 Regulation in ageing and obesity. *Mech. Ageing Dev.* **188**, 111249.
95. Moskalev A., Chernyagina E., Tsvetkov V., Fedintsev A., Shaposhnikov M., Krut'ko V., Zhavoronkov A., Kennedy B.K. (2016) Developing criteria for evaluation of geroprotectors as a key stage toward translation to the clinic. *Aging Cell.* **15**, 407–415.

Antioxidant and Geroprotective Properties of the Extract of Mountain Ash (*Sorbus aucuparia* L.) Fruits

E. Yu. Platonova^{1, 2}, D. A. Golubev^{1, 2}, N. V. Zemskaya¹, O. G. Shevchenko¹, S. A. Patov³,
M. V. Shaposhnikov¹, and A. A. Moskalev^{1, *}

¹Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia

²Pitirim Sorokin Syktyvkar State University, Syktyvkar, 167001 Russia

³Institute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167000 Russia

*e-mail: amoskalev@ib.komisc.ru

Plant polyphenols are characterized by a wide range of biological activities, including antioxidant properties, and have a high geroprotective potential. The purpose of this work was to investigate the effect of the extract of rowan berries (*Sorbus aucuparia* L.) on the lifespan and stress resistance of *Drosophila melanogaster* with the identification of possible mechanisms of its biological activity. It has been established that the ethanol extract of *S. aucuparia* berries, the main components of which are rutin and cyanidin-3-rutinoside, has a pronounced antioxidant activity *in vitro*. At the same time, treatment with rowan berry extract increased the resistance of *D. melanogaster* males to starvation, but reduced resistance to hyperthermia. In females, the extract reduced resistance to oxidative stress but increased resistance to hyperthermia. The effects of rowan berry extract on longevity depended both on its concentration and on the sex of fruit flies. In response to treatment with rowan berry extract, *D. melanogaster* males and females showed slight differences in the background level of expression of cellular stress response genes, including heat shock genes (*hsp27*, *hsp68*, *hsp83*), oxidative stress resistance genes (*hif1*, *nrf2*, *sod1*), circadian rhythm genes (*clk*, *per*), and the longevity gene *sirt1*, which may explain the differences in the observed effects.

Keywords: *Sorbus aucuparia*, extract, *Drosophila melanogaster*, geroprotector, lifespan, antioxidant activity

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ

УДК 579.2

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТИОЛЫ КАК ФАКТОР, УСИЛИВАЮЩИЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МУТАНТОВ *Escherichia coli* С НАРУШЕННЫМ СИНТЕЗОМ ADP-ГЕПТОЗЫ К АНТИБИОТИКАМ

© 2023 г. Т. А. Серегина^{а, *, #}, И. Ю. Петрушанко^{а, **, #}, П. И. Зарипов^а, Ю. Д. Кулешова^а,
К. В. Лобанов^а, Р. С. Шакулов^а, В. А. Митькевич^а, А. А. Макаров^а, А. С. Миронов^а

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: tatyana.s82@gmail.com

**e-mail: irina-pva@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2023 г.

После доработки 13.07.2023 г.

Принята к публикации 13.07.2023 г.

Низкомолекулярные тиолы, такие как глутатион и цистеин, являются неотъемлемой частью системы редокс-регуляции клетки. Ранее мы показали, что на фоне инактивации синтеза ADP-гептозы, связанной с делецией *gmhA*, в клетках *Escherichia coli* развивается окислительный стресс, сопровождающийся перестройкой гомеостаза тиолов и повышением чувствительности к антибиотикам. В представленной работе обнаружено, что ограничение метаболизма цистеина ($\Delta cysB$ и $\Delta cysE$) и ингибирование синтеза глутатиона ($\Delta gshAB$) приводят не к ожидаемому возрастанию, а к снижению чувствительности мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам. В то же время блокирование экспорта цистеина ($\Delta eamA$) или увеличение импорта ($P_{tet}-tcyP$) цистина, являющего окисленной формой цистеина, приводит к еще большей чувствительности клеток с делецией *gmhA* к антибиотикам. Кроме того, не наблюдается корреляции цитотоксического действия антибиотиков с уровнем активных форм кислорода, общим пулом тиолов или жизнеспособностью исходной популяции клеток. Однако выявлена корреляция между чувствительностью к антибиотикам и долей окисленного глутатиона в клетках. Снижение содержания низкомолекулярных тиолов, по-видимому, сберегает эквиваленты NADPH и ограничивает процессы редокс-модификации белков, повышая устойчивость штамма $\Delta gmhA$ к действию антибактериальных препаратов, тогда как повышение их уровня, напротив, требует большего расхода ресурсов клетки, приводит к росту окисленного глутатиона и вызывает еще большее увеличение чувствительности данного штамма *E. coli* к антибиотикам.

Ключевые слова: низкомолекулярные тиолы, синтез ADP-гептозы, чувствительность к антибиотикам, глутатион, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0026898423060162, EDN: QNHRSN

ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм низкомолекулярных тиолов в клетках бактерий играет важную роль в поддержании редокс-баланса при воздействии антибактериальных препаратов, окислителей и других стрессовых агентов [1–4]. Цистеин и глутатион принимают участие в регуляции различных биосинтетических процессов, приводя к редокс-зависимой модификации белков, что модулирует активность ферментов [5, 6]. Ранее нами были изучены показатели тиолового гомеостаза в мутантах *Escherichia coli* по генам биосинтеза ADP-гептозы, одного из компонентов клеточной стенки [7]. Следует отметить, что мутанты, утратившие ADP-гептозу в составе липополисахаридов (ЛПС), обнаруживают сверхчувствительность к

действию антибиотиков, однако механизм возникновения этой чувствительности остается неизвестным. Показано, что делеции генов *gmhA*, *hldE*, *rfaD* и *waaC*, кодирующих ферменты пути синтеза ADP-гептозы, провоцируют значительное снижение внутриклеточного пула цистеина с одновременным повышением общего пула восстановленных тиолов. Наряду с изменением профиля серосодержащих метаболитов, в клетках, утративших ADP-гептозу, наблюдается повышение уровня генерации активных форм кислорода (АФК), сопровождающиеся истощением восстановительных эквивалентов NADPH. Таким образом, потеря ADP-гептозы приводит к развитию мощного окислительного стресса и перестройке гомеостаза тиолов в клетках *E. coli*.

В клетках *E. coli* основным внутриклеточным низкомолекулярным тиолом в норме является

[#] Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

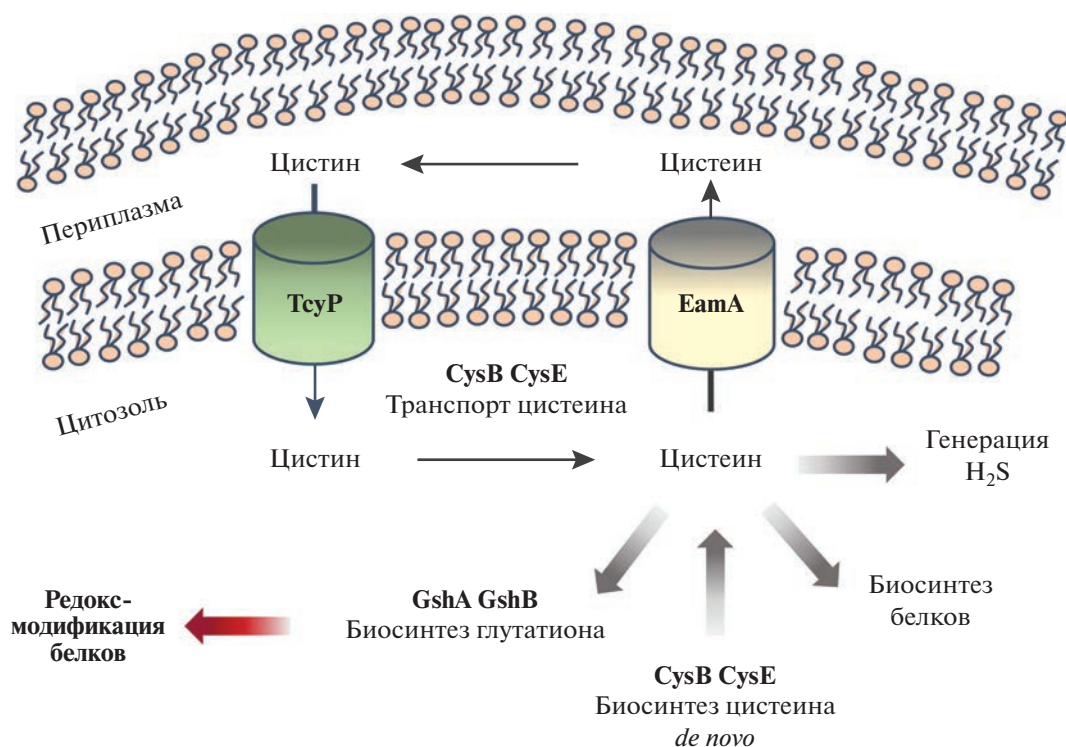


Рис. 1. Схема метаболизма низкомолекулярных тиолов в клетках *E. coli*. Ген *cysB* кодирует транскрипционный регулятор генов цистеинового гомеостаза и контролирует синтез цистеина *de novo* и работу системы транспортеров TcyP и EamA.

восстановленный трипептид глутатион (GSH), содержание которого (2–4 мМ) существенно выше, чем содержание цистеина (0.1–0.2 мМ) [4]. Возможно, это связано с тем, что хотя стандартные редокс-потенциалы пар цистеин–цистин (–250 мВ при pH 7.4) и пары восстановленный глутатион/окисленный глутатион (GSH/GSSG) (–264 мВ при pH 7.4) близки [8], цистеин более эффективно восстанавливает железо и обладает большей генотоксичностью [4]. Внутриклеточная концентрация цистеина определяется интенсивностью процессов синтеза *de novo* и транспорта. В клетках *E. coli* гены биосинтеза и транспорта цистеина объединены в один регулон под контролем транскрипционного регулятора *cysB* [9]. CysB нуждается в кофакторе *O*-ацетилсерине, который синтезируется из *L*-серина ацетилтрансферазой CysE. Кроме того, *O*-ацетилсерин является интермедиатом пути биосинтеза цистеина [10]. Таким образом, синтез и транспорт цистеина зависят от активности генов *cysB* и *cysE* (рис. 1). Транспортная система цистеина представляет собой так называемый шаттл, в котором транспортер TcyP осуществляет перенос окисленной формы цистеина — цистина, из периплазматического пространства в цитоплазму [11] (рис. 1). В цитоплазме цистин подвергается быстрому восстановлению и транспортер EamA возвращает цистеин обратно в периплазму [12] (рис. 1). Ген *eamA* не входит в состав регулона *cysB*.

Синтез глутатиона в клетках *E. coli* осуществляется глутамат-цистеин-лигазой GshA и глутатионсинтазой GshB (рис. 1). Хотя GSH не является незаменимым тиолом для клеток *E. coli*, он играет критическую роль в защите от экологических стрессов, включая осмотический шок, кислотность, защиту от токсинов и окислительного стресса, вызванного пероксидами [13].

Поскольку в мутантах *E. coli*, утративших ADP-гептозу в составе ЛПС клеточной стенки, нарушен тиоловый гомеостаз и повышена чувствительность к антибиотикам, мы предположили, что введение мутаций в гены метаболизма цистеина и глутатиона может играть критическую роль в модуляции их чувствительности к антибиотикам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы. Используемые в работе штаммы *E. coli* и их генотип представлены в табл. 1.

Делеционные мутанты получали, выращивая фаг P1 на штаммах из коллекции Keio [17], содержащих инсерции *cysB::kan*, *cysE::kan*, *gshA::kan*, *gshB::kan* и *emaA::kan*, с последующей трансдукцией в геном штамма *E. coli* MG1655 [18]. Из полученных штаммов с помощью хелперной плазмиды pCP20 удаляли канамициновую кассету [19] с образованием соответствующих делеций ($\Delta cysB$,

$\Delta cysE$, $\Delta gshA$, $\Delta gshB$ и $\Delta emaA$). Наличие делеций подтверждали с помощью ПЦР. Получение штамма, содержащего делецию гена *gmhA*, описано в работе [7], а $P_{tet-tycP}$ – в [16].

Среды и условия культивирования. В качестве полноценной питательной среды для выращивания бактерий использовали среду LB без глюкозы [20]. В жидкой среде бактерии культивировали в термостатированном шейкере (200 об./мин). При необходимости в среду добавляли: налидиксовую кислоту – 0.25 мкг/мл, тетрациклин – 0.75 мкг/мл, ампициллин – 50 мкг/мл, канамицин – 20 мкг/мл.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам. Способность к образованию колоний оценивали методом микроразведений. Ночные бактериальные культуры разводили в 100 раз и подрачивали в термостатированном шейкере при 37°C до оптической плотности $OD_{600} = 0.5–0.6$. Все суспензии выравнивали по оптической плотности. Из полученных культур готовили серию десятикратных разведений в 96-луночном планшете в объеме 100 мкл. Полученные разведения высевали на чашки с богатой средой, содержащей различные концентрации исследуемых антибиотиков. Чашки инкубировали в течение ночи в термостате при 37°C. Результат фотографировали с помощью аналитической системы GelCamera M-26XV.

Определение жизнеспособности и редокс-статуса клеток с использованием проточной цитометрии. Клетки выращивали в полноценной среде до оптической плотности 0.4, затем отмывали дважды в фосфатном буфере (PBS), центрифугировали, удаляли супернатант и ресуспендировали в 100 мкл PBS. Жизнеспособность и редокс-статус клеток оценивали с помощью проточной цитометрии на цитофлуориметре BD LCR Fortessa (“Becton Dickinson”, США). Клеточную популяцию *E. coli* гейтировали по параметрам малоуглового (FSC) и бокового рассеяния (SSC), которые характеризуют размер и гранулярность клеток соответственно. Процент мертвых клеток в популяции оценивали, используя пропидий йодид ($Ex/Em = 535/617$ нм, “Sigma-Aldrich”, США), который добавляли к клеткам до концентрации 10 мкг/мл за 1 мин до начала анализа. Пропидий йодид проникает в клетки с поврежденной мембраной, его связывание с ДНК приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции в красной области спектра. Редокс-статус клеток *E. coli* характеризовали по уровню АФК и внутриклеточных тиолов, значительную часть которых составляет глутатион (GSH). Уровень АФК оценивали с помощью дигидрородамина 123 (DHR123) ($Ex/Em = 507/525$ нм, “ThermoFisher Scientific”, США) [7], который добавляли к клеткам до конечной концентрации 7.5 мкМ, а затем инкубировали клетки в течение 1 ч в темноте при 37°C.

Таблица 1. Генотип и происхождение использованных штаммов *E. coli*

Штамм	Генотип	Происхождение
MG1655	F ⁻ дикий тип	[14]
AM4011	Как MG1655, но $\Delta gmhA$	[7]
AM4022	Как MG1655, но $\Delta cysB$	[15]
AM4041	Как AM4011, но $\Delta cysB$	Данная работа
AM4023	Как MG1655, но $\Delta cysE$	[15]
AM4042	Как AM4011, но $\Delta cysE$	Данная работа
AM4043	Как MG1655, но $\Delta gshA \Delta gshA$	Данная работа
AM4044	Как AM4011, но $\Delta gshA \Delta gshA$	Данная работа
AM4045	Как MG1655, но $\Delta emaA$	[16]
AM4046	Как AM4011, но $\Delta eamA$	Данная работа
AM4047	Как MG1655, но $P_{tet-tycP}$	[16]
AM4031	Как AM4011, но $P_{tet-tycP}$	Данная работа

Уровень внутриклеточных тиолов оценивали с помощью красителя ThiolTracker Violet ($Ex/Em = 405/526$ нм, “ThermoFisher Scientific”) [7], который добавляли в концентрации 10 мкМ, и инкубировали клетки в течение 1 ч при 37°C. Внутриклеточные тиолы и АФК оценивали в клетках с неповрежденной мембраной, которые не окрашиваются пропидий йодидом. Данные цитометрии анализировали с помощью программы FlowJo (“BD Biosciences”).

Определение уровня внутриклеточного глутатиона с помощью реактива Элмана. Клетки *E. coli* ($OD_{600} 0.5$) дважды отмывали натрий-фосфатным буфером (100 мМ Na-фосфатный буфер (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4), 0.5 мМ EDTA, pH 7.5) и лизировали с помощью трехкратной процедуры замораживания (жидкий азот, -196°C)—оттаивания (37°C). После последнего оттаивания пробы ставили в лед и добавляли трихлоруксусную кислоту (ТХУ) до концентрации 5%. После осаждения белков пробы центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин, при температуре 4°C. Супернатант отбирали и использовали далее для определения глутатиона с помощью реактива Элмана (5,5'-дителиобис-2-нитробензойная кислота, DTNB) методом спектрофотометрии, поскольку продукт восстановления DTNB обладает сильным поглощением при 412 нм. Для построения калибровочной кривой использовали восстановленный глутатион, растворенный в 5% ТХУ. К осадку добавляли раствор щелочи до pH 7.4, в котором растворяли осадок, полученный раствор использовали для оценки количества белка в пробах с использованием бицихониновой кислоты (BCA). Полученные значения количества глутатиона в пробе нормировали на количество белка в данной пробе.

Определение доли восстановленного и окисленного глутатиона в клетках. Количественное определение уровня внутриклеточного глутатиона в

данном случае проводили модифицированным методом Титца [21]. Клетки ночной культуры (100 мкл) переносили в 10 мл свежей среды LB и подращивали до OD₆₀₀ 0.5. Клетки из 5 мл суспензии осаждали центрифугированием и суспендировали в лизирующем буфере KPE с добавлением 0.1% Triton X100. Клетки гомогенизировали пестиком и центрифугировали (11 000 об/мин, 5 мин при 4°C). Супернатант переносили в чистые пробирки. Реакционную смесь, состоящую из 20 мкл клеточного экстракта и равных объемов (60 мкл) DTNB, глутатионредуктазы и NADPH инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре, после чего измеряли поглощение при 412 нм. Для построения калибровочной кривой использовали GSH (“Sigma Aldrich”, США). Полученные значения относили к концентрации суммарного белка и выражали в процентах. Для определения окисленной формы глутатиона (GSSG) клеточные экстракты обрабатывали 2-винилпиридином как описано в [21]. Для построения калибровочной кривой использовали окисленный глутатион (“Sigma Aldrich”). Рассчитывали процент восстановленного и окисленного глутатиона в пробах.

Статистический анализ данных. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартные отклонения, полученные из 3–4 экспериментов. Статистическую разницу между экспериментальными группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом Тьюки для множественных сравнений. Различия между средними для групп значениями считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Статистический анализ проводили, используя GraphPad Prism 9.1.2 software (GraphPad Software Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метаболизм низкомолекулярных тиолов и чувствительность мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам

Поскольку инактивация генов биосинтеза ADP-гептозы приводит к значительным изменениям в метаболизме низкомолекулярных тиолов в клетках *E. coli* [7], которые являются компонентами системы редокс-регуляции, защищающей бактериальные клетки в различных стрессовых условиях [1, 3, 12, 13], изменение метаболизма низкомолекулярных тиолов могло привести к еще более выраженному увеличению чувствительности данных штаммов к антибиотикам. В настоящей работе нами получены мутанты $\Delta gmhA$, несущие делеции генов регуляции цистеинового гомеостаза *cysB* и *cysE*, транспорта цистеина (*eamA*) и сверхэкспрессирующий ген транспорта цистина (*tcyP*), а также делеции генов биосинтеза глутатиона *gshA* и *gshB* (рис. 1), и изучено влияние этих делеций на чувствительность мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам.

Как следует из данных, представленных на рис. 2, ограничение метаболизма цистеина (делеции генов *cysB* и *cysE*) приводит к значительной супрессии чувствительности мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам как бактерицидного (налидиксовая кислота), так и бактериостатического действия (тетрациклин). Кроме того, блокирование биосинтеза глутатиона (делеции *gshA* и *gshB*) также повышает устойчивость штамма $\Delta gmhA$ к исследуемым антибиотикам. С другой стороны, изменение работы системы транспорта цистеина, направленное на повышение его внутриклеточной концентрации, усиливает чувствительность клеток $\Delta gmhA$ к налидиксовой кислоте (рис. 2).

Уровень внутриклеточных низкомолекулярных тиолов в мутантах $\Delta gmhA$ на фоне генетической модификации метаболизма цистеина и глутатиона

Ограничение метаболизма цистеина, обусловленное делециями генов *cysB* и *cysE*, а также ингибирование синтеза глутатиона (делеции *gshA* и *gshB*) приводят к значительному снижению уровня низкомолекулярных тиолов (на 65, 45 и 72% по сравнению с контролем соответственно) (рис. 3а). Это снижение сохраняется в присутствии дополнительной делеции $\Delta gmhA$ в случае $\Delta gmhA \Delta cysE$ и $\Delta gmhA gshAB$ или становится еще более выраженным в случае $\Delta gmhA \Delta cysB$. В то же время, увеличение уровня цистеина при сверхэкспрессии гена *tcyP* ($P_{tet-tcyP}$), который кодирует белок, осуществляющий транспорт цистина [22] и сульфоцистеина из периплазмы в цитоплазму клетки [23], не вызывает снижения, а, напротив, приводит к небольшому повышению (на 12%) низкомолекулярных внутриклеточных тиолов. Сверхэкспрессия данного гена в сочетании с делецией *gmhA* приводит к снижению низкомолекулярных тиолов, однако оно не очень значительно и составляет всего 21%. Делеция гена *eamA*, кодирующего белок, экспортирующий цистеин (рис. 1), также не вызывает снижения содержания низкомолекулярных тиолов, а его сочетание с делецией *gmhA* приводит лишь к такому же небольшому снижению, как и одиночная делеция *gmhA* (рис. 3а). При делеции $\Delta eamA$ и сверхэкспрессии $P_{tet-tcyP}$ в штамме с делецией $\Delta gmhA$ наблюдается повышение уровня окисленной формы глутатиона (GSSG), тогда как дополнительные делеции $\Delta cysE$, $\Delta cysB$ и $\Delta gshAB$ вызывают снижение доли GSSG в клетках *E. coli* с $\Delta gmhA$ (рис. 3б).

*Влияние изменений метаболизма тиолов и делеции $\Delta gmhA$ на редокс-статус и жизнеспособность клеток *E. coli**

Влияние изменений метаболизма тиолов в комбинации с делецией $\Delta gmhA$ на редокс-статус клеток оценивали, измеряя с помощью флуорес-

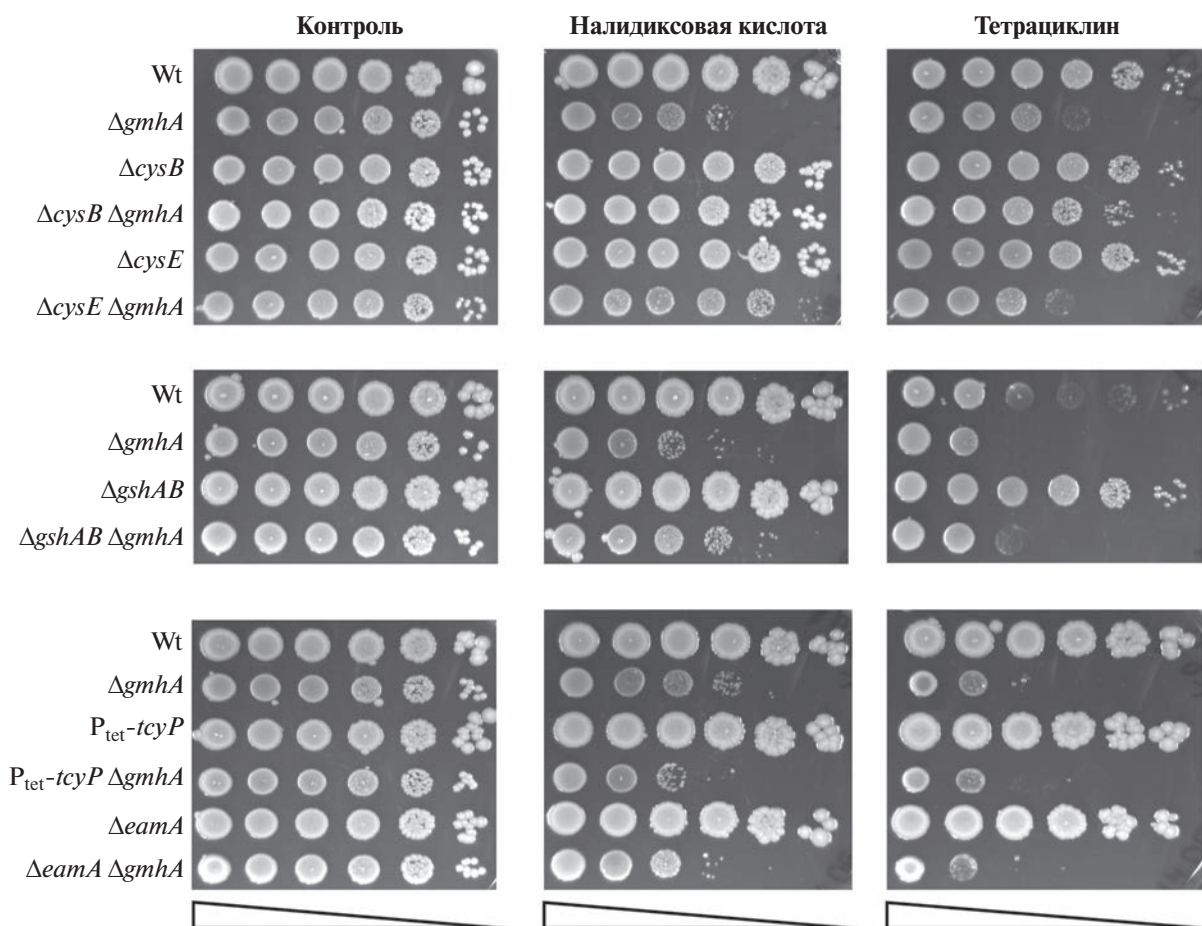


Рис. 2. Влияние модулирования метаболизма низкомолекулярных тиолов на чувствительность мутанта $\Delta gmhA$ к налидиксовой кислоте (0.25 мкг/мл) и тетрациклину (0.75 мкг/мл). Инактивация генов биосинтеза цистеина *cysB* и *cysE*, а также генов биосинтеза глутатиона *gshA* и *gshB* вызывает супрессирующий эффект. Активация транспорта цистеина внутрь клетки ($P_{tet-tycP}$) и ограничение экспорта цистеина ($\Delta eamA$) повышают чувствительность штамма $\Delta gmhA$ к налидиксовой кислоте.

центных красителей уровень тиолов и АФК в популяции живых клеток *E. coli* с неповрежденной мембраной (рис. 4). Установлено, что полный пул внутриклеточных тиолов снижается при ограничении метаболизма цистеина в результате делеций генов *cysB* и *cysE* на 54 и 62%, при ингибировании синтеза глутатиона (делеции *gshAB*) на 56%, а при усилении импорта цистина ($P_{tet-tycP}$) или замедлении экспорта цистеина ($\Delta eamA$) на 48 и 40% соответственно (рис. 4а). При этом, как описано нами ранее, делеция *gmhA* приводит к возрастанию полного пула внутриклеточных тиолов более чем в 3 раза [7]. Это влияние на редокс-статус оказывается настолько сильным, что даже при комбинации делеций генов, нарушающих метаболизм тиолов (*cysB*, *cysE*, *gshAB*) и транспорт цистина ($P_{tet-tycP}$ и $\Delta eamA$), содержание тиолов в двойных мутантах остается повышенным по сравнению с клетками дикого типа (рис. 4а). Наибольшее снижение этого эффекта наблюдалось при делеции *cysE*; в двойных мутантах ($\Delta cysE \Delta gmhA$) уро-

вень тиолов был существенно ниже, чем в клетках с одиночной делецией $\Delta gmhA$, и лишь на 47% превышал значение в контрольных клетках дикого типа. При делеции *cysB* это снижение было незначительным по сравнению с одиночным мутантом $\Delta gmhA$.

Оценка уровня АФК показала, что одиночные мутации в генах метаболизма цистеина и глутатиона, а также в генах транспорта цистина и цистеина приводят к некоторому снижению уровня АФК (рис. 4б). Делеция $\Delta gmhA$, как показано нами ранее, вызывает умеренное (менее чем в 2 раза) повышение уровня АФК. Однако при комбинации делеции *gmhA* с делецией *cysB*, нарушающей метаболизм цистеина, и делецией *gshAB*, нарушающей синтез GSH, наблюдается резкое (более чем в 5–6 раз) возрастание уровня АФК в клетках (рис. 4б). Это свидетельствует об истощении системы редокс-регуляции, не позволяющей компенсировать окислительный стресс, вызванный инактивацией гена биосинтеза ADP-гептозы.

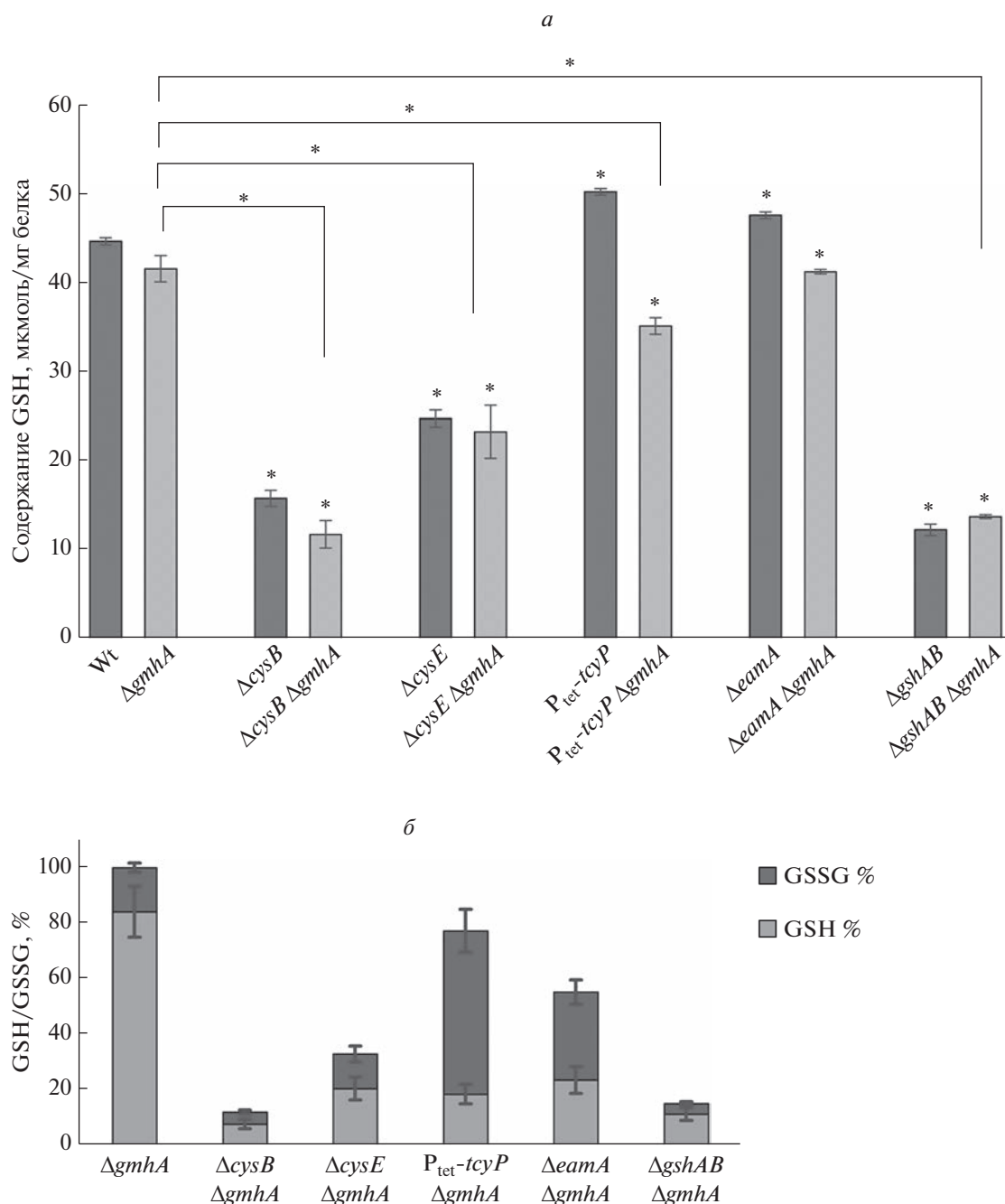


Рис. 3. Уровень внутриклеточных низкомолекулярных тиолов (GSH) (*a*) и соотношение GSH/GSSG (*b*) в популяции клеток *E. coli* с делециями генов *gmhA*, *cysB*, *cysE*, *eamA*, *gshAB*, сверхэкспрессией гена *tycP* (P_{tet}-*tycP*) и их сочетания с делецией гена *gmhA*. *a* — Уровень внутриклеточных низкомолекулярных тиолов в клетках с одиночными делециями и сверхэкспрессией обозначен серыми столбцами, уровень тиолов при совместных делециях и сверхэкспрессии в сочетании с делецией гена *gmhA*, обозначен штриховкой. *b* — Доля восстановленного глутатиона (GSH) показана светло-серым цветом; доля окисленного глутатиона (GSSG) — темно-серым. Приведены средние значения $\pm$ SD, полученные из трех независимых экспериментов. Звездочками над столбцами обозначено различие между контрольными и опытными образцами, звездочками над чертой отличия между одиночной мутацией *ΔgmhA* и мутантными штаммами, содержащими *ΔgmhA*. **p* < 0.05.

Однако делеция гена *cysE*, которая максимально снижала повышенный уровень GSH в клетках с делецией гена *gmhA* (рис. 3), полностью нивелирует возрастание уровня АФК, индуцированного данной делецией (рис. 4б).

Увеличение пула внутриклеточного цистина, вызванное повышением его импорта (P_{tet}-*tycP*) или замедлением экспорта цистеина (*ΔeamA*) в клетках с делецией *gmhA*, также приводит к росту АФК более чем в 3 и 4 раза соответственно. Это

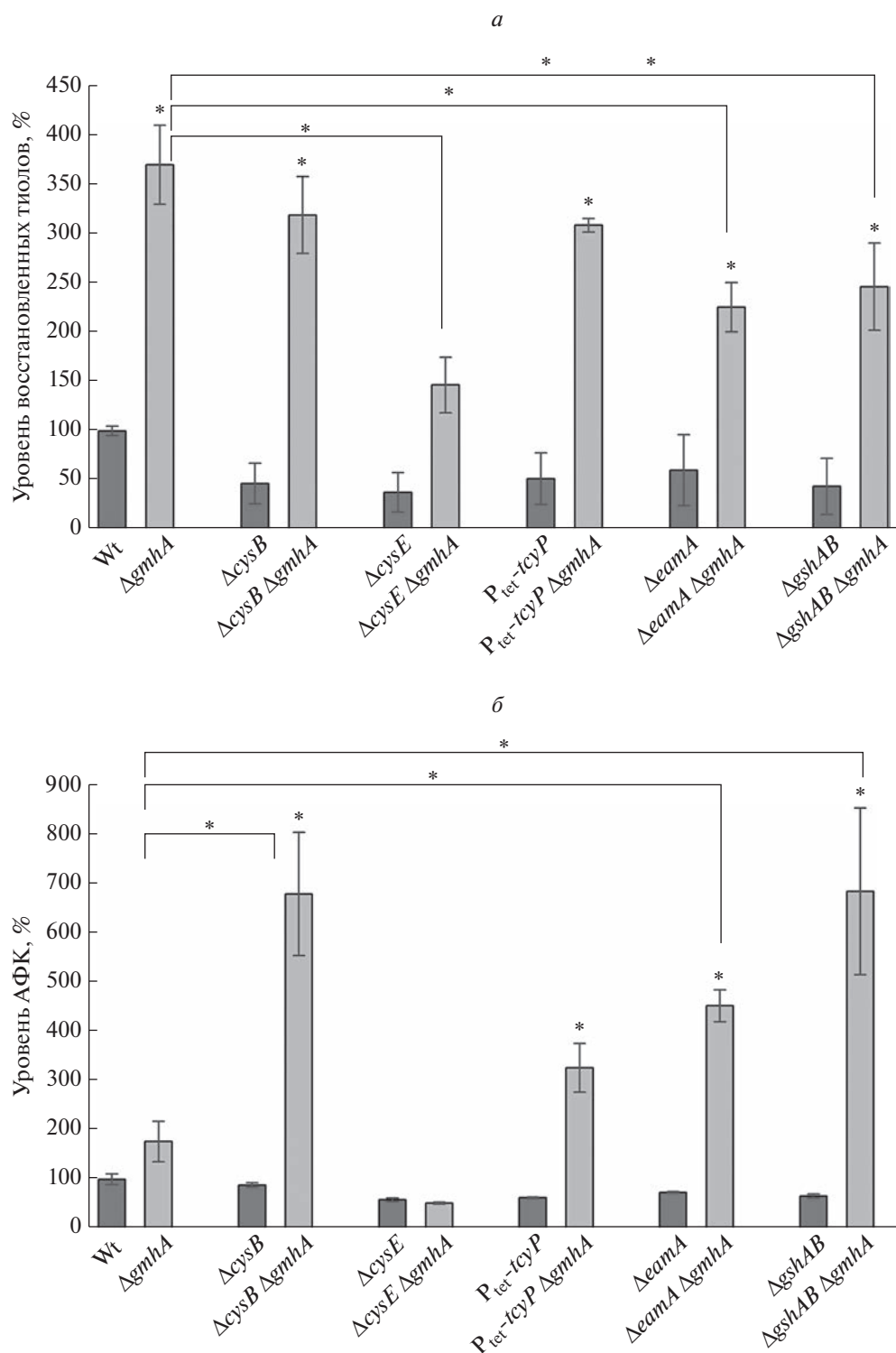


Рис. 4. Изменение уровня внутриклеточных тиолов и уровня АФК в популяции клеток *E. coli* с делецией генов *gmhA*, *cysB*, *cysE*, *eamA*, *gshAB*, сверхэкспрессией гена *tycP* ($P_{tet-tycP}$) и их сочетания с делецией гена *gmhA*. Уровень тиолов (а) и АФК (б) в клетках с вышеперечисленными одиночными делециями и сверхэкспрессией гена *tycP* обозначен темно-серыми столбцами; уровень тиолов при совместных делециях и сверхэкспрессии в сочетании с делецией *gmhA* обозначен светло-серыми столбцами. Приведены средние значения $\pm$ SD из трех независимых экспериментов. Звездочками над столбцами обозначено различие между контрольными и опытными образцами, звездочками над чертой показаны отличия между одиночной делецией $\Delta gmhA$ и мутантными штаммами, содержащими $\Delta gmhA$. * $p < 0.05$.

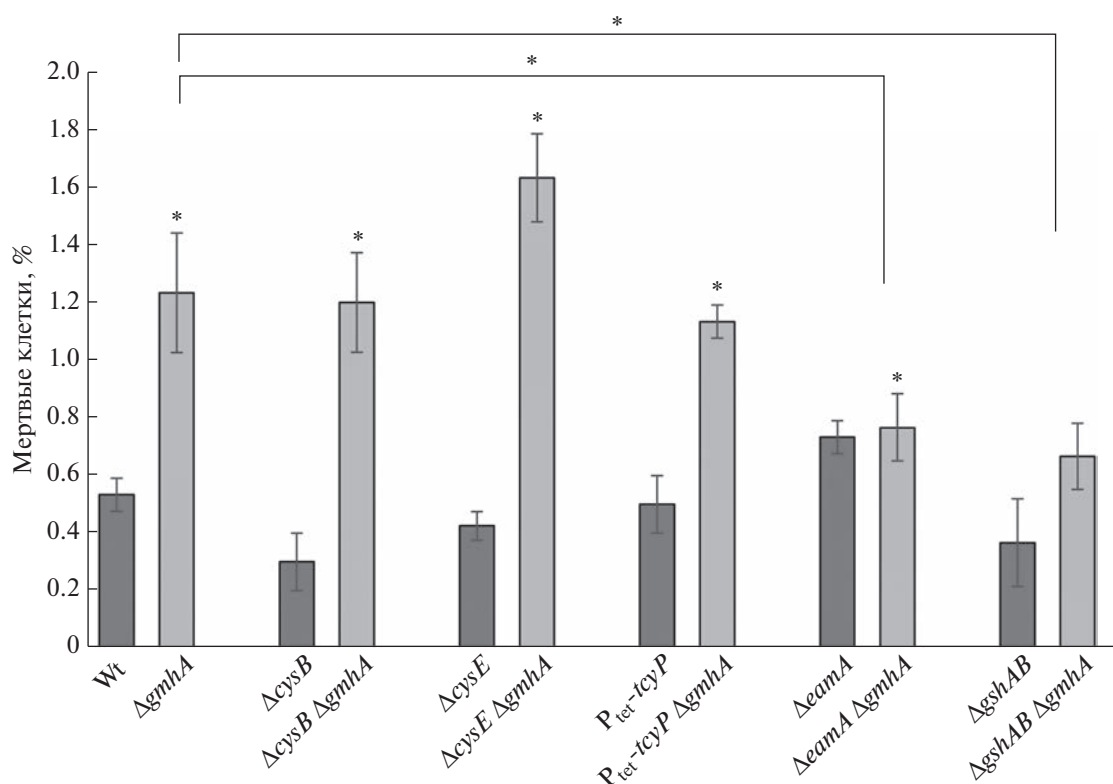


Рис. 5. Изменение доли мертвых клеток (%) в популяции клеток *E. coli* с делецией генов *gmhA*, *cysB*, *cysE*, *eamA*, *gshAB*, сверхэкспрессией гена *tycP* ($P_{tet-tycP}$) и их сочетания с делецией гена *gmhA*. Доли мертвых клеток с вышеперечисленными одиночными делециями и сверхэкспрессией гена *tycP* показаны темно-серыми столбцами, уровень тиолов при совместных делециях и сверхэкспрессии в сочетании с делецией *gmhA* обозначен светло-серыми столбцами. Приведены средние значения $\pm$ SD из трех независимых экспериментов. Звездочками над столбцами обозначено различие между контрольными и опытными образцами; звездочками над чертой показаны отличия между штаммом с одиночной делецией *ΔgmhA* и мутантными штаммами, содержащими *ΔgmhA*. * $p < 0.05$.

объясняется дополнительной нагрузкой на редокс-систему клеток и тратой восстановительных эквивалентов на восстановление цистина.

Таким образом, снижение ресурсов систем антиоксидантной защиты при делеции *gmhA* приводит к развитию значительного окислительного стресса.

Одиночные мутации в генах метаболизма цистеина, глутатиона, а также транспорта цистина и цистеина не приводят к повышению числа (%) мертвых клеток в популяции (рис. 5). Однако внесение дополнительной делеции *gmhA* в клетки с мутациями *ΔcysB*, *ΔcysE* и $P_{tet-tycP}$ приводит к возрастанию содержания мертвых клеток в популяции, также как и одиночная делеция *gmhA*, что свидетельствует о снижении жизнеспособности клеток. В случае совместной делеции генов синтеза глутатиона *gshAB* и делеции гена *gmhA* процент мертвых клеток ниже, чем при одиночной делеции *gmhA* (рис. 5). А в клетках с делецией *eamA* дополнительная делеция *gmhA* вообще не приводит к возрастанию количества мертвых клеток в популяции (рис. 5). Необходимо отметить, что для клеток с исследуемыми мутациями, несущих

при этом делецию *gmhA*, не наблюдалось корреляции процента мертвых клеток в популяции с уровнем АФК (рис. 4, 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно традиционным представлениям, низкомолекулярные тиолы — сероводород, цистеин, глутатион — защищают клетки бактерий дикого типа от окислительного стресса [1, 3, 23]. Однако на фоне инактивации синтеза ADP-гептозы в клетках *E. coli* с делецией *gmhA* развивается окислительный стресс, сопровождающийся снижением пула восстановительных эквивалентов NADPH и редуктивной емкости цитоплазмы [7]. Подобный редокс-дисбаланс, по-видимому, ведет к возрастанию в клетках количества окисленных форм низкомолекулярных тиолов и, как следствие, к депрессии (снижению эффективности) защитных механизмов с участием тиолов. Кроме того, резкое снижение внутриклеточного пула цистеина и генерации H_2S , сопровождающееся повышением уровня восстановленных тиолов, в клетках мутанта *ΔgmhA* [7] может свидетельство-

вать о перераспределении серосодержащих метаболитов и возможных редокс-модификациях белков.

В данной работе нами обнаружено, что ограничение метаболизма цистеина ($\Delta cysB$ и $\Delta cysE$) и ингибирование синтеза глутатиона ($\Delta gshAB$) приводят не к ожидаемому возрастанию, а к снижению чувствительности мутанта $\Delta gmhA$ к антибиотикам, что особенно ярко выражено в случае такого бактерицидного антибиотика, как налидиксовая кислота. Полученные результаты позволяют предположить, что инактивация биосинтеза ADP-гептозы в клетках *E. coli* провоцирует развитие окислительного стресса, который сопровождается каскадными необратимыми редокс-модификациями белков с участием цистеина и глутатиона. Снижение общей концентрации низкомолекулярных тиолов ограничивает процессы глутатионилирования и цистеинилирования различных ферментов, снимая токсический эффект и повышая устойчивость штамма $\Delta gmhA$ к действию антибактериальных препаратов. Редокс-чувствительные цистеиновые остатки зачастую входят в каталитические центры ферментов центрального метаболизма, в частности, ферментов пентозофосфатного пути — транскетолазы и рибулозо-5-фосфат-эпимеразы [24, 25]. Снижение каталитической активности таких ферментов или их полная инактивация могут драматически сказаться на способности клеток осуществлять жизненно важные анаболические процессы и снижать адаптивный потенциал клеток. Кроме того, поскольку уровень цистеина должен поддерживаться в пределах 0.1–0.2 мМ для предотвращения генотоксичности, а его выкачивание из клетки требует расхода энергии [4], то снижение пула цистеина может сохранить ресурсы клетки, что критично при их недостатке (АТФ и NADPH), наблюдаемом, как показано нами ранее [7], у мутантов с делецией *gmhA*. Действительно, мы наблюдали снижение доли окисленного глутатиона в штаммах $\Delta gmhA \Delta cysE$, $\Delta gmhA \Delta cysB$ и $\Delta gmhA gshAB$ *E. coli*, что свидетельствует об эффективном восстановлении имеющегося глутатиона в данных штаммах, несмотря на снижение общего количества глутатиона (рис. 3).

Блокирование экспорта цистеина ($\Delta eamA$) или увеличение импорта ($P_{tet}-tcyP$) в клетки цистина, являющего окисленной формой цистеина, приводит к еще большему повышению чувствительности клеток с делецией *gmhA* к антибиотикам. Это связано с дополнительным истощением пула NADPH, который и так существенно снижен при ингибировании биосинтеза ADP-гептозы [7], поскольку накопление в клетке цистина должно увеличивать расход восстановительных эквивалентов (NADPH) для восстановления цистина до цистеина [22]. Повышение концентрации цистина опасно для клетки, так как цистин способствует образованию дисульфидных мостиков в белках,

что влияет на их функционирование [27]. Например, таким образом цистин активирует щелочную фосфатазу [27]. Поэтому клетка старается быстро восстановить цистин, который в результате в нормальных условиях присутствует в малом количестве [28]. Вследствие этого не реализуется ингибирование импортера цистина продуктом (цистином), и он продолжает закачиваться в клетки. Наблюдаемое нами возрастание доли окисленной формы глутатиона GSSG при $\Delta eamA$ (рис. 3б) обусловлено повышением содержания цистина в клетке, которое способствует увеличению окисления тиоловых групп с образованием дисульфидных мостиков. Превышение нормальной внутриклеточной концентрации цистеина вследствие его восстановления из цистина или блокирования экспорта также опасно для клетки, так как вызывает рост АФК, а также активирует генотоксическую реакцию Фентона [2, 4]. Кроме того, в высокой концентрации цистеин может конкурировать с треонином за активный центр треониндеаминазы, первого фермента пути биосинтеза изолейцина [27]. Необходимо отметить, что повышение содержания цистина вследствие окислительного стресса также приводит к росту окисленной формы глутатиона GSSG. Известно, что фактор транскрипции Lrp реагирует на избыток цистеина и индуцирует AlaE, многофункциональный транспортер, который выкачивает цистеин из клетки до тех пор, пока не удастся снизить его уровень. Восстановление цистина и вывод цистеина из клетки существенно увеличивают потребность клеток в NADPH [27]. Таким образом, индуцированное нами усиление входа цистина увеличивает расход NADPH [27], а замедление выхода цистеина приводит к восстановлению железа и генотоксичности [4]. В обоих случаях наблюдается рост окисленной формы глутатиона (GSSG) (рис. 3), которая может непосредственно взаимодействовать с тиоловыми группами белков, вызывая их глутатионилирование [29]. Кроме того, снижение уровня NADPH приводит к активации глутатионилирования белков глутаредоксином [24, 29]. Также необходимо отметить, что для того, чтобы справиться с избытком цистина и цистеина, клетке необходимо расходовать АТФ, содержание которой в мутантах с делецией *gmhA* снижено в 2 раза [7]. Еще одним механизмом повышения чувствительности к антибиотикам в данном случае может быть нарушение окислительного фолдинга белков в периплазме *E. coli*. Таким образом, мы полагаем, что основной причиной возрастания чувствительности к антибиотикам штамма с делецией *gmhA* при росте уровня цистина и цистеина является истощение энергетических ресурсов клетки и редокс-модификации белков.

Внесение исследуемых мутаций приводит к снижению общего внутриклеточного пула тио-

лов, повышенного вследствие инактивации синтеза ADP-гептозы в клетках с делецией *gmhA*. Это предсказуемый результат, обусловленный значительным снижением уровня цистеина и глутатиона в клетках, а нарушение транспорта цистина создает избыток окисленных форм, требующий NADPH, что снижает способность клетки восстанавливать тиоловые группы. Наибольший эффект достигается в случае делеции *cysE*. Кроме того, эта делеция полностью нивелирует возрастание продукции АФК, вызванное делецией *gmhA*, в то время как все остальные мутации в генах, регулирующих метаболизм цистеина и глутатиона, а также нарушение транспорта цистина приводят к еще большему повышению уровня АФК в клетках с делецией *gmhA*. Поскольку *O*-ацетилсерин – продукт реакции, катализируемой ацетилсерин-трансферазой, активирует регуляторный белок CysB, а также является интермедиатом в пути биосинтеза цистеина, то вполне объяснима более значительная супрессия эффекта делеции *gmhA* в клетках с $\Delta cysE$ по сравнению с $\Delta cysB$.

Таким образом, не выявлена корреляция цитотоксического действия антибиотиков с уровнем АФК, общим пулом тиолов или жизнеспособностью исходной популяции клеток. Однако обнаружена корреляция между ростом чувствительности к антибиотикам и повышением доли окисленного глутатиона (GSSG). В мутантах с большей чувствительностью к антибиотикам уровень GSSG выше, а в мутантах с пониженной чувствительностью ниже. Полученные данные свидетельствуют о том, что причиной снижения чувствительности клеток с делецией *gmhA* к антибиотикам является истощение пула низкомолекулярных тиолов, наблюдаемое при нарушении метаболизма цистеина и глутатиона, в то время как увеличение содержания цистина – окисленной формы цистеина, или цистеина, напротив, приводит к увеличению чувствительности данных клеток к антибиотикам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-30030).

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. (2011) H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*. **334**, 986–990. <https://doi.org/10.1126/science.1209855>
- Mironov A., Seregina T., Shatalin K., Nagornyykh M., Shakulov R., Nudler E. (2020) CydDC functions as a cytoplasmic cystine reductase to sensitize *Escherichia coli* to oxidative stress and aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 23565–53570. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007817117>
- Mironov A., Seregina T., Nagornyykh M., Luchack L.G., Korolkova N., Lopes L.E., Kotova V., Zavgelsky G., Shakulov R., Shatalin K., Nudler E. (2017) Mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, 6022–6027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703576114>
- Park S., Imlay J. (2003) High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* **185**, 1942–1950. <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1942-1950.2003>
- Li X., Zhang T., Day N.J., Feng S., Gaffrey M.J., Qian W.-J. (2022) Defining the S-glutathionylation proteome by biochemical and mass spectrometric approaches. *Antioxidants* (Basel). **11**, 2272. <https://doi.org/10.3390/antiox11112272>
- Hillion M., Antelmann H. (2015) Thiol-based redox switches in prokaryotes. *Biol. Chem.* **396**, 415–444. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0102>
- Seregina T.A., Petrushanko I.Yu., Shakulov R.S., Zari-pov P.I., Makarov A.A., Mitkevich V.A., Mironov A.S. (2022) The inactivation of LPS biosynthesis genes in *E. coli* cells leads to oxidative stress. *Cells*. **11**(17), 2667. <https://doi.org/10.3390/cells11172667>
- Jones D.P., Carlson J.L., Mody V.C., Cai J., Lynn M.J., Sternberg P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 625–635. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00275-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00275-0)
- Jovanovic M.Z., Lilic M., Savic D.J., Jovanovic G.N. (2003) The LysR-type transcriptional regulator CysB controls the repression of HslJ transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol.* **149**(Pt 12), 3449–3459.
- Hindson V.J. (2003) Serine acetyltransferase of *Escherichia coli*: substrate specificity and feedback control by cysteine. *Biochem. J.* **375**, 745–752. <https://doi.org/10.1042/bj20030429>
- Chonoles Imlay K.R., Korshunov S., Imlay J.A. (2015) Physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **197**(23), 3629–3644. <https://doi.org/10.1128/jb.00277-15>
- Ohtsu I., Wiriyathanawudhiwong N., Morigasaki S., Nakatani T., Kadokura H., Takagi H. (2010) The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **285**, 17479–17487. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081356>
- Masip L., Veeravalli K., Georgiou G. (2006) The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 753–762. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.753>
- Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. (2011) H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*. **334**, 986–990. <https://doi.org/10.1126/science.1209855>
- Seregina T.A., Нагорных М.О., Лобанов К.В., Шакулов Р.С., Миронов А.С. (2018) Новая роль транскрипционного фактора CysB в деградации цистеина и образовании сероводорода в *E. coli*. *Генетика*. **54**(11), 1237–1244.
- Mironov A., Seregina T., Shatalin K., Nagornyykh M., Shakulov R., Nudler E. (2020) CydDC functions as a

- cytoplasmic cystine reductase to sensitize *Escherichia coli* to oxidative stress and aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 23565–23570.
https://doi.org/10.1073/pnas.2007817117
17. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008.
https://doi.org/10.1038/msb4100050
 18. Miller J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab., ISBN 978-0-87969-106-6.
 19. Datsenko K.A., Wanner B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 6640–6645.
https://doi.org/10.1073/pnas.120163297
 20. Kotova V.Yu., Manukhov I.V., Zavilgelskii G.B. (2010) Lux-biosensors for detection of SOS-response, heat shock, and oxidative stress. *Appl. Biochem. Microbiol.* **46**, 781–788.
https://doi.org/10.1134/S0003683810080089
 21. Rahman I., Kode A., Biswas S.K. (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **1**, 3159–3165.
https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378
 22. Ohtsu I., Kawano Y., Suzuki M., Morigasaki S., Saiki K., Yamazaki S., Nonaka G., Takagi H. (2015) Uptake of *L*-cystine via an ABC transporter contributes defense of oxidative stress in the *L*-cystine export-dependent manner in *Escherichia coli*. *PLoS One*. **10**, e0120619.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120619
 23. Yamazaki S., Takei K., Nonaka G. (2016) YdjN encodes an S-sulfocysteine transporter required by *Escherichia coli* for growth on S-sulfocysteine as a sulfur source. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw185.
https://doi.org/10.1093/femsle/fnw185
 24. Ulrich K., Jakob U. (2019) The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic. Biol. Med.* **140**, 14–27.
https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035
 25. McDonagh B., Pedrajas J.R., Padilla C.A., Bárcena J.A. (2013) Thiol redox sensitivity of two key enzymes of heme biosynthesis and pentose phosphate pathways: uroporphyrinogen decarboxylase and transketolase. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 932472.
https://doi.org/10.1155/2013/932472
 26. Sobota J.M., Imlay J.A. (2011) Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 5402–5407.
https://doi.org/10.1073/pnas.1100410108
 27. Korshunov S., Imlay K.R.C., Imlay J.A. (2020) Cystine import is a valuable but risky process whose hazards *Escherichia coli* minimizes by inducing a cysteine exporter. *Mol. Microbiol.* **113**, 22–39.
https://doi.org/10.1111/mmi.14403
 28. Reitzer L., DiRita V.J. (2015) Death by cystine: an adverse emergent property from a beneficial series of reactions. *J. Bacteriol.* **197**, 3626–3628.
https://doi.org/10.1128/JB.00546-15
 29. Mieyal J., Gallogly M., Qanungo S., Liedhegner E., Shelton M. (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1941–1988.
https://doi.org/10.1089/ars.2008.2089

Low-Molecular Thiols as a Factor Improving the Sensitivity of *Escherichia coli* Mutants with Impaired Synthesis ADP-Heptose to Antibiotics

T. A. Seregina¹*, I. Yu. Petrushanko¹**, P. I. Zaripov¹, Iu. D. Kuleshova¹, K. V. Lobanov¹, R. S. Shakulov¹, V. A. Mitkevich¹, A. A. Makarov¹, and A. S. Mironov¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: tatyana.s82@gmail.com

**e-mail: irina-pva@mail.ru

Low molecular weight thiols as glutathione and cysteine are an important part of the cell's redox regulation system. Previously, we have shown that inactivation of ADP-heptose synthesis in *Escherichia coli* during *gmhA* deletion induces the oxidative stress. It is accompanied by rearrangement of thiol homeostasis and increased sensitivity to antibiotics. In our study, we found that restriction of cysteine metabolism ($\Delta cysB$ and $\Delta cysE$) and inhibition of glutathione synthesis ($\Delta gshAB$) lead to a decrease in the sensitivity of the $\Delta gmhA$ mutant to antibiotics but not to its expected increase. At the same time, blocking of the export of cysteine ($\Delta eamA$) or increasing the of the import ($P_{tet}-tcyP$) into cells of oxidized form of cysteine -cystine leads to an even greater increase in the sensitivity of *gmhA*-deleted cells to antibiotics. In addition, there is no correlation between the cytotoxic effect of antibiotics and the level of reactive oxygen species (ROS), the total pool of thiols or the viability of the initial cell population. However, a correlation between the sensitivity to antibiotics and the level of oxidized glutathione in cells was found in our study. Apparently, a decrease in the content of low molecular weight thiols saves NADPH equivalents and limits the processes of protein redox modification. It leads to increasing of resistance of the $\Delta gmhA$ strain to antibiotics. On the contrary, an increase in low molecular weight thiols levels requires a greater expenditure of cell resources, leads to an increase in oxidized glutathione and induces to greater increase in sensitivity of the $\Delta gmhA$ strain to antibiotics.

Keywords: low molecular weight thiols, ADP-heptose synthesis, antibiotic sensitivity, glutathione, oxidative stress

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

УДК 571.27

ТИМУСНЫЙ ГОРМОН ТИМОЗИН-1 α СНИЖАЕТ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОК RAW 264.7, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЭНДОТОКСИНОМ

© 2023 г. Е. Г. Новоселова^а, *, О. В. Глушкова^а, М. О. Хренов^а, С. М. Лунин^а, М. Г. Шарапов^а,
Р. Г. Гончаров^а, Э. К. Мубаракшина^а, Т. В. Новоселова^а, С. Б. Парфенюк^а

^аИнститут биофизики клетки Российской академии наук, “Федеральный исследовательский центр
“Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: elenapov_06@mail.ru

Поступила в редакцию 13.03.2023 г.

После доработки 14.04.2023 г.

Принята к публикации 15.05.2023 г.

Изучено влияние тимозина-1альфа (T α 1) на противовоспалительный ответ альвеолярных макрофагов RAW 264.7, культивируемых в присутствии липополисахарида (ЛПС) из стенок грамотрицательных бактерий. При этом оценена продукция провоспалительных цитокинов, определена активность сигнальных путей NF- κ B и SAPK/JNK, а также изучен уровень экспрессии ряда генов, регулирующих уровни апоптоза клеток, и активность рецепторов, принимающих участие в провоспалительном ответе на воздействие ЛПС. Показано, что, во-первых, добавление T α 1 в разной степени нормализовало продукцию цитокинов, особенно заметно интерлейкинов (IL)-1 β и IL-6. Во-вторых, добавление T α 1 нормализовало активность сигнальных каскадов NF- κ B и SAPK/JNK и экспрессию гена *Tlr4*. В-третьих, T α 1 заметно снижал уровень p53 и активность гена *P53*, который является маркером апоптоза клеток. В-четвертых, доказано, что увеличение экспрессии гена *Ap-1* под влиянием ЛПС снижалось при использовании T α 1. Таким образом, установлено, что присутствие T α 1 в среде культивирования клеток RAW 264.7 значительно снижает уровень провоспалительного ответа клеток на ЛПС.

Ключевые слова: тимозин-1 α , воспаление, цитокины, сигнальные каскады, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0026898423060125, **EDN:** QGCMUF

ВВЕДЕНИЕ

Воспаление — это реакция иммунной системы на такие факторы, как патогены, поврежденные клетки, токсические соединения или ионизирующее излучение [1]. Реакция организма при этом направлена на удаление повреждающих раздражителей и инициирование процесса заживления [2]. Таким образом, воспаление является защитным механизмом, жизненно важным для млекопитающих [3]. Последние 15 лет мы изучали противовоспалительную эффективность гормонов тимуса (тимулина и тимопентина) в условиях *in vitro* и *in vivo* [4–15]. Выбор этого направления исследований вызван пониманием особой роли тимуса в функционировании иммунной системы. Известно, что тимус подвергается возрастной инволюции [16], которая может ускоряться при воздействии на организм повреждающих факторов. При этом ускоренная инволюция тимуса проявляется как побочный эффект, вызываемый применением ряда лекарственных средств при таких тяже-

лых заболеваниях, как туберкулез, онкологические заболевания и др. [17]. Инволюция тимуса может снизить способность организма восстанавливать репертуар периферических Т-клеток и реагировать на новые антигены. В настоящее время отсутствуют доступные методы лечения острой атрофии тимуса, которая приводит к нарушению работы иммунной системы во время острых стрессовых событий [18]. Известно, что множество факторов, включая инфекции, яды, ионизирующую радиацию и др., приводят к острой атрофии ткани тимуса. Важно отметить, что, согласно существующим представлениям, к острой инволюции тимуса приводят все физиологические стрессовые факторы, включая недостаточное питание [19].

Для предупреждения перехода острого воспаления в хроническое воспалительные реакции должны быть подавлены, чтобы предотвратить дополнительное повреждение тканей. Снижение уровня воспаления — это хорошо управляемый процесс, включающий контролируемую продук-

цию медиаторов в пространстве и во времени, при котором градиенты хемокинов, цитокинов и активных форм кислорода (АФК) “разбавляются” с течением времени [20]. Циркулирующие лейкоциты постепенно перестают ощущать эти изменения и не рекрутируются к местам повреждения. Дисрегуляция этого процесса может привести к неконтролируемому хроническому воспалению [21]. Процессы разрешения воспаления, которые восстанавливают гомеостаз тканей, включают уменьшение или прекращение инфильтрации тканей нейтрофилами и апоптоз отработанных нейтрофилов, контррегуляцию хемокинов и цитокинов, трансформацию макрофагов из классических в альтернативно активированные и инициацию исцеления [22, 23].

Ранее мы доказали противовоспалительное действие тимусных гормонов тимулина и тимопентина не только на модели сепсиса у мышей [4–6], но и при состоянии, моделирующем рассеянный склероз [7, 8]. Опубликованы данные, указывающие на вероятную противовоспалительную эффективность другого гормона тимуса, тимозина 1 α (T α 1) [26, 27]. Установлено, что T α 1 является мощным модулятором иммунитета и воспаления. В совокупности результаты этих исследований подтверждают внутритимусную роль гормона лептина в поддержании здорового эпителия тимуса и стимуляцию тимопоэза, которая проявляется при нарушении гомеостаза тимуса эндотоксемией [1]. Кроме того, установлена определенная связь между продолжительностью жизни долгожителей, состоянием системы иммуносенесценции и уровнем T α 1 [19, 28, 29]. T α 1 – 28-аминокислотный белок, обладающий иммуномодулирующими функциями, оказывает благоприятное воздействие при инфекционных и онкологических заболеваниях, иммунодефицитных состояниях, а также обладает нейропротекторным действием [30].

С учетом этих сведений цель настоящей работы состояла в изучении эффектов T α 1 на провоспалительную активацию альвеолярных макрофагов RAW264.7, культивируемых в присутствии липополисахарида (ЛПС) из стенок грамотрицательных бактерий. Оценена продукция провоспалительных цитокинов, а также изучено состояние сигнальных путей NF- κ B и SAPK/JNK. Кроме того, определен уровень экспрессии ряда генов, регулирующих уровни апоптоза клеток, а также активность рецептора TLR4, принимающего участие в провоспалительном ответе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток RAW 264.7. Клетки макрофагальной линии RAW264.7 культивировали в присутствии индуктора воспаления и T α 1. Клетки RAW 264.7 росли в культуральных флаконах в среде, состоящей из смеси RPMI: DMEM (“ПанЭко”,

Россия) в соотношении 1 : 1 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и смеси антибиотиков (пенициллин – 100 мкг/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл, гентамицин – 50 мкг/мл), при 37°C и 5% CO₂. Пересев (пассаж) клеток производили после достижения плотности монослоя ~80%. В экспериментах использовали клетки после 4–8 пассажей. После каждого пассажа жизнеспособность RAW 264.7 оценивали визуально с использованием инвертированного микроскопа LEICA DMIL HC (“Leica”, Германия), а также путем подсчета живых клеток в камере Горяева при окрашивании суспензии RAW 264.7 0.01%-ным раствором трипанового синего (“AppliChem”, Германия) в физиологическом растворе (NaCl 0.9%). Количество выживших макрофагальных клеток составляло 93–97%. Провоспалительные ответы индуцировали ЛПС, выделенным из стенок *Escherichia coli* штамм 0128: B12 (“Sigma”, США), в концентрации 1 мкг/мл. Экзогенный T α 1 (“Sigma”) добавляли в концентрации 10 нг/мл одновременно с индукцией провоспалительных ответов. Для определения продукции цитокинов клетки снимали с поверхности культурального флакона с помощью скребков (“Corning”, США), отмывали от старой среды, разводили в свежей среде и рассевали с плотностью 10⁶ клеток в 1 мл в 24-луночные планшеты. Через 24 ч в каждую лунку добавляли исследуемые вещества в заданной концентрации. По окончании 72-часовой инкубации клетки лизировали 3 раза замораживанием–оттаиванием, при этом лизаты использовали немедленно либо хранили при –20°C. Для определения продукции сигнальных и стрессовых белков клетки рассевали в культуральные флаконы с плотностью 100 × 10⁶ клеток на флакон. После прикрепления клеток (24 ч) добавляли исследуемые вещества по приведенной выше схеме и инкубировали в течение 6 ч. Далее клетки снимали с поверхности флакона, отмывали от старой среды и разводили в 1 мл физиологического раствора для дальнейшего выделения белков. В пределах каждого независимого эксперимента характеристики образцов измеряли параллельно в 6–9 повторях и определяли среднее значение. Усредненные по четырем экспериментам значения использовали для определения статистической значимости различий между группами ($n = 4$). В качестве контроля использовали клетки, не подвергавшиеся обработке ЛПС.

Тест на жизнеспособность. Клетки RAW 264.7 культивировали в 96-луночных планшетах (“TPP”, Швейцария) по 100 мкл (2 × 10⁴ клеток) на лунку в среде RPMI 1640 (“ПанЭко”), содержащей 10% ЭТС, 2.04 мМ L-глутамин (“ПанЭко”), 100 мкг/мл стрептомицина, при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После культивирования в течение 24 ч к монослою клеток RAW 264.7 добав-

ляли либо ЛПС (1 мкг/мл), либо $\text{T}\alpha\text{1}$ (10 нг/мл), либо ЛПС + $\text{T}\alpha\text{1}$ в указанных концентрациях, культивировали в течение еще 24 ч, промывали 3 раза PBS и окрашивали в течение 10 мин 0.05%-ным фиолетовым кристаллом (“Sigma”). Лунки тщательно промывали проточной дистиллированной водой, в каждую лунку добавляли по 100 мкл 1%-ного додецилсульфата натрия. Через 10 мин после этого измеряли оптическую плотность при 546 нм на спектрофотометре для планшетов Titertek Multiscan MCC/340 (“Flow Laboratories”, Финляндия).

Определение уровня окислительного стресса в клетках. Уровень окислительного стресса в клетках измеряли с помощью диацетилового производного 5.6-карбоксии-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (карбоксии- H_2DCFDA) (“Invitrogen”, США). Карбоксии- H_2DCFDA представляет собой химически восстановленный аналог флуоресцеина, используемый в качестве общего индикатора окислительного стресса в клетках. Эта нефлуоресцентная молекула легко превращается в зеленую флуоресцентную форму (карбоксии-DCF), так как при окислении внутри клетки ацетатные группы удаляются внутриклеточными эстеразами. Следует отметить, что DCFH (и карбоксии- H_2DCFDA) не реагируют с супероксидом, пероксидом водорода или оксидом азота. Соотношение DCFH/карбоксии- H_2DCFDA в значительной степени отражает катализируемое пероксидазой окисление. Клетки RAW 264.7 предварительно культивировали в течение 24 ч в 96-луночном планшете (2.5×10^4 клеток на лунку) в 100 мкл среды DMEM, промывали PBS и обрабатывали свежеприготовленным раствором карбоксии- H_2DCFDA (“Invitrogen”) в стерильном ДМСО в конечной концентрации 2.5 мкМ в среде с 2% ЭТС. Клетки инкубировали с карбоксии- H_2DCFDA в темноте в течение 1 ч. Одновременно с добавлением карбоксии- H_2DCFDA добавляли ЛПС (1 мкг/мл), $\text{T}\alpha\text{1}$ (10 нг/мл). Сигнал флуоресценции от необработанных клеток RAW 264.7 использовали в качестве контроля. Фоновый сигнал культуральной среды DMEM вычитали из соответствующих сигналов экспериментальных образцов. Флуоресценцию измеряли с помощью флуоресцентного планшетного ридера Infinite 200 (“Tecan”, Австрия) при длине волны возбуждения 480 нм и длине волны поглощения 530 нм ($E_{\text{x}}/E_{\text{m}} = 485/535$ нм). Выполняли три независимых эксперимента (по три повтора на каждую экспериментальную группу ($n = 9$)).

Определение продукции цитокинов. TNF, IL-10 и IL-1 β , IL-6 мыши определяли с использованием набора для ИФА (“PerproTech”, США). Связывание визуализировали с использованием 100 мкл зеленого красителя ABTS (“Sigma”), растворенного в 0.05 М цитратного буфера (pH 5.0) с добавлением 0.01% пероксида водорода, и измеряли

оптическую плотность при 405 нм с помощью спектрофотометра для микропланшетов (Мультискан EX; “Thermo Electron Corp.”, США).

Гель-электрофорез в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг. Для приготовления белковых образцов суспензию клеток RAW 264.7, предварительно отмытую от среды культивирования с помощью 0.9%-ного NaCl, трехкратно замораживали—оттаивали. После этого добавляли ингибиторы протеаз и фосфатаз (Protease and phosphatase inhibitor cocktail 100 xl; “Thermo Scientific”). К приготовленным таким способом пробам добавляли солибилизирующий буфер для электрофореза, β -меркаптоэтанол (2–5%) и кипятили в течение 5 мин. Концентрацию белка измеряли с помощью NanoDrop2000c (“NanoDrop”, США), по 10 мкл образца вносили в каждую лунку 10%-ного денатурирующего полиакриламидного геля (Ds-Na-ПААГ). Наличие белков в образцах определяли с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием наборов антител: антител кролика к $\text{ph-NF-}\kappa\text{B}$ (Ser536), p53, ph-SAPK/JNK , NRF-2, TLR4, α - β -тубулину (“Cell Signaling”, США). Белки выявляли с использованием системы ECL (“GE Healthcare”, Швеция). Фотографии полос получены с помощью трансиллюминатора TFX 35.WL (“Vilber Lourmat”, Франция). Количественное содержание белков определяли после денситометрирования с использованием программы Qara (Ver. 3.7). Проведено по три независимых эксперимента (использовали клетки разных пассажей) для каждого белка. Полученные цифровые данные нормировали по значениям в соответствующем контроле (полосы α - β -тубулина) и выражали в относительных единицах.

Оценка изменений экспрессии генов. Экспрессию генов анализировали в клетках RAW 264.7 методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В среду культивирования клеток добавляли $\text{T}\alpha\text{1}$ (10 нг/мл) или ЛПС (1 мкг/мл) по отдельности или совместно, инкубировали в течение 6 ч и определяли экспрессию генов, связанных с апоптозом (P53), кодирующих факторы транскрипции (NF- κB , Ar-1, NRF-2), рецептор TLR4, цитокины TNF, IL-6, а также iNos.

Процедура выделения суммарной РНК, синтез кДНК и проведение ПЦР-РВ подробно описаны нами ранее [31]. РНК из клеток RAW 264.7 выделяли с использованием реагента RNAextract согласно инструкции производителя (“Евроген”, Россия). Суммарную РНК обрабатывали ДНКазой I (“New England Biolabs”, США) для удаления возможных примесей геномной ДНК. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически (NanoDrop1000c, США) по поглощению при 260 нм. Целостность РНК оценивали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле в присутствии бромида этидия (1 мкг/мл) по

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в ПЦР-РВ

Ген	GenBank	Последовательность олигонуклеотида 5' → 3'	
<i>Actb</i>	NM_007393.4	F:	GCCTTCCTTCTTGGGTATGGAATCC
		R:	CACCAGACAGCACTGTGTTGGCA
		P:	FAM-CAATTCCATCATGAAGTGTGACGTTG-BHQ1
<i>P53</i>	NM_011640.3	F:	CGAAGACTGGATGACTGCCA
		R:	CGTCCATGCAGTGAGGTGAT
		P:	VIC-CTCCCTCTGAGCCAGGAGACA-BHQ2
<i>Nf-kB</i>	NM_008689	F:	GACAACTATGAGGTCTCTGGGG
		R:	ATCACTTCAATGGCCTCTGTGT
		P:	VIC-GGAGGCCCTGCAACAGATGGGC-BHQ2
<i>Ap-1</i>	NM_010591	F:	GAGTCTCAGGAGCGGATCAAG
		R:	CTTTTTCCTCTAGCCGAGCGA
		P:	VIC-GCCGCCTCCAAGTGCCGGAA-BHQ2
<i>Nrf-2</i>	NM_010902	F:	TCCATTCCCGAATTACAGTGTCTT
		R:	TTCTGTCACTGTGGCTTCTGG
		P:	ROX-GCAGCTGGCTGATACTACCGCTGT-BHQ2
<i>Tlr4</i>	NM_021297.3	F:	CACTGGTTGCAGAAAATGCCA
		R:	GAACCTCTATGCAGGGATTCA
		P:	VIC-TGCCTCCCTGGCTCCTGGCT-BHQ2
<i>Tnf</i>	NM_013693.3	F:	TAGCCACGTCGTAGCAAAC
		R:	TGTCTTTGAGATCCATGCCGT
		P:	VIC-TGGAGTGGCTGAGCCAGCGC-BHQ2
<i>Il-6</i>	NM_031168	F:	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
		R:	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
		P:	ROX-ACAGATAAGCTGGAGTCACAGAAGGA-BHQ2
<i>iNos</i>	NM_010927.4	F:	GCTTCACTTCCAATGCAACA
		R:	CATGGTAAACACGTTCTTTG
		P:	Cy5-GCTCATCCAGAGCCCGGAGC-BHQ2

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер; P – зонд, меченный флуорофором (на 5'-конце) и тушителем (на 3'-конце).

наличию полос рННК (18S и 28S). Полученную РНК (2 мкг на реакцию) использовали в реакции обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT kit (“Евроген”). Синтезированную кДНК использовали в ПЦР-РВ с ген-специфическими олигонуклеотидами (табл. 1) и набором 5 $\times$ qPCRmix-HS (“Евроген”) в амплификаторе DTprime (“ДНК-технология”, Россия), Режим ПЦР-РВ: (1) “горячий старт” – 95 $^{\circ}$ C, 3 мин; (2) денатурация – 95 $^{\circ}$ C, 15 с; (3) отжиг праймеров и синтез цепи – 60 $^{\circ}$ C, 20 с + регистрация флуоресценции. Этапы 2 и 3 повторяли 40 раз. Изменения уровней экспрессии генов представлены в относительных единицах от значений в контроле для интактных клеток [31].

Уровень экспрессии генов нормировали по уровню гена цитоскелетного β -актина (ген *Actb* домашнего хозяйства). Значение Δ Ct рассчитывали по формуле Δ Ct = Ct (исследуемый ген) – Ct (*Actb*); $\Delta\Delta$ Ct рассчитывали по формуле Δ Ct (контроль) $\times$

$\times \Delta$ Ct(эксперимент). Различия в экспрессии генов рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, США). Статистическую значимость различий определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) на апостериорным критерием Тьюки. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние тимозина-1 α на экспрессию генов, регулирующих ответ клеток RAW 264.7 на липополисахарид

Методом ПЦР-РВ оценили экспрессию генов, известных как гены регуляторов ответа клеток на повреждающее воздействие эндотоксина. К таким генам относятся, в первую очередь, гены цитокинов, концентрация которых (TNF и IL-6)

Таблица 2. Уровень экспрессии мРНК, отн. ед.

Ген	Контроль	Tα1	ЛПС	ЛПС + Tα1
<i>Tnf</i>	1 ± 0.087	0.6 ± 0.038	4.95 ± 0.38#	3.2 ± 0.291*#
<i>IL-6</i>	1 ± 0.093	0.85 ± 0.073	2.45 ± 0.098#	2.15 ± 0.093#
<i>iNos</i>	1 ± 0.057	1.3 ± 0.095	8 ± 0.56#	13 ± 0.795*#
<i>Tlr4</i>	1 ± 0.062	0.45 ± 0.031#	2.45 ± 0.096#	1.35 ± 0.054*
<i>Nf-kb</i>	1 ± 0.069	0.4 ± 0.040#	3.7 ± 0.175#	3.05 ± 0.195*#
<i>Nrf-2</i>	1 ± 0.091	0.55 ± 0.025	1.2 ± 0.1	2.6 ± 0.097*#
<i>Ap-1</i>	1 ± 0.058	0.6 ± 0.048	6.5 ± 0.482#	1.85 ± 0.054*
<i>P53</i>	1 ± 0.084	0.3 ± 0.015#	8.5 ± 0.645#	5 ± 0.288*#

Статистически значимые отличия от контрольной группы, $p < 0.05$.

* Статистически значимые отличия от группы ЛПС, $p < 0.05$, $n = 3-4$.

Примечание. Представлены средние значения ± стандартная ошибка изменений уровней экспрессии генов по отношению к уровням в контрольных клетках RAW 264.7 в нормальных условиях.

обычно резко возрастает при воздействии эндотоксина. Что же касается генов этих цитокинов, то нами также отмечена значительная стимуляция экспрессии, особенно TNF (почти в 5 раз), и IL-6 – в 2.5 раза (табл. 1). При этом добавление Tα1 значимо снижало экспрессию TNF, индуцированную ЛПС. Важно отметить, что введение ЛПС в среду культивирования клеток RAW 264.7 вызывало значимое повышение экспрессии всех исследуемых генов, за исключением гена *Nrf-2*. Не отмечено сколько-нибудь заметной стимуляции экспрессии гена *Nrf-2* под воздействием ЛПС, хотя Tα1 на фоне ЛПС заметно стимулировал экспрессию этого гена, что свидетельствует о повышении антиоксидантной защиты клеток в присутствии тимусного пептида.

Следует отметить, что добавление Tα1 статистически значимо нормализовало экспрессию всех исследуемых генов. Единственное исключение составила экспрессия гена *Inos*, кодирующего индуцибельную NO-синтазу синтез которой в присутствии ЛПС увеличился в 8 раз, а при добавлении Tα1 – в 13.

Что же касается гена *Tlr4*, то в присутствии ЛПС его экспрессия возрастала почти в 2.5 раза, при этом добавление Tα1 приводило к значительному снижению экспрессии этого гена, что свидетельствует о нормализации, вызванной присутствием Tα1 в культуральной среде клеток RAW 264.7. Такие же изменения обнаружены и в экспрессии гена *Nf-kb*, повышенной в присутствии ЛПС почти в 4 раза, при этом добавление Tα1 значимо снижало экспрессию этого гена (табл. 2).

Тем не менее, определение экспрессии гена *Ap-1* показало, что присутствие ЛПС в среде культивирования клеток RAW 264.7 активировало экспрессию этого гена почти в 6.5 раза, при этом добавление Tα1 значительно снижало ее уровень. Экспрессия гена *P53*, регулирующего уровень

апоптоза клеток, в присутствии ЛПС резко увеличивается (в 8.5 раза), тогда как добавление Tα1 снижает этот эффект (табл. 2).

Продукция цитокинов и активных форм кислорода в альвеолярных макрофагах RAW 264.7, культивируемых в присутствии липополисахарида и тимозина-1α

Продукция нескольких провоспалительных цитокинов (TNF, IL-6, IL-1β) и противовоспалительного цитокина IL-10 была измерена методом иммуноферментного анализа (ИФА). Важно, что внесение в среду культивирования клеток RAW 264.7 ЛПС стимулировало продукцию всех исследованных цитокинов, при этом добавление Tα1 в разной степени нормализовало продукцию цитокинов. Особенно заметный эффект отмечен в случае IL-1β и IL-6 (рис. 1а). Однако добавление Tα1 не снижало продукцию TNF в макрофагах, активированных ЛПС.

Известно, что при воздействии ЛПС в клетке может возрастать продукция АФК. Действительно, с использованием флуоресцентного карбокси-H2DCFDA-зонда нами показано, что добавление ЛПС приводит к повышению в несколько раз количества АФК, продуцируемого в клетках RAW 264.7, причем добавление Tα1 полностью снимает этот эффект (рис. 1б). При этом добавление к клеткам только Tα1 не влияло на уровень АФК.

Интересно, что определение количества жизнеспособных макрофагов RAW 264.7 показало, что и ЛПС, и Tα1 стимулируют жизнеспособность клеток, причем эти эффекты были аддитивными (рис. 1в). Это важное наблюдение свидетельствует о том, что концентрация Tα1, равная 10 нг/мл и заметно превышающая концентрацию в контрольных клетках, не является токсичной.

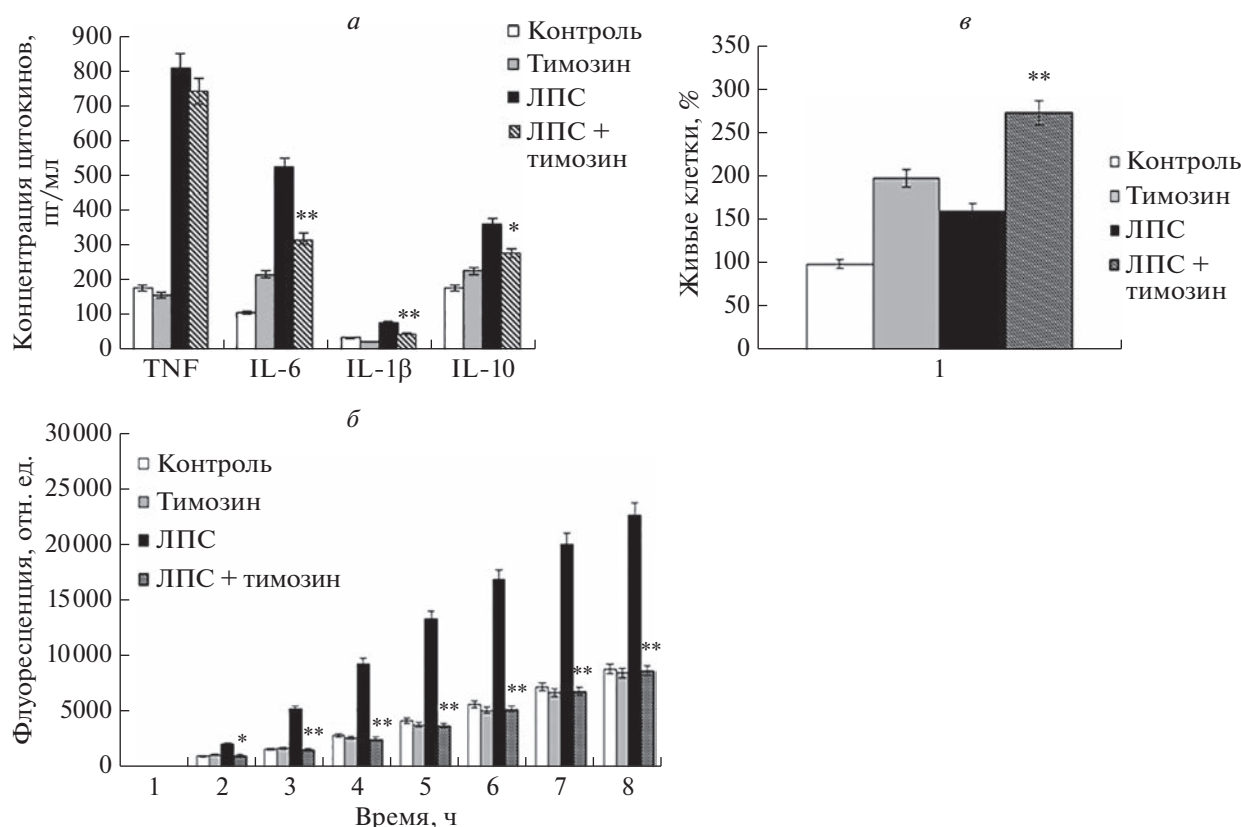


Рис. 1. Влияние тимозина-1альфа на продукцию цитокинов (а), продукцию АФК, оцениваемую по флуоресценции зонда (б), и количество живых клеток RAW 264.7 (в). Статистически значимые отличия от группы ЛПС: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $n = 3-4$.

Продукция белков, регулирующих активность сигнальных каскадов и TLR4, апоптоз клеток RAW 264.7

Известно, что сигнальный каскад NF- κ B является основным регулятором активности клеток в присутствии повреждающих агентов. Определение уровня белка p65 NF- κ B показало, что добавление ЛПС заметно увеличивает количество этого белка, тогда как добавление в среду культивирования клеток T α 1 полностью снимает эффект ЛПС. Таким образом, нами доказано, что T α 1 защищает клетки от действия эндотоксина. Рассмотрение активности другого каскада сигнальной трансдукции, SAPK/JNK, показало, что под влиянием ЛПС в клетках усиливается накопление фосфорилированных форм p46 и p54, а добавление T α 1 устраняет вызванную ЛПС функциональную активацию этих белков в клетке (рис. 2). Это свидетельствует о защитном потенциале T α 1, который отменял повреждающий эффект ЛПС, вызывающий активацию каскада SAPK/JNK.

Toll-подобные рецепторы (TLR) участвуют в передаче сигналов, активирующих каскад сиг-

нальной трансдукции NF- κ B. Самым изученным рецептором этого класса является трансмембранный рецептор TLR4. Нами показано, что культивирование клеток RAW 264.7 в присутствии ЛПС приводит к статистически значимому увеличению количества TLR4, тогда как добавление T α 1 полностью отменяет действие ЛПС (рис. 2).

На рис. 2 показаны также результаты определения количества белка NRF-2, который регулирует антиоксидантный ответ клеток. В присутствии ЛПС наблюдалось снижение уровня белка NRF-2, тогда как добавление T α 1 к среде культивирования клеток RAW 264.7 повышало уровень белка NRF-2 до значений, превышающих контрольный уровень.

Наконец, методом Вестерн-блотинга проанализировано изменение содержания белка p53, который участвует в регуляции уровня апоптоза в клетках. Установлено, что добавление ЛПС приводит к увеличению содержания p53, что указывает на индукцию апоптоза в клетках RAW 264.7 в присутствии эндотоксина. Если же к клеткам добавляли T α 1, то наблюдали снижение уровня белка p53, что указывает на возможность изменения уровня апоптоза (рис. 2).

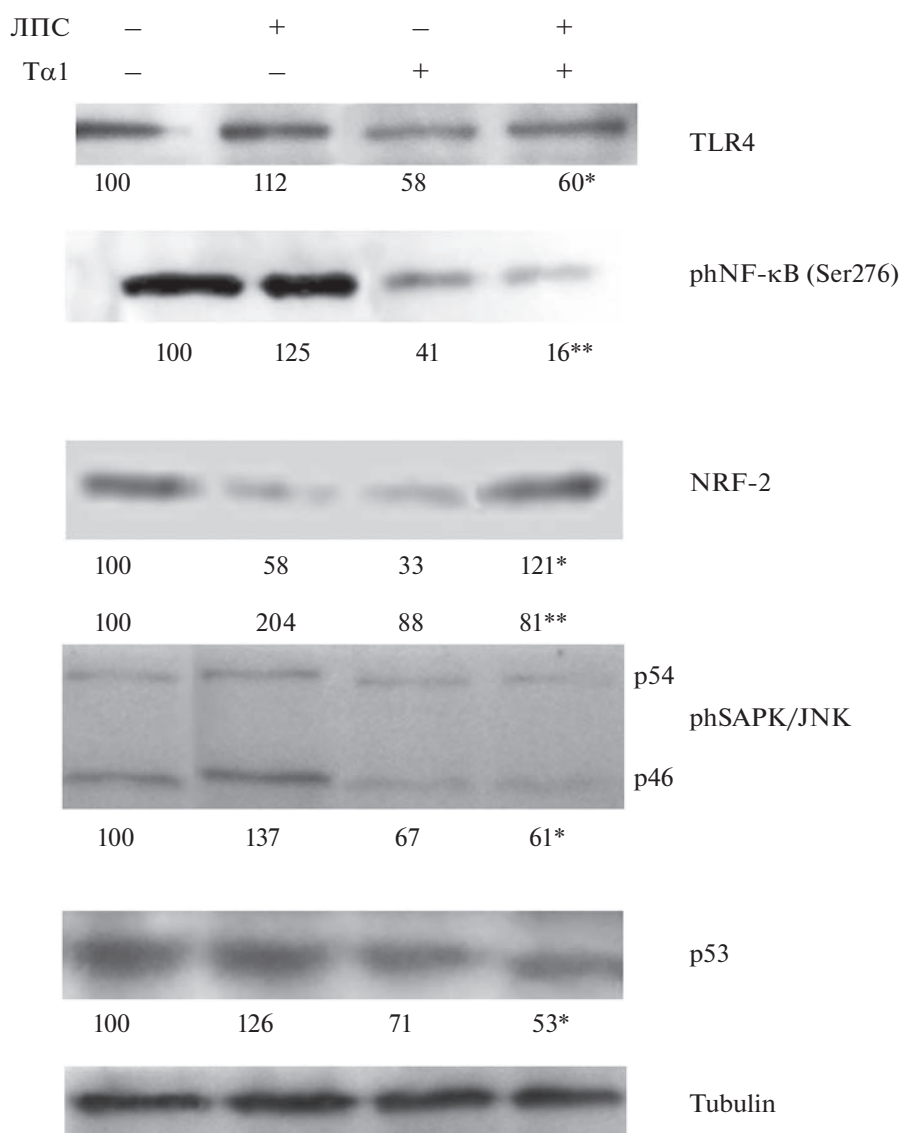


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ белков (TLR4, NF-κB и SAPK/JNK, NRF-2, p53) в клетках RAW 264.7, культивируемых в разных условиях. Представлены результаты типичного эксперимента. Под иммуноблотами указано содержание белков (в относительных единицах), рассчитанное по усредненным результатам денситометрического определения в трех независимых экспериментах. Статистически значимые отличия от величин в клетках, инкубированных с добавлением ЛПС: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Содержание phNF-κB (Ser276) определяли с использованием антител к субъединице p65.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эффективность Tα1 в качестве противовоспалительного агента изучена нами на альвеолярных макрофагах RAW 264.7, которые подвергали воздействию эндотоксина (ЛПС), наиболее часто используемого для моделирования воспаления. Анализировали такие функции клеток, как продукция про- и противовоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-10), образование АФК, активность сигнальных каскадов NF-κB и SAPK/JNK, продукция NRF-2, TLR4, p53, а также активность ряда генов, регулирующих синтез этих ключевых агентов.

Ранее, используя макрофаги RAW 264.7, мы показали, что и другие пептиды тимуса (тимулин и тимопентин) проявляют противовоспалительный эффект в клетках, обработанных ЛПС [6]. Оба пептида снижали секрецию провоспалительных цитокинов в макрофагах RAW 264.7, культивируемых с ЛПС, и эти эффекты блокировались ингибиторами каскадов NF-κB и стресс-активируемой протеинкиназы SAPK/JNK, а также, в меньшей степени, ингибитором TLR4.

В макрофагах RAW 264.7, стимулированных бактериальным ЛПС, сами пептиды не влияли на секрецию цитокинов, но значительно усиливали

эффекты каждого из ингибиторов. Тимопентин повышал активацию каскадов NF- κ B и SAPK/JNK в нестимулированных макрофагах, в то время как тимудин значительно снижал активацию каскада SAPK/JNK, но не NF- κ B, в макрофагах, стимулированных ЛПС. Тимудин и тимопентин увеличивали продукцию белка теплового шока HSP72 и в стимулированных, и в нестимулированных ЛПС клетках [6].

Возможность применения гормонов тимуса (тимудина и тимопентина) в качестве противовоспалительных агентов была подтверждена нами ранее [4–6]. В настоящей работе мы анализировали противовоспалительную эффективность Т α 1. Можно было предположить, что Т α 1 способен компенсировать состояние хронического воспаления, вызванного эндотоксином. В реальности для понимания механизма действия гормонов тимуса полезно учитывать роль возрастной инволюции тимуса и недостаток секреции гормонов тимуса для процессов старения и, особенно, “воспалительного старения”.

Еще два века назад средняя продолжительность жизни человека даже в самых развитых странах не превышала 40–45 лет, хотя и тогда были долгожители. Однако улучшение условий жизни и достижения медицины привели к росту продолжительности жизни, а, следовательно, к старению значительной части населения [32].

Иммунная система человека вынуждена справляться с эволюционно непредсказуемым воздействием различных антигенов, что лежит в основе глубоких возрастных изменений, обозначаемых как иммуносенесценция, или иммуностарение. Основные изменения, происходящие при иммуностарении, обусловлены накоплением клеточных, молекулярных дефектов и инволюционных событий (например, инволюцией тимуса), происходящих одновременно с гиперстимуляцией как врожденного, так и адаптивного иммунитета (накопление размножившихся клонов клеток памяти и эффекторных Т-клеток, сокращение репертуара Т-клеточных рецепторов, прогрессивная активация макрофагов), что приводит к вялотекущему хроническому воспалению [19].

Корреляции между хроническим воспалением и старением объясняются в рамках “сетевой теории старения”, которая рассматривает глобальное снижение способности справляться с различными стрессорами и сопутствующее прогрессирующее увеличение провоспалительного статуса в качестве основных характеристик процесса старения [3]. Эти характеристики, определяемые как “воспалительное старение”, возникают в результате антигенной нагрузки и стресса, причем согласно данным эволюционных исследований, иммунная реакция и реакция на стресс эквивалентны. Можно сослаться на особую роль макро-

фагов в качестве действующего агента не только в воспалительной реакции и иммунитете, но и в реакции на стресс [33]. При этом утверждается, что сохранение воспалительных стимулов с течением времени можно рассматривать как биологический фон, благоприятствующий восприимчивости к возрастным заболеваниям [33]. Наконец, дефицит устойчивых вариантов генов или наличие слабых вариантов генов необходимы, вероятно, для развития явных органоспецифических возрастных заболеваний, имеющих воспалительный патогенез, таких как атеросклероз, болезнь Альцгеймера, остеопороз и сахарный диабет. В согласии с этим феноменом объясняются несколько парадоксов здоровых долгожителей (повышение уровня воспалительных цитокинов в плазме, белков острой фазы и факторов свертывания крови). Однако согласно антагонистической плейотропной теории старения, положительные эффекты воспаления, направленные на нейтрализацию вредных агентов в раннем и во взрослом возрасте, становятся пагубными в конце жизни, в период, в значительной степени не предвиденный эволюцией [33].

Более того, изучение молекулярных механизмов, связанных со старением тимуса, показало необходимость учета биологических переменных, таких как пол и особенности питания, при изучении роли генов, участвующих в молекулярных процессах, ответственных за инволюцию тимуса [34]. Использование модельных организмов облегчает проверку различных гипотез о роли генетики в иммунных реакциях. Используя несколько полученных из природной популяции линий *Drosophila melanogaster* с хромосомными заменами [35], обнаружили значительную генетическую изменчивость иммунного ответа мух разных линий на *E. coli*, демонстрирующую улучшение, отсутствие изменений или их снижение с возрастом. В целом, эти данные предполагают, что разные локусы вносят вклад в вариации иммунных ответов в каждом возрасте, что согласуется с моделью накопления мутаций при старении. Ранее было установлено, что в зрелых макрофагах Т α 1 осуществляет интернализацию и уничтожение патогенов посредством стимуляции фагоцитоза, опосредованного рецептором комплемента [36]. Эти наблюдения подтверждают, что Т α 1 является ранним и мощным активатором врожденного иммунитета, а также свидетельствуют в пользу концепции его плейотропности.

Важная роль при старении принадлежит не только цитокинам, но также окислительному стрессу, при этом транскрипционный фактор NRF-2 является одной из основных антиоксидантных систем [30, 37, 38]. В нашей работе показано, что добавление ЛПС к клеткам приводит к значительному снижению содержания белка NRF-2, при этом добавление Т α 1 к культивиру-

ванным макрофагам полностью снимает этот эффект. Более того, $T\alpha 1$ стимулирует экспрессию гена *Nrf-2*.

Семейство димерных транскрипционных комплексов AP-1 участвует практически во всех клеточных и физиологических функциях. До недавнего времени оставалось неясным, каким образом AP-1 контролирует транскрипцию генов. Однако появление новых технологий, позволяющих изучать факторы транскрипции в масштабах всего генома, изменило взгляд на механистическое действие AP-1. Есть основание полагать, что AP-1 может действовать как локальный переключатель транскрипции, действующий вблизи сайтов начала транскрипции [39]. Все указывает на то, что AP-1 в основном действует как дистанционная команда, определяющая динамику архитектуры хроматина [40]. В нашей работе доказано, что увеличение экспрессии гена *Ap-1* под влиянием ЛПС в значительной мере редуцировалось при использовании $T\alpha 1$.

При подборе подходящей дозы $T\alpha 1$, добавляемой к клеткам, мы опирались на данные, согласно которым концентрация $T\alpha 1$ в крови человека составляет 0.1–1 нг/мл [41]. Мы испробовали две терапевтические дозы $T\alpha 1$ *in situ*: 10 и 50 нг/мл. Анализ предварительных данных показал, что эффект $T\alpha 1$ почти не зависит от используемой дозы, поэтому была выбрана доза 10 нг/мл, чтобы исключить возможный токсический эффект $T\alpha 1$.

Известно, что стрессовые агенты повышают активность сигнальных каскадов NF- κ B и SAPK/JNK. Действительно, нами показано, что добавление ЛПС к клеткам RAW 264.7 приводит к увеличению количества регуляторных белков, однако эта активация снималась в присутствии $T\alpha 1$.

Таким образом, изучение эффектов $T\alpha 1$ на стрессированные макрофаги RAW 264.7 в присутствии ЛПС показало, что $T\alpha 1$ защищает клетки от воздействия эндотоксина, почти во всех случаях нормализуя уровни изучаемых белков и экспрессию генов. Такое свойство тимусного пептида $T\alpha 1$ делает его возможным претендентом на роль иммунотерапевтического средства, которое может использоваться для снижения патологических признаков, связанных не только с развитием вирусных и онкологических заболеваний, но и со старением.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект 23-24-00041).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gruver A.G., Ventevogel M.S., Sempowski G.D. (2009) Leptin receptor is expressed in thymus medulla and leptin protects against thymic remodeling during endotoxemia induced thymus involution. *J. Endocrinol.* **203**, 75–85.
2. Haynes B.F., Markert M.L., Sempowski G.D., Patel D.D., Hale L.P. (2000) The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 529–560.
3. Franceschi C., Bonafè M., Valensin S., Olivieri F., De Luca M., Ottaviani E., De Benedictis G. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908**, 44–54.
4. Lunin S.M., Khrenov M.O., Novoselova T.V., Parfenyuk S.B., Novoselova E.G. (2008) Thymulin, a thymic peptide, prevents the overproduction of pro-inflammatory cytokines and heat shock protein Hsp70 in inflammation-bearing mice. *Immunol. Invest.* **37**, 858–870.
5. Лунин С.М., Новоселова Т.В., Хренов М.О., Глушкова О.В., Парфенюк С.Б., Смолихина Т.И., Фесенко Е.Е., Новоселова Е.Г. (2009) Иммуномодулирующие эффекты тимопентина при остром и хроническом воспалениях у мышей. *Биофизика.* **54**, 260–266.
6. Lunin S.M., Glushkova O.V., Khrenov M.O., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Fesenko E.E., Novoselova E.G. (2011) Thymus peptides regulate activity of RAW 264.7 macrophage cells: inhibitory analysis and a role of signal cascades. *Expert Opin. Ther. Targets.* **15**, 1337–1346.
7. Lunin S.M., Glushkova O.V., Khrenov M.O., Novoselova T.V., Parfenyuk S.B., Fesenko E.E., Novoselova E.G. (2013) Thymic peptides restrain the inflammatory response in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology.* **218**, 402–407.
8. Lunin S.M., Khrenov M.O., Novoselova T.V., Parfenyuk S.B., Glushkova O.V., Fesenko E.E., Novoselova E.G. (2015) Modulation of inflammatory response in mice with severe autoimmune disease by thymic peptide thymulin and inhibitor of NF- κ B signaling. *Int. Immunopharmacol.* **25**, 260–266.
9. Lunin S.M., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Vinogradova E.V., Yashin V.A., Fesenko E.E., Novoselova E.G. (2017) Extrathymic production of thymulin induced by oxidative stress, heat shock, apoptosis, or necrosis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **30**, 58–69.
10. Lunin S.M., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Novoselova E.G. (2019) Immune response in the relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: the role of the NF- κ B signaling pathway. *Cell. Immunol.* **336**, 20–27.
11. Lunin S.M., Novoselova E.G., Glushkova O.V., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Khrenov M.O. (2022) Cell senescence and central regulators of immune response. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 4109.
12. Lunin S.M., Novoselova E.G. (2010) Thymus hormones as prospective anti-inflammatory agents. *Expert Opin. Ther. Targets.* **14**, 775–786.

13. Novoselova E.G., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Lunin S.M., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Fesenko E.E. (2014) Anti-inflammatory effects of IKK inhibitor XII, thymulin, and fat-soluble antioxidants in LPS-treated mice. *Mediators Inflamm.* **2014**, 724838.
14. Novoselova E.G., Lunin S.M., Glushkova O.V., Khrenov M.O., Parfenyuk S.B., Zakharova N.M., Fesenko E.E. (2018) Thymulin, free or bound to PBCA nanoparticles, protects mice against chronic septic inflammation. *PLoS One.* **13**, e0197601.
15. Lunin S.M., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Novoselova E.G. (2020) Precursors of thymic peptides as stress sensors. *Expert Opin. Biol. Ther.* **20**, 1461–1475.
16. Aspinall R., Andrew D. (2000) Thymic involution in aging. *J. Clin. Immunol.* **20**, 250–256.
17. Gruver A.L., Sempowski G.D. (2008) Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 915–923.
18. Medzhitov R. (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* **140**, 771–776.
19. Ostan R., Bucci L., Capri M., Salvioli S., Scurti M., Pini E., Monti D., Franceschi C. (2008) Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation.* **15**, 224–240.
20. Chen L., Deng H., Cui H., Fang J., Zuo Z., Deng J., Li Y., Wang X., Zhao L. (2018) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* **9**, 7204–7218.
21. Reville K., Crean J.K., Vivers S., Dransfield I., Godson C. (2006) Lipoxin A4 redistributes myosin IIA, Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J. Immunol.* **176**, 1878–1888.
22. Headland S.E., Norling L.V. (2015) The resolution of inflammation: principles and challenges. *Semin. Immunol.* **27**, 149–160.
23. Serhan C.N., Savill J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197.
24. Новоселова Е.Г., Лунин С.М., Хренов М.О., Новоселова Т.В., Фесенко Е.Е. (2009) Участие сигнального каскада NF- κ B в реализации анти-воспалительной активности тимусных пептидов. *ДАН.* **428**, 707–709.
25. Lunin S.M., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Novoselova E.G. (2019) Protective effect of PBCA nanoparticles loaded with thymulin against the relapsing-remitting form of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E5374.
26. Romani L., Bistoni F., Montagnoli C., Gaziano R., Bozza S., Bonifazi P., Zelante T., Moretti S., Rasi G., Garaci E., Puccetti P. (2007) Thymosin alpha 1: an endogenous regulator of inflammation, immunity, and tolerance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1112**, 326–338.
27. Liu F., Wang H.-M., Wang T., Zhang Y.-M., Zhu X. (2016) The efficacy of thymosin α 1 as immunomodulatory treatment for sepsis: a systematic review of randomized controlled trials. *BMC Infect. Dis.* **16**, 488.
28. Pica F., Chimenti M.S., Gaziano R., Buè C., Casalinuovo I.A., Triggianese P., Conigliaro P., Di Carlo D., Cordero V., Adorno G., Volpi A., Perricone R., Garaci E. (2016) Serum thymosin α 1 levels in patients with chronic inflammatory autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **186**, 39–45.
29. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F., Biasini C., Zanni F., Zanlari L., Telera A., Lucchini G., Passeri G., Monti D., Franceschi C., Passeri M. (2008) The immune system in extreme longevity. *Exp. Gerontol.* **43**, 61–65.
30. Shi Q.-X., Chen B., Nie C., Zhao Z.-P., Zhang J.-H., Si S.-Y., Cui S.-J., Gu J.-W. (2020) Improvement in cognitive dysfunction following blast induced traumatic brain injury by thymosin α 1 in rats: involvement of inhibition of Tau phosphorylation at the Thr205 epitope. *Brain Res.* **1747**, 147038.
31. Sharapov M.G., Novoselov V.I., Penkov N.V., Fesenko E.E., Vedunova M.V., Bruskov V.I., Gudkov S.V. (2018) Protective and adaptogenic role of peroxiredoxin 2 (Prx2) in neutralization of oxidative stress induced by ionizing radiation. *Free Radic. Biol. Med.* **134**, 76–86.
32. World Health Organization. (2002) *The European Health Report 2002*. European Ser. **97**. Geneva, Switzerland.
33. Fujiwara N., Kobayashi K. (2005) Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflam. Allergy.* **4**, 281–286.
34. Lustig A., Weeraratna A.T., Wood 3rd W.W., Teichberg D., Bertak D., Carter A., Poosala S., Firman J., Becker K.G., Zonderman A.B., Longo D.L., Taub D.D. (2007) Transcriptome analysis of age-, gender- and diet-associated changes in murine thymus. *Cell Immunol.* **245**, 42–61.
35. Lesser K.J., Paiusi I.C., Leips J. (2006) Naturally occurring genetic variation in the age-specific immune response of *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell.* **5**, 293–295.
36. Serafino A., Pica F., Andreola F., Gaziano R., Moroni N., Moroni G., Zonfrillo M., Pierimarchi P., Sinibaldi-Vallebona P., Garaci E. (2014) Thymosin α 1 activates complement receptor-mediated phagocytosis in human monocyte-derived macrophages. *J. Innate Immun.* **6**, 72–88.
37. Cichon A.C., Brown D.R. (2014) Nrf-2 regulation of prion protein expression is independent of oxidative stress. *Mol. Cell. Neurosci.* **63**, 31–37.
38. Yanaka A., Zhang S., Tauchi M., Suzuki H., Shibahara T., Matsui H., Nakahara A., Tanaka N., Yamamoto M. (2005) Role of the Nrf-2 gene in protection and repair of gastric mucosa against oxidative stress. *Inflammopharmacology.* **13**, 83–90.
39. Seo J., Koçak D.D., Bartelt L.C., Williams C.A., Barrera A., Gersbach C.A., Reddy T.E. (2021) AP-1 subunits converge promiscuously at enhancers to potentiate transcription. *Genome Res.* **31**, 538–550.
40. Manna P.R., Eubank D.W., Stocco D.M. (2019) The AP-1 transcriptional complex: local switch or remote command. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* **1872**, 11–23.
41. Weller F.E., Shah U., Cummings G.D., Chretien P.B., Mutchnick M.G. (1992) Serum levels of immunoreactive thymosin alpha 1 and thymosin beta 4 in large cohorts of healthy adults. *Thymus.* **19**, 45–52.

The Thymic Hormone Thymosin-1 α Reduces the Pro-Inflammatory Response of RAW 264.7 Cells Induced by Endotoxin

E. G. Novoselova¹, *, O. V. Glushkova¹, M. O. Khrenov¹, S. M. Lunin¹, M. G. Sharapov¹, R. G. Goncharov¹, E. K. Mubarakshina¹, T. V. Novoselova¹, and S. B. Parfenyuk¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

**e-mail: elenanov_06@mail.ru*

The aim of this work was to study effects of thymosin-1 α (T α 1) on the anti-inflammatory response of RAW 264.7 macrophages cultured in the presence of lipopolysaccharide (LPS) from the walls of gram-negative bacteria. Also we evaluated production of pro-inflammatory cytokines and activity of the NF- κ B and SAPK/JNK signaling pathways. In addition, the level of expression of a number of genes that regulate cell apoptosis, as well as the activity of receptors involved in the pro-inflammatory response, was determined. Firstly, the addition of T α 1 normalized the level of cytokine production to varying degrees, with a particularly noticeable effect on IL-1 β and IL-6. Secondly, the addition of T α 1 normalized activity of the NF- κ B and SAPK/JNK signaling cascades and the expression of the *Tlr4* gene. Thirdly, T α 1 significantly reduced p53 and the activity of the *P53* gene, which is a marker of cell apoptosis. Fourthly, it was shown that an increase in *Ar-1* gene expression under the influence of LPS was significantly reduced using T α 1. Thus, it was found that the presence of T α 1 in the RAW 264.7 cell culture medium significantly reduced the level of the pro-inflammatory response of cells.

Keywords: thymosin-1 α , inflammation, signaling pathways, cytokines, gene expression

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

УДК 577.2:616-006:615.277

ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ HSP70 И ДОНОРОВ СЕРОВОДОРОДА В МАКРОФАГАХ TLR-1 ПРИ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ С УЧАСТИЕМ ЭНДОЦИТОЗА

© 2023 г. М. М. Юринская^а, Д. Г. Гарбуз^б, М. Б. Евгеньев^{а, б, *}, М. Г. Винокуров^а

^аИнститут биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: misha672011@yahoo.com

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 19.04.2023 г.

Принята к публикации 17.05.2023 г.

Известно, что Hsp70 и доноры сероводорода уменьшают воспалительные процессы в клетках человека и животных, однако молекулярные механизмы их действия изучены недостаточно. Эффекты Hsp70 и доноров H₂S (GY4137 и тиосульфат натрия) зависят от кинетики защиты клеток от активации липополисахаридами (ЛПС). В работе изучено влияние рекомбинантного Hsp70 человека и доноров H₂S на образование активных форм кислорода и фактора некроза опухоли-альфа, индуцированных в клетках человека (TLR-1) ЛПС. Определены изменения транскриптома в этих клетках после введения ЛПС в сочетании с предварительной обработкой GY4137. Показано, что Hsp70 и доноры сероводорода снижают воспалительные процессы в клетках, активированных ЛПС. Hsp70 и доноры H₂S различались кинетикой защитного действия, при этом более эффективными оказались доноры сероводорода. Изучена роль эндоцитоза в механизмах защиты клеток донорами H₂S и Hsp70 от действия ЛПС. Установлено, что предварительная обработка клеток, подвергающихся воздействию ЛПС, донором сероводорода GY4137 снижает индукцию провоспалительных генов и влияет на экспрессию генов разных путей внутриклеточной сигнализации.

Ключевые слова: доноры H₂S, GY4137, STS, Hsp70, липополисахариды, макрофаги TLR-1, TNFα, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S002689842306023X, **EDN:** QMZEBQ

ВВЕДЕНИЕ

В этиопатогенезе широкого спектра заболеваний важную роль играют воспалительные процессы, активаторами которых часто выступают эндотоксины (липополисахариды, ЛПС). К основным источникам ЛПС в организме относятся грамотрицательные бактерии, входящие в состав микробиома человека, а поступление ЛПС из просвета кишечника в кровяное русло (эндотоксемия) [1] считается важным патогенетическим фактором грамотрицательного сепсиса, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, сахарного диабета типа 2 и других. Кроме того, важную роль в развитии многих хронических заболеваний животных и человека играет метабо-

лическая эндотоксемия, к развитию которой приводят нарушения в питании [2].

Циркулирующие в крови ЛПС активируют различные клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы, моноциты, макрофаги и др.) [3] посредством цепи последовательных событий. Сначала ЛПС связываются со вспомогательными белками LBP и CD14, затем сигнал от них передается на Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) в комплексе с MD2. После димеризации комплекса TLR4-MD2 на клеточной поверхности происходит MyD88-зависимая передача сигналов с последующей экспрессией факторов транскрипции (NF-κB и др.). Интернализация TLR4 индуцирует MyD88-независимую (TRIF-зависимую) передачу сигналов в эндосомах и экспрессию таких регуляторов, как интерферон-регуляторный фактор 3 (IRF-3) и, в конечном итоге, интерфероны (IFN) типа 1. Это приводит к синтезу цитокинов и хемокинов, таких как IL-1β, IL-6, IL-8, CCL2 и

Сокращения. Hsp70 — белок теплового шока 70 кДа, ЛПС — липополисахарид; АФК — активные формы кислорода; TNFα — фактор некроза опухоли-альфа; STS — тиосульфат натрия.

TNF α , с использованием MyD88-зависимых путей, а CXCL10, CCL5, IFN- β и оксида азота посредством MyD88-независимых путей [4]. Постоянное пополнение пула провоспалительных цитокинов приводит к слабовыраженному системному хроническому воспалению [5].

Один из природных лигандов TLR4 — индуцибельная форма белка теплового шока Hsp70, отвечающего также за фолдинг белков, синтезируемых в клетке, рефолдинг частично денатурированных белков при различных видах стресса, в том числе при тепловом шоке [6, 7].

Ранее было показано, что рекомбинантный Hsp70 обладает противовоспалительным действием, ингибирует продукцию активных форм кислорода (АФК), а также экспрессию основных медиаторов воспаления (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и др.) нейтрофилами и макрофагами в ответ на различные бактериальные токсины [8–11]. Взаимодействие эндогенного Hsp70 с TLR4 приводит к быстрому фагоцитозу образовавшегося комплекса [12]. Также известно, что эндогенный внутриклеточный Hsp70 ингибирует активность TLR4, способствуя его убиквитинзависимой деградации [13].

Еще одно важное противовоспалительное соединение — газотрансмиссер сероводород (H₂S), образуется в клетках в результате процесса транссульфурации, описанного у большинства прокариотических и эукариотических организмов, включая человека [14]. У млекопитающих H₂S продуцируется клетками с помощью различных ферментов, преимущественно цистатионин- β -синтазы (CBS), цистатионин- γ -лиазы (CSE) и 3-меркаптопируват-сульфидтрансферазы (3-MST), но часть H₂S продуцируется кишечной микробиотой. Подавление эндогенных ферментов, участвующих в образовании H₂S при различных заболеваниях, или генетические дефекты ферментных систем биосинтеза H₂S приводят к развитию различных патологий, включая онкологические, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, аутоиммунные (ревматоидный артрит, астма) и др. [15–18]. В последние годы наши исследования защитных свойств рекомбинантного Hsp70 человека и различных доноров H₂S показали, что эти соединения защищают клетки от действия ЛПС [6, 11, 19, 20]. Известно также, что повышенный уровень H₂S в клетках может приводить к индукции образования Hsp70 [21]. Ранее мы изучали влияние экзогенного Hsp70 на функциональные свойства клеток нейробластомы при действии различных ингибиторов эндозитоза [22]. В настоящей работе исследовали действие белка Hsp70 на клетки ТНР-1 в присутствии ЛПС и доноров сероводорода разной природы — GYY4137 и тиосульфата натрия (STS).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали культуральную среду RPMI-1640, флуоресцентный зонд SF7-AM, HEPES, L-глутамин, фосфатно-солевой буфер (PBS), краситель Crystal Violet, краситель нитросиний тетразолий (НСТ), краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид (МТТ), актиномицин D, додецилсульфат натрия (SDS), пенициллин, стрептомицин, диметилсульфоксид (ДМСО), раствор Трипсина-Версена, ЛПС из *Escherichia coli* O55:B5, GYY4137 (морфолин-4-иум (4-метоксибензил)морфолин-4-илфосфинодиитиоат) (все “Sigma-Aldrich”, США); эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (ЭТС), тестируемая на присутствие эндотоксина 0.01 ед./мл (“HyClone”, США); ди-насор (Dyp), амилорид (Am), метил-бета-циклодекстрин (MBCD), нокодазол (Noc), филиппин (Fil) (“Sigma-Aldrich”); STS (“Дальхимфарм”, Россия).

Выделение рекомбинантного Hsp70 человека. Рекомбинантный Hsp70 человека с пятью аминокислотными заменами, повышающими растворимость и стабильность белка [23], продуцировали в бактериальной культуре с использованием конструкции на основе вектора pET-14b и очищали методом металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA-сефарозе и аффинной хроматографии на АТР-агарозе. Дополнительную доочистку препаратов Hsp70 от остаточного ЛПС проводили на полимиксин- или полилизин-агарозе, степень очистки контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и LAL-теста согласно инструкции производителя. Концентрацию очищенного белка измеряли по методу Брэдфорда (Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit).

Культуры клеток. Линия промоноцитов человека, ТНР-1, получена из Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC, США), линия клеток L-929 фибробластов мыши — из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (“Sigma-Aldrich”), содержащей 10% термоинактивированной ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C и 5% CO₂.

Дифференцировку клеток ТНР-1 проводили в культуральной среде (КС) в 24-луночных плоскостонных планшетах с добавлением 200 нМ форбол-12-миристан-13-ацетата (РМА) в течение 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂, промывали КС и затем использовали в экспериментах. К клеткам добавляли 2 мкг/мл Hsp70, 2 мМ STS или 200 мкМ GYY4137 на 120 мин, затем в соответствующие образцы добавляли 1 мкг/мл ЛПС из *E. coli* (серотип O55:B5) и инкубировали в течение 24 ч при +37°C в атмосфере 5% CO₂.

Образование активных форм кислорода (АФК) в клетках ТНР-1 определяли с использованием красителя НСТ [24]. Этот метод отражает активность кислородзависимого клеточного метаболизма — источника АФК. По окончании культивирования из планшетов с клетками отбирали КС, клетки промывали PBS и добавляли 0.1%-ный раствор НСТ (2 ч при +37°C и 5% CO₂). Затем клетки отмывали 2 раза PBS, фиксировали этанолом и сушили. Образовавшийся внутриклеточный формазан растворяли в 300 мкл 2 М КОН и 400 мкл ДМСО на лунку. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 620 нм на планшетном ридере “Униплан” (“Пикон”, Россия).

Продукцию TNFα определяли по цитотоксическому действию образцов на клетки-мишени — линию фибробластов L-929 мыши [19]. Клетки L-929 культивировали в 96-луночных планшетах (2 × 10⁴ в 100 мкл среды на лунку) при +37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч, затем к образовавшемуся монослою добавляли актиномицин D (1 мкг/мл), а затем по 100 мкл супернатанта исследуемых клеток. К контрольным лункам добавляли только КС. Планшеты инкубировали в течение 24 ч, затем клетки отмывали фосфатным буфером, окрашивали красителем Crystal Violet (“Sigma-Aldrich”, США) и определяли выживаемость клеток после растворения кристаллов в 1%-ном растворе SDS. Оптическую плотность измеряли при 595 нм на планшетном ридере “Униплан” (“Пикон”, Россия). Продукцию TNFα определяли по индексу цитотоксичности [25].

Жизнеспособность клеток контролировали с использованием МТТ-теста [19, 20]. Жизнеспособность клеток в экспериментальных пробах была не менее 96–99%.

Образование сероводорода в клетках. Образование H₂S под действием доноров сероводорода GYY4137 и STS регистрировали на проточном цитометре CytoFLEX (“Beckman Coulter”, США) с использованием флуоресцентного зонда SF7-AM [26]. Показано, что добавление GYY4137 и STS приводило к высвобождению H₂S в клетках ТНР-1, что полностью соответствует результатам, приведенным в [19].

Ингибиторный анализ. В экспериментах использовали следующие ингибиторы эндоцитоза: амилорид (Amil), нокодазол (Noc), филиппин (Fil), динасор (Dyn), Метил-β-циклодекстрин (MBCD). Ингибиторы добавляли к клеткам за 30 мин до введения Hsp70, ЛПС и доноров сероводорода (GYY4137 и STS) [27]. Оптимальные и нетоксичные концентрации ингибиторов определяли, используя предварительно установленные максимальные нетоксичные концентрации (данные не приведены).

Регистрация действия Hsp70-Alexa 555 на клетки ТНР-1. Клетки ТНР-1 в КС с 10% ЭТС помещали в 35 мм чашки Петри с повышенной адгезией (“Eppendorf”, Германия) и добавляли 200 нМ РМА. Клетки дифференцировали в течение 72 ч при +37°C в атмосфере 5% CO₂, промывали КС, снимали с поверхности с помощью раствора Трипсина–Версена и использовали в экспериментах. Суспензию дифференцированных клеток ТНР-1 (1 × 10⁶/мл) в бессывороточной КС без фенолового красного разливали в микропробирки по 300 мкл, вносили добавки (ингибиторы) и инкубировали в течение 30 мин при +37°C и 5% CO₂. Затем клетки центрифугировали (отмывали от ингибиторов) при 250 g в течение 5 мин, разводили осадок в 300 мкл бессывороточной КС без фенолового красного и добавляли Hsp70-Alexa 555 в конечной концентрации 1 мкг/мл. Hsp70, меченный Alexa 555 (Hsp70-Alexa 555), любезно предоставлен Б. Маргулисом (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Пробы инкубировали при +37°C и 5% CO₂ в течение 3 ч, этот интервал времени был выбран, исходя из результатов, полученных в [12], а затем измеряли на цитометре CytoFLEX (“Beckman Coulter”).

Статистика. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, вычисленные в шести независимых экспериментах, выполненных в четырех повторностях. Различия между группами анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с попарными сравнениями Тьюки. Нормальность распределения анализируемых величин проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Пороги значимости были следующими: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.005, *****p* < 0.001, #*p* < 0.001, ##*p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кинетика защиты клеток ТНР-1 белком теплового шока Hsp70, GYY4137 и STS от ЛПС-индуцированной активации

Инкубация клеток с Hsp70 (2 мкг/мл), GYY4137 (200 мкМ) и STS (2 мМ) в течение 24 ч приводит (по сравнению с контрольными клетками) к небольшому увеличению продукции TNFα клетками — до 17, 9 и 7 пг/мл соответственно (рис. 1а, 1). Добавление Hsp70, GYY4137 и STS к клеткам за 2 ч до ЛПС снижает продукцию TNFα (по сравнению с действием ЛПС) на 61, 69 и 65% соответственно. Исследование кинетики защитного действия использованных соединений показало, что при предварительной обработке клеток в течение 20 мин (до добавления ЛПС) эффективность защиты достигает 50% (рис. 1б). Из трех соединений наиболее эффективно клетки от действия ЛПС защищал GYY4137. Эффективность Hsp70, GYY4137 и STS можно оценить, сравнивая

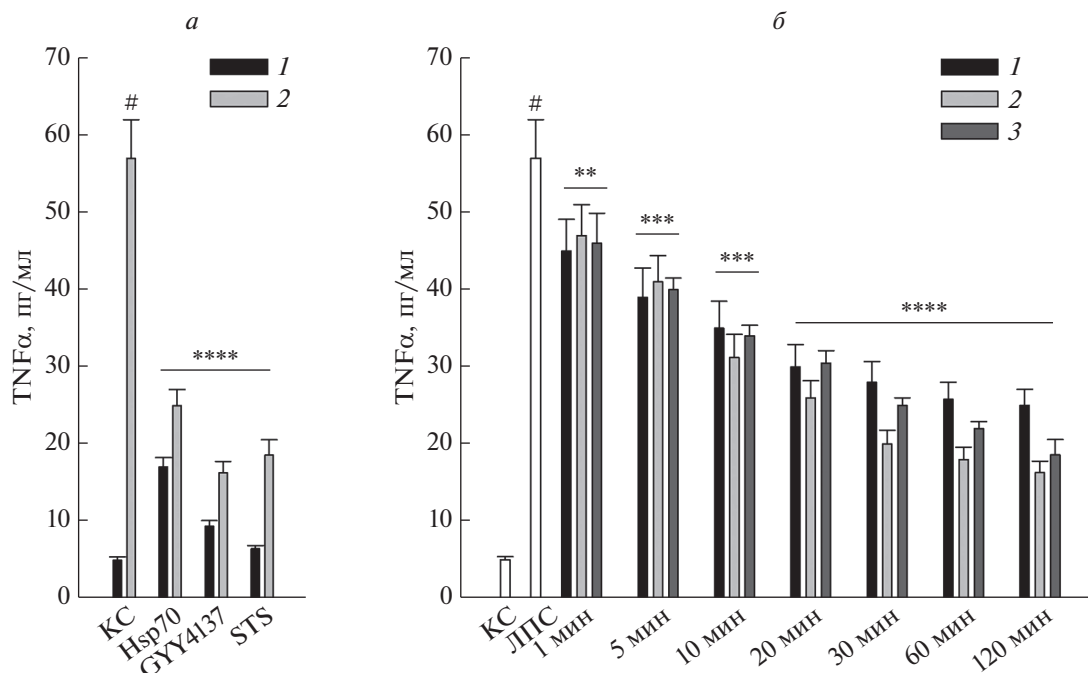


Рис. 1. Действие Hsp70, GYY4137 и STS на ЛПС-индуцированную продукцию TNF α клетками THP-1. *а:* 1 – продукция TNF α клетками в отсутствие ЛПС; 2 – продукция TNF α клетками в присутствии ЛПС. *б:* 1 – 2 мкг/мл Hsp70; 2 – 200 мкМ GYY4137; 3 – 2 мМ STS. 1, 2 и 3 – последовательное добавление к клеткам сначала одного из соединений (Hsp70, GYY4137 и STS), а затем (в интервале 1–120 мин) ЛПС. Концентрация ЛПС в клеточных пробах – 1 мкг/мл.

отношение ЛПС-индуцированной продукции TNF α (или АФК) клетками к контролю и отношение продукции TNF α в присутствии Hsp70 (или GYY4137 и STS) и ЛПС (обозначено как коэффициент эффективности K_3) к контрольному значению. Так, например, отношение продукции TNF α для ЛПС составило 11.4 (57/5), а для STS – 3.1 соответственно. В случае Hsp70 и GYY4137 величины K_3 составят 2.3 и 3.5 соответственно.

Ингибиторы эндоцитоза снижают связывание Hsp70-Alexa 555 с клетками THP-1

Показано, что все использованные нами ингибиторы эндоцитоза снижали связывание Hsp70-Alexa 555 с макрофагами по сравнению с контрольными клетками. Наиболее эффективно связывание снижали ингибиторы динасор и MB CD (рис. 2, MB CD и Dyn) по сравнению с контрольными клетками (рис. 2, КС), ~35%.

Влияние Hsp70, GYY4137 и STS на ЛПС-индуцированную активацию клеток THP-1 в присутствии ингибиторов эндоцитоза

Изучение действия ингибиторов эндоцитоза показало, что все примененные ингибиторы уменьшали продукцию АФК и TNF α клетками THP-1, а также и ЛПС-индуцированную продукцию АФК и TNF α (рис. 3 и 4, сравнение столби-

ков 2 с ингибиторами со столбиком 2 с ЛПС). Максимальное снижение продукции АФК вызывали MB CD и динасор. Амилорид, нокодазол и филиппин ингибировали продукцию АФК в меньшей степени. MB CD, динасор и амилорид несколько снижали продукцию АФК для Hsp70, GYY4137 и STS по сравнению с действием этих соединений без ингибиторов. В присутствии ингибиторов величины K_3 для Hsp70, GYY4137 и STS приближаются к единице.

Ингибиторы эндоцитоза более значимо влияли на продукцию TNF α клетками, чем на продукцию АФК (рис. 4). Так, в присутствии всех ингибиторов ЛПС-индуцированная продукция TNF α снижается более чем в 2 раза (рис. 4, столбики 2 с ингибиторами по сравнению со столбиком 2, КС). В присутствии ингибиторов во всех клеточных пробах величина K_3 находится в интервале ~1.3–1.5. Ингибиторы MB CD, динасор, амилорид и филиппин снижали продукцию TNF α в клеточных пробах с Hsp70, GYY4137 и STS по сравнению с действием этих соединений без ингибиторов (рис. 4, 1–5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

TLR4 активируется ЛПС с участием LBP (LPS binding protein) и CD14 и последовательно запускает два сигнальных каскада. Первый каскад с участием адапторных белков TIRAP и MyD88 ин-

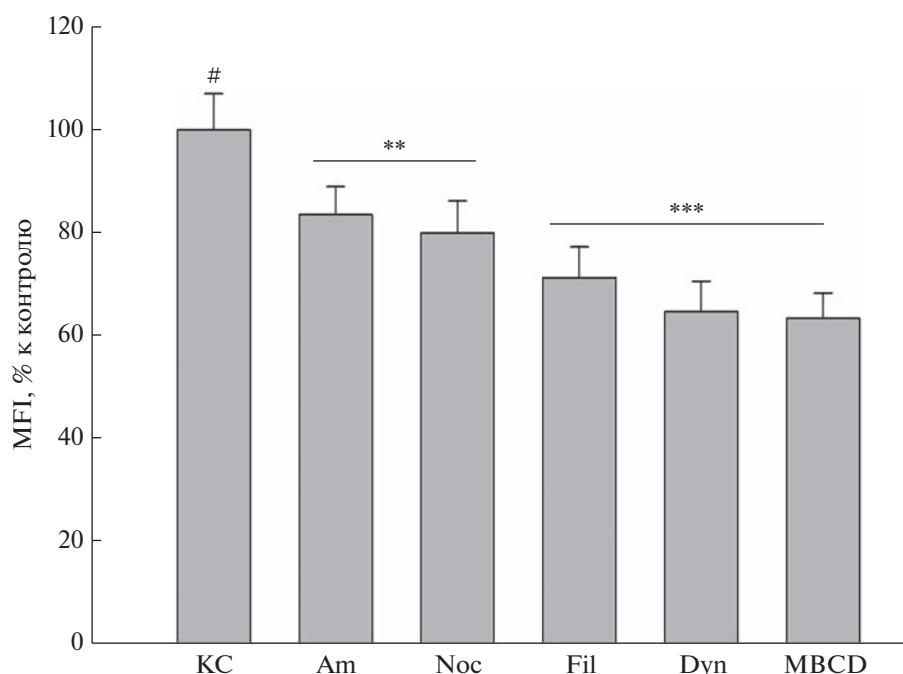


Рис. 2. Действие ингибиторов эндоцитоза на связывание Hsp70-Alexa 555 с клетками THP-1. MFI — медианная интенсивность флуоресценции. KC — культуральная среда; Am — 100 мкМ амилорид; Noc — 1 мкМ нокадазол; Fil — 1 мкМ филиппин; Dyn — 40 мкМ динасор; MBCD — 2 мМ метил-β-циклодекстрин. Ингибиторы добавляли к клеткам за 30 мин до Hsp70-Alexa 555. За 100% принята MFI клеток в культуральной среде, все остальные значения представлены в процентах от указанного значения. Общее время культивирования клеток — 24 ч. $N = 6$, $*p < 0.01$, $**p < 0.005$ по сравнению с KC.

дуцируется в плазматической мембране, тогда как второй каскад активируется присоединением адапторных белков TRAM и TRIF к удвоенному комплексу (TLR4-MD2) в ранних эндосомах после эндоцитоза рецептора TLR4 [28]. Мембранная форма CD14 заякорена в липидных микродоменах клеточной мембраны рядом с молекулами TLR4 [29].

Одним из первых ответов клетки на провоспалительное действие ЛПС является индукция синтеза АФК с последующим синтезом TNFα и ряда других провоспалительных цитокинов [30]. Основным источником АФК в макрофагах — NADPH-оксидаза [31], механизм активации которой с участием Toll-подобных рецепторов (TLR) остается недостаточно изученным. Однако известно, что NADPH-оксидаза, по крайней мере частично, включает сигнальные пути с участием различных протеинкиназ [31, 32].

Исследование кинетики защитного действия Hsp70 и доноров H₂S показало, что доноры сероводорода более значимо снижают активацию клеток при действии ЛПС, чем Hsp70 (рис. 1б). При этом и Hsp70, и доноры H₂S в отсутствие ЛПС увеличивали продукцию TNFα клетками по сравнению с контролем (рис. 1а, столбики 2). Максимальной активацией обладал белок Hsp70

(17 пг/мл), минимальной — STS (6.5 пг/мл). Меньшая эффективность защитного действия Hsp70 (по сравнению с STS), вероятно, связана с его небольшим провоспалительным действием. Некоторое увеличение продукции TNFα клетками при действии GYY4137 (9.4 пг/мл) может быть обусловлено тем, что GYY4137 способен увеличивать экспрессию белков семейства Hsp70 [19].

Нами показано (рис. 3), что Hsp70 и доноры сероводорода значительно снижают продукцию АФК. Эти результаты подтверждаются и данными проведенного нами транскриптомного анализа, согласно которым ЛПС вызывает увеличение синтеза нескольких субъединиц NADPH-оксидазы: мембранной gp91 и двух цитоплазматических — p47phox и p67 phox [19]. При этом GYY4137 снижает уровень трех субъединиц в составе NADPH-оксидазного комплекса. В этом, по-видимому, состоит основной механизм защиты клеток от ЛПС-индуцируемой продукции АФК. При бактериальной инфекции NADPH-оксидаза участвует в механизмах гибели бактерий в составе фагосом. Анализ транскриптома показал [19], что ЛПС увеличивает уровень катепсина и Fcγ-рецептора. Этот рецептор вместе с фосфолипазой D и ARF6 может участвовать в активации NADPH-оксидазы [33]. В наших экспериментах экспрессия фосфолипазы D и ARF6 не изменялась под

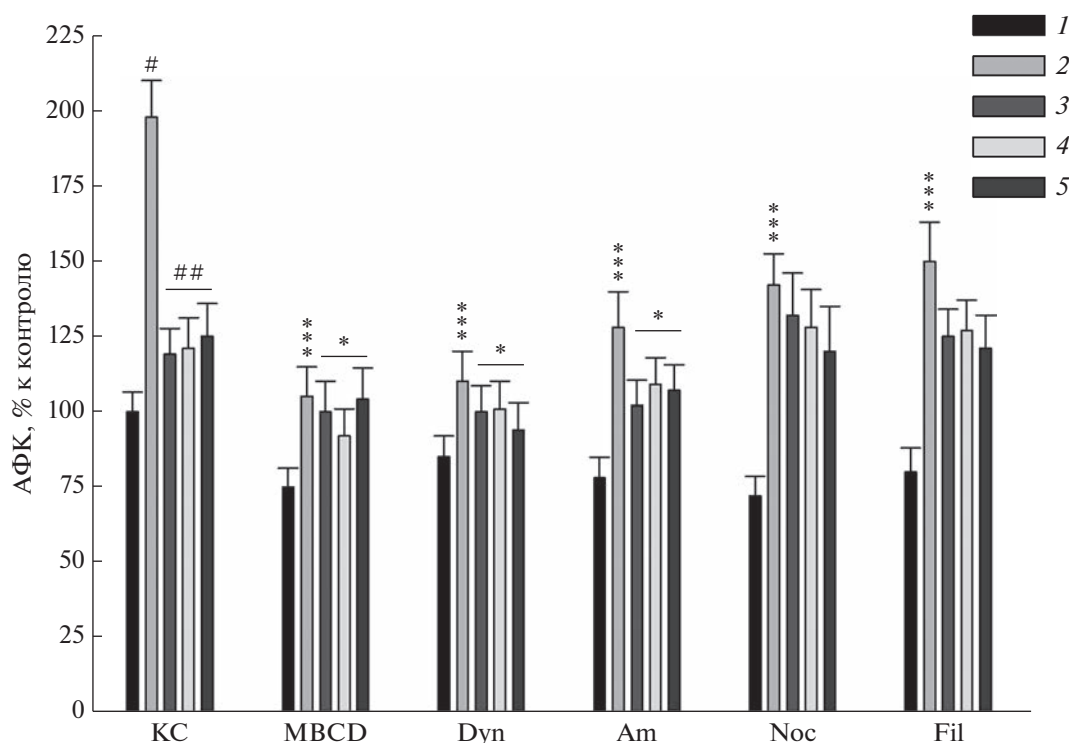


Рис. 3. Действие ингибиторов эндоцитоза на продукцию АФК клетками THP-1 в присутствии Hsp70 (2 мкг/мл), GYY4137 (200 мкМ), STS (2 мМ) и ЛПС (1 мкг/мл). KC – культуральная среда; MBCD – 2 мМ метил- β -циклодекстрин; Дун – 40 мкМ динасор; Ам – 100 мкМ амилорид; Нос – 1 мкМ нокодазол; Fil – 1 мкМ филиппин. 1 – клетки в отсутствие ЛПС, Hsp70, GYY4137 и STS; 2 – добавление ЛПС; 3 – добавление Hsp70; 4 – добавление GYY4137; 5 – добавление STS. Ингибиторы добавляли за 30 мин до Hsp70, GYY4137 и STS; с последними клетки инкубировали в течение 2 ч и добавляли ЛПС. За 100% принята продукция АФК клетками THP-1 в контроле (KC, столбик 1), все остальные значения представлены как процент от указанного значения. Общее время культивирования клеток – 24 ч. Сравнивали значения # с *** и ## с *.

действием ЛПС и GYY4137, при этом GYY4137 снижал уровень Fc α R, Fc γ R и катепсина, присутствующего в фаголизосомах. В фаголизосомах присутствует только катепсин. Ингибитор динасор снижал защиту клеток от ЛПС донорами H₂S и Hsp70, а также общую продукцию АФК и TNF α (рис. 3, 4, Dyn). Снижение продукции АФК и TNF α клетками при действии динасора может быть обусловлено взаимосвязью NADPH-оксидазы [34] и TLR4 [35] с клатрином клеточных мембран.

Другим механизмом снижения уровня АФК и TNF α в наших экспериментах (рис. 1, 3 и 4) может быть снижение уровня клеточных TLR4 в присутствии Hsp70 и доноров H₂S [19, 20].

ЛПС может не только активировать NADPH-оксидазу, но и переключать метаболизм макрофагов с окислительного фосфорилирования на гликолиз и пентозофосфатный путь. Ингибирование пентозофосфатного пути подавляет вызванное ЛПС повышение активности NOX2 и связано со значительным снижением экспрессии мРНК NADPH-оксидазы [36]. По данным транскриптомного анализа ЛПС и GYY4137 влияют на

экспрессию ферментов, вовлеченных в регуляцию гликолиза и глюконеогенеза. Установлено [19], что ЛПС увеличивает экспрессию мутаротазы галактозы, гексокиназы 1, фруктозо-1,6-бисфосфатазы и бисфосфоглицератмутаза. GYY4137 уменьшает экспрессию первых трех ферментов и не влияет на экспрессию бисфосфоглицератмутаза. Эти данные позволяют предположить, что под действием ЛПС метаболизм клеток THP-1 переключается с окислительного фосфорилирования на гликолиз. GYY4137 нивелирует эти процессы.

В наших экспериментах Hsp70 эффективно защищал клетки от ЛПС-индуцированной продукции АФК и TNF α (рис. 1, 3 и 4). Одним из механизмов этой защиты может быть непосредственное взаимодействие Hsp70 с NADPH-оксидазой с последующей деградацией этого фермента [37, 38]. Показано, что Hsp70, используя TLR4, может подавлять индукцию NOX3 [39].

Ключевую роль в активации макрофагов под действием ЛПС играет TLR4 [4]. Выполненный нами ранее транскриптомный анализ клеток THP-1 [19] показал, что ЛПС вызывает повыше-

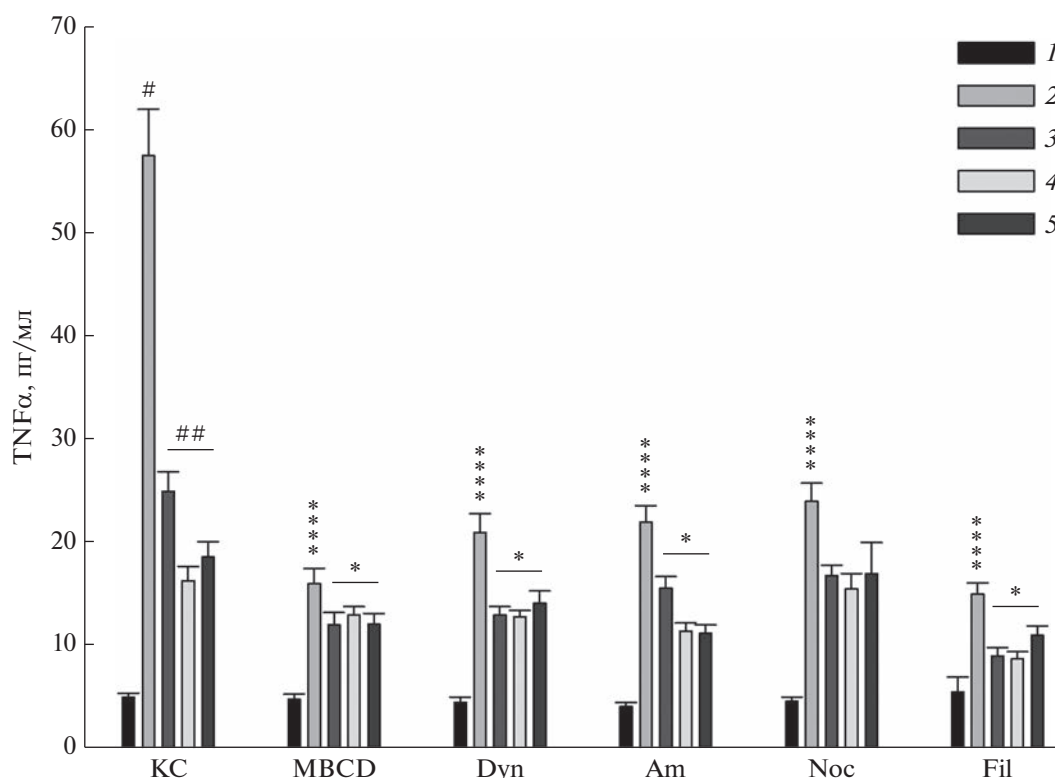


Рис. 4. Действие ингибиторов эндоцитоза на продукцию $\text{TNF}\alpha$ клетками THP-1. Обозначения как на рис. 3. Сравнивали значения # с **** и ## с *.

ние уровня экспрессии MyD88 и активирует сигнальный путь NF- κ B, важную роль в котором играет TRAF6 (TNF receptor associated factor 6). При действии ЛПС экспрессия TRAF6 в клетках THP-1 не изменяется, зато значительно снижается в присутствии GYY4137 [19]. ЛПС вызывает также увеличение экспрессии TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) и адапторной киназы RIP1 (receptor-interacting protein 1), связанной с регуляцией сигнальных путей с участием MAP-киназ, а также с регуляцией программируемой клеточной гибели [40]. Согласно данным транскриптомного анализа [19], в присутствии ЛПС значительно возрастает экспрессия хемокинов и провоспалительных цитокинов (INF α , IL-1 β , IL-6, IL-8) [19, 20, 22].

Экзогенный Hsp70 взаимодействует с клетками-мишенями благодаря ряду клеточных рецепторов, основными из которых являются TLR4 и TLR2, а также LOX-1, SREC-1 и CLEVER-1 (группа Scavenger receptors, SR), а также CD40 (семейство рецепторов TNF), CD91 (рецептор липопротеинов низкой плотности) и CCR5 (рецептор хемокинов) [41]. Кроме того, рекомбинантный Hsp70 может проникать в клетки, взаимодействуя с липидами клеточных мембран [42]. Связываясь с рецепторами, Hsp70 проникает в клетки при интернализации рецепторов. Показа-

но, что Hsp70 может поступать в клетки и с помощью клатриннезависимого эндоцитоза [43]. ЛПС может поступать в клетки путем рецепторзависимого и клатринзависимого эндоцитоза [44, 45], а также с использованием белков LBP, HMGB1 (high-mobility group protein B1) и RAGE (Receptor of advanced glycation end products) [4].

Изучение влияния ингибиторов эндоцитоза показало, что наиболее эффективным ингибитором эндоцитоза Hsp70-Alexa 555 был MBCD. Способность других ингибиторов снижать эндоцитоз Hsp70-Alexa 555 изменялась в следующем порядке — амилорид < нокодазол < филиппин < < динасор < MBCD (рис. 2). С этим связано значительное ингибирование продукции АФК и $\text{TNF}\alpha$ клетками в присутствии ингибитора липидных микромонов — MBCD (рис. 3 и 4). Следует отметить, что MBCD не полностью подавляет продукцию АФК и $\text{TNF}\alpha$ в присутствии ЛПС и Hsp70, что обусловлено, по-видимому, проникновением ЛПС и Hsp70 в клетку путями, не связанными с рецепторами. Кроме того, ЛПС-индуцированная активация TLR4 усиливает синтез жирных кислот, которые превращаются в сфинголипиды, входящие в состав липидных микромонов [46].

Транскриптомный анализ влияния ЛПС и GYY4137 на сигнальные пути, регулирующие эн-

доцитоз, показал, что эти соединения действуют как на клатринзависимый, так и на клатриннезависимый эндоцитоз. ЛПС увеличивает уровень MHC1, END1 (принимает участие в рециркуляции рецепторов [47]), SHMP5, MVB12, SWIP, SNX5, CPML и уменьшает уровень Ras, рецепторов TGF β и др. GYY4137 несколько увеличивает уровень TGF β R и Smad (2/3) и снижает уровень cPML. Установлено, что образование комплекса ЛПС-TLR4 индуцирует инактивацию сигналов от рецептора TGF β R (TGF β R–Smad (2/3) – факторы транскрипции). Эффективность передачи сигнала от TGF β R к Smad (2/3) возрастает при присоединении к TGF β R адапторных белков cPML и SARA [48]. Сигнальный путь от рецептора TGF β может активироваться окислительным стрессом, что в дальнейшем приводит к активации сигнальных путей с участием p38 MAPK. Показано, что H₂S может эффективно ингибировать сигнальные пути NF- κ B, TGF β и IL-4/STAT6, а также снижать продукцию АФК посредством подавления NOX2/4 [49].

ЛПС уменьшает уровень GPCR и β -аррестина, в то время как GYY4137 повышает их уровень. Также нами установлено, что ЛПС увеличивает уровень кавеолина и тирозинкиназы Src, которые играют важную роль в путях клатриннезависимого эндоцитоза, а GYY4137 снижает уровень кавеолина и тирозинкиназы Src [19]. Ингибитор кавеолинзависимого эндоцитоза филиппин практически отменял защиту клеток донорами H₂S и Hsp70 от ЛПС-индуцированной продукции АФК. При этом филиппин почти на 30% снижал образование АФК, индуцированное ЛПС. Интересно, что продукцию TNF α (связанную с ЛПС) филиппин уменьшал почти в 6 раз (рис. 4, Fil). Кавеолы также связаны сигнальными путями с MAP-киназами, Akt, малыми GTPазами Ras и др. Все эти сигнальные пути в определенной степени связаны с активирующим действием ЛПС. В наших экспериментах филиппин – ингибитор кавеолинзависимого эндоцитоза – снижал защитное действие Hsp70 и GYY4137, нарушая структуру кавеол и воздействуя на многообразие внутриклеточных сигнальных путей, связанных с кавеолинзависимым эндоцитозом [50].

Ингибитор макропиноцитоза амилорид уменьшает и активацию клеток ЛПС, и защитное действие Hsp70 и доноров сероводорода (рис. 3, Am). Важную роль в макропиноцитозе играет NADPH-оксидаза, ингибирование которой подавляет макропиноцитоз, а также Na⁺/H⁺-обменник, который участвует в регуляции уровня актина. Амилорид воздействует на сигнальные пути NF- κ B и снижает продукцию TNF α клетками, что коррелирует с данными [51].

Ингибитор тубулинзависимого эндоцитоза – нокодазол, снижал ЛПС-индуцированную про-

дукцию АФК (~ на 20%) и TNF α (~ в 2.5 раза). При этом ингибитор значительно уменьшал защитное действие Hsp70 и доноров сероводорода (рис. 3 и 4, Noc), как и в [52].

Изучение влияния ингибиторов эндоцитоза на продукцию АФК и TNF α клетками ТНР-1 в присутствии ЛПС, Hsp70 и доноров сероводорода показало, что все эти ингибиторы снижают продукцию АФК и TNF α клетками. Все ингибиторы уменьшают продукцию TNF α клетками в присутствии ЛПС, Hsp70 и доноров сероводорода. MBCD, динасор и амилорид снижают продукцию АФК в присутствии ЛПС, Hsp70 и доноров сероводорода.

Таким образом, Hsp70 и доноры сероводорода снижают воспалительные процессы в клетках, активированные ЛПС. Hsp70 и доноры H₂S различаются кинетикой защитного действия, при этом более эффективными оказались доноры сероводорода. Изучена роль ингибиторов эндоцитоза в механизмах защиты клеток донорами H₂S и Hsp70 от действия ЛПС. Установлено, что предварительная обработка GYY4137 клеток, подвергшихся воздействию ЛПС, повышает опосредованную ЛПС индукцию провоспалительных генов и снижает экспрессию генов таких путей внутриклеточной сигнализации, как эндоцитоз, фагоцитоз, гликолиз, сигнальный путь NF- κ B, сигнальные пути с участием рецепторов TNF α , TLR4, сигнальные пути тирозинкиназ (PI-3K, MAPK, Src и др.).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00167 для Д.Г.).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hersoug L.-G., Möller P., Loft S. (2016) Gut microbiota-derived lipopolysaccharide uptake and trafficking to adipose tissue: implications for inflammation and obesity. *Obes. Rev.* **17**(4), 297–312.
2. Fuke N., Nagata N., Suganuma H., Ota T. (2019) Regulation of gut microbiota and metabolic endotoxemia with dietary factors. *Nutrients.* **11**(10), 2277.
3. Orecchioni M., Ghosheh Y., Pramod A.B., Ley K. (2019) Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages. *Front. Immunol.* **10**, 1084.
4. Page M.J., Kell D.B., Pretorius E. (2022) The role of lipopolysaccharide-induced cell signalling in chronic inflammation. *Chronic Stress* (Thousand Oaks). **8**, 6, 24705470221076390. <https://doi.org/10.1177/24705470221076390>

5. Mohammad S., Thiernemann C. (2021) Role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions. *Front. Immunol.* **11**, 594150.
6. Evgen'ev M.B., Garbuz D.G., Zatsepina O.G. (2014) Heat shock proteins and whole body adaptation to extreme environments. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer.
7. Hu C., Yang J., Qi Z., Wu H., Wang B., Zou F., Mei H., Liu J., Wang W., Liu Q. (2022) Heat shock proteins: biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm.* **3**(3), e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
8. Aneja R., Odoms K., Dunsmore K., Shanley T.P., Wong H.R. (2006) Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J. Immunol.* **177**, 7184–7192.
9. Ghosh A.K., Sinha D., Mukherjee S., Biswas R., Biswas T. (2015) LPS stimulates and Hsp70 down-regulates TLR4 to orchestrate differential cytokine response of culture-differentiated innate memory CD8⁺ T cells. *Cytokine.* **73**, 44–52.
10. Kustanova G.A., Murashev A.N., Karpov V.L., Margulis B.A., Guzhova I.V., Prokhorenko I.R., Grachev S.V., Evgen'ev M.B. (2006) Exogenous heat shock protein 70 mediates sepsis manifestations and decreases the mortality rate in rats. *Cell Stress Chaperones.* **11**, 276–286.
11. Rozhkova E., Yurinskaya M., Zatsepina O., Garbuz D., Surkov S., Murashev A., Ostrov V., Margulis B., Evgen'ev M., Vinokurov M. (2010) Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. *Ann. NY Acad. Sci.* **1197**, 94–107.
12. Yurinskaya M., Zatsepina O.G., Vinokurov M.G., Bobkova N.V., Garbuz D.G., Morozov A.V., Kulikova D.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Funikov S.Y., Evgen'ev M.B. (2015) The fate of exogenous human HSP70 introduced into animal cells by different means. *Curr. Drug Deliv.* **12**(5), 524–532.
13. Afrazi A., Sodhi C.P., Good M., Jia H., Siggers R., Yazji I., Ma C., Neal M.D., Prindle T., Grant Z.S., Branca M., Ozolek J., Eugene Chang E., Hackam D.J. (2012) Intracellular heat shock protein-70 negatively regulates TLR4 signaling in the newborn intestinal epithelium. *J. Immunol.* **188**, 4543–4557.
14. Kimura H. (2014) Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules.* **19**, 16146–16157.
15. Dilek N., Papapetropoulos A., Toliver-Kinsky T., Szabo C. (2020) Hydrogen sulfide: an endogenous regulator of the immune system. *Pharmacol. Res.* **161**, 105119.
16. Xiao Q., Ying J., Xiang L., Zhang C. (2018) The biological effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine.* **97**, e13065.
17. Khattak S., Rauf M.A., Khan N.H., Zhang Q.Q., Chen H.J., Muhammad P., Ansari M.A., Alomary M.N., Jahangir M., Zhang C.Y., Ji X.Y., Wu D.D. (2022) Hydrogen sulfide biology and its role in cancer. *Molecules.* **27**(11), 3389. <https://doi.org/10.3390/molecules27113389>
18. Zhu C., Liu Q., Li X., Wei R., Ge T., Zheng X., Li B., Liu K., Cui R. (2022) Hydrogen sulfide: a new therapeutic target in vascular diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **13**, 934231. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.934231>
19. Yurinskaya M.M., Krasnov G.S., Kulikova D.A., Zatsepina O.G., Vinokurov M.G., Chuvakova L.N., Rezvykh A.P., Funikov S.Y., Morozov A.V., Evgen'ev M.B. (2020) H₂S counteracts proinflammatory effects of LPS through modulation of multiple pathways in human cells. *Inflamm. Res.* **69**(5), 481–495.
20. Onikienko S., Vinokurov M., Yurinskaya M., Zemlyanov A., Abkin S., Shaykhutdinova E., Palikov V., Ivanov A., Smirnova O., Fedyakina I., Bychkova N., Zatsepina O., Garbuz D., Evgen'ev M. (2022) The effects of H₂S and recombinant human Hsp70 on inflammation induced by SARS and other agents *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicines.* **10**(9), 2155. <https://doi.org/10.3390/biomedicines>
21. Du Y., Liu X.H., Zhu H.C., Wang L., Wang Z.S., Ning J.Z., Xiao C.C. (2019) Hydrogen sulfide treatment protects against renal ischemia-reperfusion injury via induction of heat shock proteins in rats. *Iran J. Basic Med. Sci.* **22**(1), 99–105.
22. Юринская М.М., Гарбуз Д.Г., Афанасьев В.Н., Евгеньев М.Б., Винокуров М.Г. (2020) Действие донора сероводорода GYY4137 и белка Hsp70 на активацию клеток SH-SY5Y липополисахаридами. *Молекуляр. биология.* **54**(6), 1018–1028.
23. Gurskiy Y.G., Garbuz D.G., Soshnikova N.V., Krasnov A.N., Deikin A., Lazarev V.F., Sverchinskyi D., Margulis B.A., Zatsepina O.G., Karpov V.L., Belzhelarskaya S.N., Feoktistova E., Georgieva S.G., Evgen'ev M.B. (2016) The development of modified human Hsp70 (HSPA1A) and its production in the milk of transgenic mice. *Cell Stress Chaperones.* **21**(6), 1055–1064.
24. Yurinskaya M., Kochetkova O., Shabarchina L., Antonova O., Suslikov A., Evgen'ev M., Vinokurov M. (2017) Encapsulated Hsp70 decreases endotoxin-induced production of ROS and TNF α in human phagocytes. *Cell Stress Chaperones.* **22**(1), 163–171.
25. Pfister H., Hennet T., Jungi T. (1992) Lipopolysaccharide synergizes with tumour necrosis factor- α in cytotoxicity assays. *Immunology.* **77**(3), 473–476.
26. Lin V.S., Lippert A.R., Chang C.J. (2013) Cell-trappable fluorescent probes for endogenous hydrogen sulfide signaling and imaging H₂O₂-dependent H₂S production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**(18), 7131–7135.
27. Giraldo E., Martin-Cordero L., Garcia J., Gerhmann M., Multhoff G., Ortega E. (2010) Exercise-induced extracellular 72 kDa heat shock protein (Hsp72) stimulates neutrophil phagocytic and fungicidal capacities via TLR-2. *Eur. J. Appl. Physiol.* **108**(2), 217–225.
28. Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. (2021) TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**(4), 1233–1261.
29. Пłyциенникowska A., Hromada-Judycka A., Borzęcka K., Kwiatkowska K. (2015) Co-operation of TLR4 and

- raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 557–581.
30. Pérez S., Rius-Pérez S. (2022) Macrophage polarization and reprogramming in acute inflammation: a redox perspective. *Antioxidants* (Basel). **11**(7), 1394.
 31. Nocella C., D'Amico A., Cammisotto V., Bartimoccia S., Castellani V., Loffredo L., Marini L., Ferrara G., Testa M., Motta G., Benazzi B., Zara F., Frati G., Sciarretta S., Pignatelli P., Violi F., Carnevale R., Group S. (2023) Structure, activation, and regulation of Nox2: at the crossroad between the innate immunity and oxidative stress-mediated pathologies. *Antioxidants* (Basel). **12**(2), 429.
 32. Trevelin S.C., Shah A.M., Lombardi G. (2020) Beyond bacterial killing: NADPH oxidase 2 is an immunomodulator. *Immunol. Lett.* **221**, 39–48.
 33. Van Acker T., Tavernier J., Peelman F. (2019) The small GTPase Arf6: an overview of its mechanisms of action and of its role in host-pathogen interactions and innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(9), 2209.
 34. Ejlerskov P., Christensen D.P., Beyaie D., Burritt J.B., Paclet M., Grolach A., van Deurs B., Vilhardt F. (2012) NADPH oxidase is internalized by clathrin-coated pits and localizes to a Rab27A/B GTPase-regulated secretory compartment in activated macrophages. *J. Biol. Chem.* **287**(7), 4835–4852.
 35. Pérez-Rodríguez M.J., Ibarra-Sánchez A., Román-Figueroa A., Pérez-Severiano F., González-Espinosa C. (2020) Mutant Huntingtin affects toll-like receptor 4 intracellular trafficking and cytokine production in mast cells. *J. Neuroinflammation.* **17**(1), 95.
 36. Erlich J.R., To E.E., Luong R., Liong F., Liong S., Osceghale O., Miles M.A., Bozinovski S., Brooks R.D., Vlahos R., Chan S., O'Leary J.J., Brooks D.A., Selimidis S. (2022) Glycolysis and the pentose phosphate pathway promote LPS-induced Nox2 oxidase- and IFN- β -dependent inflammation in macrophages. *Antioxidants* (Basel). **11**(8), 1488.
 37. Chen F., Yu Y., Qian J., Wang Y., Cheng B., Dimitropoulou C., Patel V., Chadli A., Rudic R.D., Stepp D.W., Catravas J.D., Fulton D.J. (2012) Opposing actions of heat shock protein 90 and 70 regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase stability and reactive oxygen species production. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2989–2999.
 38. Hsieh L.T., Frey H., Nastase M.V., Tredup C., Hoffmann A., Poluzzi C., Zeng-Brouwers J., Manon-Jensen T., Schröder K., Brandes R.P., Iozzo R.V., Schaefer L. (2016) Bimodal role of NADPH oxidases in the regulation of biglycan-triggered IL-1 β synthesis. *Matrix Biol.* **49**, 61–81.
 39. Zhang Y., Shan P., Srivastava A., Jiang G., Zhang X., Lee P.J. (2016) An endothelial Hsp70-TLR4 axis limits Nox3 expression and protects against oxidant injury in lungs. *Antioxid. Redox Signal.* **24**(17), 991–1012.
 40. Webster J.D., Vucic D. (2020) The balance of TNF mediated pathways regulates inflammatory cell death signaling in healthy and diseased tissues. *Front. Cell. Dev. Biol.* **21**, 365.
 41. Гарбуз Д.Г., Зацепина О.Г., Евгеньев М.Б. (2019) Основной стрессовый белок человека (Hsp70) как фактор белкового гомеостаза и цитокин-подобный регулятор. *Молекуляр. биология.* **53**(2), 200–217.
 42. De Maio A., Hightower L. (2021) The interaction of heat shock proteins with cellular membranes: a historical perspective. *Cell Stress Chaperones.* **26**(5), 769–783.
 43. Nimmervoll B., Chtcheglova L.A., Juhasz K., Cremades N., Aprile F.A., Sonnleitner A., Hinterdorfer P., Vigh L., Preiner J., Balogi Z. (2015) Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of clathrin-independent endocytosis. *FEBS Lett.* **589**(19 Pt B), 2747–2753.
 44. Shim D.W., Heo K.H., Kim Y.K., Sim E.J., Kang T.B., Choi J.W., Sim D.W., Cheong S.H., Lee S.H., Bang J., Won H.S., Lee K.H. (2015) Anti-inflammatory action of an antimicrobial model peptide that suppresses the TRIF-dependent signaling pathway via inhibition of Toll-like receptor 4 endocytosis in lipopolysaccharide stimulated macrophages. *PLoS One.* **10**(5), e0126871.
 45. Józefowski S., Śrótek M. (2017) Lipid raft-dependent endocytosis negatively regulates responsiveness of J774 macrophage-like cells to LPS by down regulating the cell surface expression of LPS receptors. *Cell. Immunol.* **312**, 42–50.
 46. Olona A., Hateley C., Muralidharan S., Wenk M.R., Torta F., Behmoaras J. (2021) Sphingolipid metabolism during Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated macrophage activation. *Br. J. Pharmacol.* **178**(23), 4575–4587.
 47. Naslavsky N., Caplan S. (2020) Endocytic membrane trafficking in the control of centrosome function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **65**, 150–155.
 48. Gomart A., Vallée A., Lecarpentier Y. (2021) Necrotizing enterocolitis: LPS/TLR4-induced crosstalk between canonical TGF- β /Wnt/ β -catenin pathways and PPAR γ . *Front. Pediatr.* **9**, 713344. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.713344>
 49. Chen Y., Yuan S., Cao Y., Kong G., Jiang F., Li Y., Wang Q., Tang M., Zhang Q., Wang Q., Liu L. (2021) Gasotransmitters: potential therapeutic molecules of fibrotic diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, 3206982. <https://doi.org/10.1155/2021/3206982>
 50. Pathak C., Vaidya F.U., Waghela B.N., Jaiswara P.K., Gupta V.K., Kumar A., Rajendran B.K., Ranjan K. (2023) Insights of endocytosis signaling in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(3), 2971.
 51. Tang H., Chen H., Jia Y., Liu X., Han Z., Wang A., Liu Q., Li X., Feng X. (2017) Effect of inhibitors of endocytosis and NF- κ B signal pathway on folate-conjugated nanoparticle endocytosis by rat Kupffer cells. *Int. J. Nanomedicine.* **12**, 6937–6947.
 52. Li Z., Davis G.S., Mohr C., Nain M., Gems D. (1996) Inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor- α production by colchicine and other microtubule disrupting drugs. *Immunobiology.* **195**(4–5), 624–639.

Protective Action of HSP70 and Hydrogen Sulfide Donors in THP-1 Macrophages at Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Modulating Endocytosis

M. M. Yurinskaya¹, D. G. Garbuz², M. B. Evgen'ev^{1, 2, *} and M. G. Vinokurov¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

²*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: misha672011@yahoo.com*

Hsp70 and hydrogen sulfide donors reduce inflammatory processes in human and animal cells. The biological action mediated by Hsp70 and H₂S donors (GYY4137 and sodium thiosulfate) depends on their protection kinetics from cell activation by lipopolysaccharides. However, the molecular mechanisms of action of Hsp70 and H₂S are not well understood. We studied the effect of human recombinant Hsp70 and H₂S donors on the formation of reactive oxygen species and tumor necrosis factor- α induced in human cells (THP-1) by lipopolysaccharides. Transcriptomic changes occurring in these cells after LPS administration in combination with GYY4137 pretreatment were investigated. The results obtained showed that Hsp70 and hydrogen sulfide donors reduce inflammatory processes in cells activated by the action of LPS. Hsp70 and H₂S donors differed in the kinetics of the protective action, while hydrogen sulfide donors turned out to be more effective. The role of endocytosis in the mechanisms of protection of cells by H₂S and Hsp70 donors from the action of LPS was studied. It has been found that GYY4137 pretreatment of LPS-exposed cells reduces the LPS-induced induction of various pro-inflammatory genes and affects the expression of genes of various intracellular signaling pathways.

Keywords: GYY4137, STS, Hsp70, LPS, THP-1, TNF α , ROS

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

УДК 576.32/.36

РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В НАРУШЕНИИ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА

© 2023 г. Д. А. Чернявский^а, И. И. Галкин^б, А. Н. Павлюченкова^{а, б},
А. В. Фёдоров^с, М. А. Челомбитко^{б, д, *}

^аФакультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^бНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

^сБиологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^дРоссийский геронтологический научно-клинический центр, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения России, Москва, 129226 Россия

*e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 26.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Воспалительные заболевания кишечника широко распространены в индустриально развитых странах, где ими страдает каждый двадцатый житель. Важную роль в развитии воспалительных заболеваний кишечника играет нарушение барьерной функции кишечного эпителия. Проницаемость эпителия кишечника зависит в первую очередь от состояния контактных комплексов между клетками, а также от способности эпителия к самообновлению. Митохондрии выполняют энергетическую функцию и, кроме того, участвуют в регуляции других процессов, протекающих в клетке. Данные последних лет указывают на потенциальную роль этих органелл в регуляции барьерной функции кишечного эпителия и в развитии воспалительных заболеваний кишечника. Дисфункция митохондрий может быть одной из причин нарушения структуры плотных межклеточных контактов и цитоскелета клеток кишечного эпителия, а также снижения способности эпителиальной выстилки к самообновлению. Все это приводит к снижению барьерной функции кишечного эпителия и развитию воспалительных заболеваний кишечника. Однако механизмы этих процессов остаются невыясненными и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: кишечный эпителий, митохондрии, воспалительные заболевания кишечника, активные формы кислорода, антиоксиданты

DOI: 10.31857/S0026898423060058, **EDN:** QZKAЕА

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) широко распространены в индустриально развитых странах [1]. К ВЗК относят болезни неизвестной этиологии, в том числе язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК). Они характеризу-

ются такими клиническими признаками, как сильная боль в животе, повышение температуры тела, тошнота и рвота, диарея, ректальное кровотечение, анемия и значительная потеря веса. В настоящее время лечение этих заболеваний сугубо симптоматическое: с использованием проти-

Сокращения. AMPK (AMP-activated protein kinase) – AMP-активируемая киназа; DNMI1 (dynamin-1-like protein) – динаминподобный белок-1; IL (interleukin) – интерлейкин; INF (interferon) – интерферон; MitoQ (mitoquinone) – 10-(6'-убихинонил)-децилтрифенилфосфоний; MitoTEMPO (mitochondria-targeted [2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino)-2-oxoethyl]triphenylphosphonium chloride – [2-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил-4-иламино)-2-оксоэтил]трифенилфосфоний хлорид; MPC (mitochondrial pyruvate carrier) – митохондриальный транспортер пирувата; OPA1 (optic atrophy 1) – митохондриальная динаминподобная GTPаза; OXPHOS (oxidative phosphorylation) – окислительное фосфорилирование; PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1- α) – коактиватор-1 α рецептора- γ , активируемого пролифераторами пероксисом; SkQ1 (Skulachev's quinone) – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний; TL1A (tumor necrosis factor family member TNF-like factor 1A) – TNF-подобный лиганд-1A; TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли; ZO (zonula occludens) – белок плотных контактов; АФА – активные формы азота; АФК – активные формы кислорода; БК – болезнь Крона; ВЗК – воспалительные заболевания кишечника; ДСН – декстрансульфат натрия; мТАФК – митохондриальные активные формы кислорода; ЭТЦ – электронтранспортная цепь; ЯК – язвенный колит.

вовоспалительных препаратов и диетического питания, — а в особо тяжелых случаях хирургическое — с целью удаления пораженных участков кишечника [2].

В основе патогенеза ВЗК выделяют несколько основных факторов: генетическая предрасположенность, дисрегуляция иммунной системы, нарушение барьерной функции кишечного эпителия, дисбаланс микрофлоры кишечника, а также факторы среды, включая питание и лекарственные препараты [3, 4].

Считается, что значимую роль в развитии ВЗК играет нарушение барьерной функции кишечного эпителия [5–7]. Эпителиальный барьер кишечника состоит из слоя слизи, гликокаликса и собственно эпителиальной выстилки [8]. Кишечный эпителий выполняет две основные функции: абсорбцию нутриентов и барьерную, — роль которых заключается в предотвращении попадания патогенов во внутреннюю среду организма [6]. Считается, что барьерная функция кишечного эпителия зависит прежде всего от состояния контактных комплексов между собственно эпителиальными клетками [9, 10], а также от продукции слизи бокаловидными клетками [11], секреции антибактериальных пептидов клетками Панета [11] и от способности эпителия к самообновлению [12].

Основную роль в регуляции проницаемости кишечного эпителия играют плотные контакты. Плотные контакты представляют собой белковые комплексы, состоящие из нескольких типов трансмембранных белков (окклюдина, белки из семейства клаудинов, Marvel D3, адгезионные молекулы семейства JAM и трицеллюлин), которые с помощью белков плотных контактов: ZO-1, ZO-2, ZO-3, цингулина и симплекина — соединяются с примембранным актомиозиновым кольцом [9]. Основными мембранными белками, определяющими проницаемость плотных контактов, являются клаудины [13]. Нарушение структуры межклеточных контактов вызывает значительное увеличение парацеллюлярной проницаемости, что может приводить к проникновению патогенов в стенку кишки через образовавшиеся просветы между двумя соседними клетками эпителия [14]. Известно, что проницаемость плотных контактов может регулироваться посредством цитокинов и факторов роста [9]. Так, провоспалительные цитокины интерферон- γ (IFN- γ) и фактор некроза опухоли (TNF) приводят к реорганизации множества белков плотных контактов, включая ZO-1, окклюдин, клаудины-1 и -4, и, таким образом, к повышению проницаемости. Трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), напротив, поддерживает целостность плотных контактов, способствуя восстановлению эпителия при повреждении [15, 16]. Из этих данных следует, что воспалительные процессы в кишечнике могут индуцировать

цитокинзависимую разборку межклеточных контактов в кишечном эпителии, снижая тем самым его барьерную функцию и усиливая воспаление.

При ВЗК структура плотных контактов нарушается, что приводит к повышению парацеллюлярной проницаемости эпителия кишки. Так, у больных ЯК снижена толщина зоны плотных контактов [17]. При ЯК показано повышение экспрессии порообразующего клаудина-2, а также клаудинов-1, -12 и -18. Кроме того, у таких пациентов снижается экспрессия клаудинов-4, -5, -7, -8, участвующих в уменьшении парацеллюлярной проницаемости, ZO-1 и связывающегося с ним окклюдина, что ведет к нарушению процессов, играющих ключевую роль в поддержании целостности плотных контактов [8, 18, 19]. Изменения в структуре плотных контактов наблюдаются и при БК. Так, дезорганизация плотных межклеточных контактов обнаружена в терминальном отделе подвздошной кишки пациентов с БК [20]. В образцах из сигмовидной кишки пациентов с БК в острой фазе экспрессия клаудинов-3, -5 и -8 была снижена, тогда как экспрессия клаудина-2 повышена [21, 22].

Нарушение барьерной функции может быть первопричиной развития ВЗК или следствием воспалительных процессов в стенке кишки. Это нарушение приводит к транслокации бактерий в слизистую и индукции или усилению уже существующего воспаления [4, 23]. Такая ситуация способствует формированию порочного круга. Предполагается, что при индукции ВЗК бактериальные антигены избыточно стимулируют иммунную систему собственной пластинки слизистой. Это приводит к развитию иммунной реакции, при которой выделяются провоспалительные цитокины, такие как TNF-подобный лиганд-1A (TL1A; tumor necrosis factor-like cytokine 1A), TNF, интерлейкин-1 (IL-1) и INF- γ , способные повышать проницаемость кишечного эпителия, в том числе и для антигенов, которые дополнительно стимулируют иммунную систему. Такой процесс приводит к хроническому воспалению, что характерно для пациентов с ВЗК [4, 23, 24].

С риском развития ВЗК связывают мутации в приблизительно 200 генах [25], часть из которых вовлечена в регуляцию иммунного ответа, а часть — в поддержание барьерной функции кишечного эпителия, что служит дополнительным подтверждением роли взаимодействия эпителия и иммунных клеток в патогенезе ВЗК.

Все больше литературных данных указывает на роль митохондриальной дисфункции в нарушении барьерной функции кишечного эпителия при ВЗК [26–30]. Митохондрии участвуют в регуляции многих метаболических и сигнальных путей, некоторые из которых играют критическую роль в поддержании барьерной функции кишеч-

ного эпителия [16]. В данном контексте к наиболее значимым относится энергетическая функция митохондрий, выраженная в продукции необходимого количества АТФ, а также способность митохондрий продуцировать активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА), выступающие в роли медиаторов множества сигнальных путей. Более того, нарушение способности митохондрий к самообновлению может приводить к накоплению дисфункциональных органелл.

В представленном обзоре рассмотрена роль всех вышеперечисленных функций митохондрий в нарушении барьерной функции кишечного эпителия при ВЗК.

МИТОХОНДРИИ И ДИСФУНКЦИЯ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ

В основе причин дисфункции кишечного эпителия при ВЗК часто лежит нарушение функциональной активности митохондрий, которое, в свою очередь, может быть следствием различных воздействий (инфекция, дисбиоз, воспаление, ишемия, хирургическое вмешательство) [31]. Как уже отмечалось ранее, появляется все больше свидетельств участия окислительного стресса [32] и митохондриальной дисфункции в нарушении барьерной функции кишечного эпителия и развитии ВЗК [26, 33]. Ультраструктурные изменения митохондрий, свидетельствующие о снижении их функциональной активности, выявляют в эпителиальных клетках кишечника больных ВЗК еще до изменения структуры плотных контактов, что свидетельствует о вовлеченности митохондриальных дисфункций в развитие данных заболеваний [34, 35].

Основная функция митохондрий состоит в образовании “энергетического сырья” клетки — АТФ. Кроме биоэнергетической функции, митохондрии принимают участие в синтезе нуклеотидов, жирных кислот, гема, а также продукции АФК и гомеостазе Ca^{2+} . Митохондрии также участвуют в различных внутриклеточных сигнальных путях, например в индукции программируемой клеточной гибели [36]. Митохондрии постоянно претерпевают динамические перестройки, которые необходимы как для обеспечения энергетических потребностей клетки, так и для их самообновления. Нормальный гомеостаз митохондрий поддерживается благодаря митохондриальным шаперонам, отделению митохондриальных везикул, митофагии и биогенезу. Контроль качества — особенно важный процесс для митохондрий, так как эти органеллы постоянно подвергаются повреждающим воздействиям, особенно при различных клеточных стрессах [37].

При ВЗК, в частности в клетках кишечного эпителия, наблюдается нарушение энергетиче-

ской функции митохондрий и их гомеостаза, а также развитие окислительного стресса. Далее мы рассмотрим подробнее роль этих процессов в патогенезе ВЗК.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ СТРЕСС ПРИ ВЗК

В ходе анализа, проведенного группой Nabetan [38], была выявлена дисфункция митохондрий в образцах ректальной биопсии пациентов с БК, а именно снижение экспрессии всех 13 генов субъединиц комплексов электронтранспортной цепи (ЭТЦ), кодируемых митохондриальной ДНК (мтДНК), наряду с нарушением митохондриально-дыхания и трансмембранного потенциала.

При исследовании мышей с индуцированным декстрансульфатом натрия (ДСН) колитом показано, что в слизистой оболочке толстой кишки экспериментальных животных уровень АТФ и активность ЭТЦ заметно снижены [39, 40]. Понижение уровня АТФ в слизистой оболочке кишечника показано как для пациентов с БК, у которых выявлены нарушения работы комплексов III и IV дыхательной цепи, так и для пациентов с ЯК, у которых снижена активность комплексов II, III и IV [41, 42], а в активной фазе заболеваний еще и комплекса I ЭТЦ [38]. Более того, обнаружена связь полиморфизма гена *MT-ND4*, кодирующего одну из субъединиц комплекса I ЭТЦ, с риском развития ЯК [43]. В исследовании, проведенном на клетках кишечного эпителия Сасо-2, показано, что ингибирование комплекса III ЭТЦ или АТФ-синтазы с помощью антимицина и олигомицина приводит к заметному нарушению распределения белка плотных контактов ZO-1, а ингибирование комплекса I ЭТЦ с помощью ротенона вызывает умеренные изменения в экспрессии ZO-1 [44]. Подобный эффект может быть опосредован действием митохондриальных АФК (мтАФК), поскольку известно, что антимицин и олигомицин способны индуцировать продукцию АФК [45, 46]. О влиянии мтАФК на структуру плотных контактов подробнее будет сказано в следующем разделе. Нарушения в экспрессии генов белков плотных контактов также обнаружены при снижении уровня АТФ в монослойных клетках Сасо-2. В частности, наблюдалось перераспределение клаудина-7 вдоль всей поверхности мембраны — от апикальной до базолатеральной сторон клеток, — что нехарактерно для нормальных клеток кишечного эпителия [47].

Основным источником энергии для клеток кишечного эпителия считается процесс митохондриального β -окисления жирных кислот, особенно короткоцепочечных (бутират, ацетат и пропионат), продуцируемых кишечной микрофлорой [48]. Дефицит β -окисления жирных кислот кишечным эпителием может играть критическую роль в патогенезе ВЗК, особенно ЯК. Так, приме-

нение фармакологического ингибитора β -окисления жирных кислот 2-бромоктаноата натрия приводит к развитию спонтанного колита у крыс [49]. Кроме того, мутации в гене *SLC22A5*, кодирующего OCTN2 — Na-зависимый транспортер L-карнитина, важного для β -окисления жирных кислот, — связывают с риском развития БК [48]. Важность процесса β -окисления жирных кислот в митохондриях в поддержании барьерной функции кишечного эпителия продемонстрирована на макаках, зараженных вирусом иммунодефицита обезьян (SIV). У таких животных нарушение проницаемости кишечного эпителия связано со снижением активности фактора PPAR α , участвующего в β -окислении жирных кислот. В клетках кишечного эпителия больных макак детектировали снижение числа митохондрий, а также изменение их морфологии на фрагментированный фенотип с плохо развитыми кристами. В кишечном эпителии здоровых животных митохондрии расположены на апикальном конце энтероцитов, рядом с зоной плотных контактов, что может отражать важную роль митохондрий в поддержании функциональной активности плотных контактов. Восстановление активности PPAR α приводило к нормализации барьера кишечного эпителия и частичному восстановлению морфологии и функции митохондрий, что подтверждалось также результатами анализа экспрессии митохондриальных генов и генов, вовлеченных в β -окисление жирных кислот [48].

Таким образом, на основании вышеизложенных данных можно сделать вывод, что как работа комплексов ЭТЦ, обеспечивающая окислительное фосфорилирование (OXPHOS), так и β -окисление жирных кислот, протекающие в митохондриях, необходимы для поддержания структуры плотных контактов клеток кишечного эпителия.

Стволовые клетки кишечного эпителия характеризуются высоким уровнем OXPHOS [50–52]. Достаточная продукция АТР митохондриями — критический фактор для пролиферации и дифференцировки стволовых клеток кишечного эпителия. Так, нокдаун генов комплексов ЭТЦ в стволовых клетках эпителия кишечника дрозофилы приводил к снижению их пролиферации и дифференцировки. Наиболее выраженный эффект наблюдали при ингибировании комплексов III и IV ЭТЦ; при этом ингибирование дифференцировки стволовых клеток связано с активностью транскрипционного фактора FOXO [53]. На экспериментальных моделях животных показано, что повышенная продукция АТР и активность OXPHOS в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта снижают выраженность колита, индуцированного ДСН или 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой, по сравнению с мышами с более низким уровнем активности комплексов, участвующих в OXPHOS, и пониженной

продукцией АТР. Повышение содержания АТР в клетке приводит к увеличению интенсивности NF- κ B-зависимой пролиферации энтероцитов, что способствует обновлению кишечного эпителия — ключевого процесса при восстановлении ткани после воздействия повреждающих стимулов [54]. Однако роль NF- κ B в регуляции проницаемости эпителиального барьера неоднозначна, так как этот транскрипционный фактор при избыточной активации соответствующего сигнального пути индуцирует синтез провоспалительных цитокинов. Стволовые клетки кишечного эпителия содержат большое количество митохондрий, но при этом экспрессия митохондриального транспортера пирувата (MPC) в них снижена. Потеря MPC или обработка органоидов, выращенных из стволовых клеток кишечного эпителия, ингибитором MPC приводили к ускоренной пролиферации стволовых клеток. Генетическая делеция MPC в стволовых клетках кишечного эпителия дрозофилы также приводила к повышению их пролиферативной активности, тогда как избыточная экспрессия MPC ее подавляла. Таким образом, ограничение транспорта пирувата в митохондрии необходимо для поддержания пролиферации стволовых клеток кишечного эпителия, а большое содержание в них митохондрий, по-видимому, связано с высоким уровнем окисления β -жирных кислот [55]. Эти данные свидетельствуют о том, что нарушение энергетической функции митохондрий стволовых клеток кишечного эпителия может снижать барьерную функцию кишечного эпителия за счет нарушения процессов самообновления.

Один из механизмов регуляции клеточного метаболизма в условиях снижения уровня АТР — активация АМР-активируемой киназы (АМРК). Эта киназа стимулируется в ответ на повышение уровня АМР при снижении количества АТР, после чего она способна влиять на регуляцию метаболизма, состояние цитоскелета, синтез белка и аутофагию. В кишечнике АМРК ингибирует АТР-зависимый перенос ионов, а также синтез белков [39]. Считается, что активация АМРК ведет к сборке плотных и адгезивных контактов, а также препятствует фосфорилированию легкой цепи миозина и сжатию актомиозинового кольца, тем самым уменьшая парацеллюлярную проницаемость кишечного эпителия. При увеличении внутриклеточной концентрации кальция и активации киназы CaMKK2 происходит фосфорилирование АМРК [56]. Защитный эффект АМРК продемонстрирован в нескольких моделях индуцированного колита у мышей и на клетках культуры Caco-2 [57, 58]. Кроме того, показано, что АМРК способствует дифференцировке клеток кишечного эпителия за счет индукции экспрессии транскрипционного фактора CDX2 [59]. Таким образом, в клетках кишечного эпителия АМРК участвует в

Таблица 1. Роль энергетической функции митохондрий в патогенезе ВЗК

Мишень	Воздействие/модель	Эффект	Ссылка
Компоненты ЭТЦ	Пациенты с ВЗК	Снижение экспрессии	[38]
Компоненты ЭТЦ	Нокдаун в клетках эпителия кишечника дрозофилы	Снижение пролиферации стволовых клеток кишечного эпителия	[53]
Компоненты ЭТЦ и АТФ-синтаза	Антимицин, олигомицин, ротенон, СССР ^a , пирицедин А	Перераспределение и изменение экспрессии ZO-1, перераспределение клаудина-7, увеличение проницаемости монослоя	[44, 47]
OXPHOS и АТФ	Конпластические мышцы с разным митохондриальным геномом	Снижение выраженности колита, повышение пролиферации энтероцитов	[54]
АТФ	ДНС-индуцированный колит в мышинной модели, пациенты с ВЗК	Снижение уровня	[38–43]
<i>MT-ND4</i>	Мутации	Ассоциация с риском развития ВЗК	[43]
β -окисление жирных кислот	2-бромоктаноат натрия	Развитие колита	[49]
<i>SLC22A5</i>	Мутации	Ассоциация с риском развития ВЗК	[48]
PPAR α	Макаки, зараженные SIV	Снижение активности	[44]
AMPK	Метформин (<i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>), 6-gingerol (<i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>), AICAR ^b (<i>in vitro</i>)	Снижение тяжести течения колита, увеличение экспрессии белков плотных контактов, снижение проницаемости, снижение продукции провоспалительных цитокинов	[57–59]

^a СССР (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) – карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон).

^b AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside) – 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1- β -D-рибофуранозид.

механизме обратной связи, тормозя процессы, требующие АТФ, и стабилизируя плотные контакты, препятствуя тем самым дальнейшему развитию дисфункции эпителиального барьера в ответ на энергетический стресс. Этот механизм – дополнительное подтверждение роли энергетической функции митохондрий в поддержании барьерной функции кишечного эпителия.

На основании этих данных можно заключить, что нарушение энергетической функции митохондрий в кишечном эпителии при ВЗК может приводить к нарушению структуры плотных контактов энтероцитов, снижению пролиферации и дифференцировки стволовых клеток кишечного эпителия, что играет критическое значение для выполнения барьерной функции. Экспериментальные данные, демонстрирующие роль энергетической функции митохондрий при ВЗК, суммированы в табл. 1.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ ВЗК

Основная часть АФК в митохондриях образуется в результате работы комплексов I и III ЭТЦ; при этом продукция мтАФК зависит от многих факторов: концентрации кислорода, интенсивности дыхания, концентрации Ca^{2+} , митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi\text{m}$). В митохондриях АФК образуются также в результате работы дегидрогеназ в матриксе, белка p66Shc

(изоформа белка SHC1 – Src homology 2 domain-containing transforming protein 1) в межмембранном пространстве, моноаминоксидазы во внешней мембране. В ЭТЦ митохондрий постоянно происходит утечка электронов, обычно в форме супероксида (O_2^-) или гидроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$). Однако в клетке существуют антиоксидантные защитные регуляторные механизмы. Обычно O_2^- нейтрализуется митохондриальной марганцевой супероксиддисмутазой (MnSOD). В результате этой реакции образуется перекись водорода (H_2O_2) и молекулярный кислород, далее H_2O_2 нейтрализуется под действием каталазы. К другим митохондриальным антиоксидантным системам относят тиолсодержащий трипептид глутатион, белки тиоредоксины и глутаредоксины, ферменты глутатионредуктазы, тиоредоксиновые пероксидазы (пероксиредоксины). Эти ферменты играют важную роль в поддержании окислительно-восстановительного статуса митохондрий, защищая органические молекулы от окисления АФК [60–63]. Нарушение баланса между продукцией мтАФК и их нейтрализацией системой антиоксидантной защиты приводит к развитию окислительного стресса.

Все больше данных свидетельствует об участии окислительного стресса и мтАФК в патогенезе ВЗК. Во многих работах выявлены повреждения мтДНК, белков цитоскелета и липидов,

связанные с окислительным стрессом в слизистой оболочке кишки в образцах пациентов с ВЗК и в мышинных моделях; при этом в слизистой оболочке уровень АФК был повышен [64–67]. С помощью магнитно-резонансной томографии с усилением Оверхаузера было показано, что на начальных стадиях развития ДСН-индуцированного колита у мышей АФК продуцируются внутриклеточно в дистальном и проксимальном отделах толстой кишки, в то время как на более поздних стадиях развития патологии АФК продуцируются как внутриклеточно, так и внеклеточно. Более того, было продемонстрировано, что окислительно-восстановительный дисбаланс возникал еще до начала развития ДСН-индуцированного колита, предшествуя воспалительным изменениям слизистой оболочки толстой кишки [68]. У мышей с дефицитом глутатионпероксидазы-1 (GSHPx-1) и глутатионпероксидазы-2 (GPRP-2), специфичной для кишечного эпителия, регистрировали как повышенный уровень окислительного стресса в толстой кишке, так и признаки развития колита [69]. У мышей с дефицитом белка внутренней мембраны митохондрий UCP2 (uncoupling protein 2) – негативного регулятора мтАФК – развивался тяжелый ДСН-индуцированный колит [70].

По-видимому, мтАФК могут участвовать в регуляции барьерной функции кишечного эпителия, непосредственно влияя на плотные контакты. Так, в моделях нарушения целостности монослоя клеток кишечного эпителия Caco-2 с помощью ДСН и осмотического стресса, а также механического растяжения было продемонстрировано участие мтАФК в перераспределении окклюдина и ZO-1 из плотных контактов во внутриклеточные компартменты, что приводило к нарушению структуры межклеточных контактов. Многие формы АФК вовлечены в разрушение плотных контактов посредством перестройки актинового цитоскелета, что приводит к уменьшению его взаимодействия с окклюдинам, ZO-1 и тяжелой цепью миозина. Более того, АФК способны напрямую окислять и повреждать актин и тубулин при ВЗК, что может нарушать нормальную организацию цитоскелета [67]. Все это вызывает повышение парacellularной проницаемости эпителия. Кроме того, перекись водорода, которая повышает уровень внутриклеточных АФК, изменяет фосфорилирование и локализацию окклюдина и ZO-1, нарушая тем самым целостность плотных контактов, и фосфорилирование β -катенина, что приводит к дестабилизации адгезивных контактов из-за перераспределения E-кадгерина [71]. В моделях нарушения барьерной функции кишечного эпителия под действием осмотического стресса и ДСН показано, что снижение мтАФК с помощью нокдауна Ca^{2+} -каналов Cav1.3 и TRPV6 или антиоксиданта MitoTEMPO предотвращало разрушение плотных контактов [72].

Из этих данных следует, что АФК могут нарушать нормальную структуру плотных контактов, что приводит к барьерной дисфункции кишечного эпителия. Однако точные механизмы этого процесса пока неизвестны.

Защитный эффект нацеленных на митохондрии антиоксидантов MitoTEMPO и MitoQ продемонстрирован на различных моделях ВЗК. Так, применение MitoTEMPO при ДСН-индуцированном колите предотвращало нарушение барьерной функции эпителия и приводило к менее выраженному воспалению кишки. Кроме того, MitoTEMPO снижал признаки окислительного стресса в биоптатах слизистой оболочки кишки от пациентов с БК [27]. Антиоксидант MitoQ защищал от илеоколита мышей, нокаутных по глутатионпероксидазам-1 и -2 [73]. Также MitoQ ослаблял ДСН-индуцированный колит у мышей. Показано, что защитный эффект MitoQ связан со снижением активации инфламасомы NLRP3 в иммунных клетках, которая играет критическую роль в секреции провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [74]. Мыши с дефицитом NLRP3 оказались устойчивы к колиту, вызванному ДСН [75]. Ранее нами показано [76], что прием митохондриальнонаправленного антиоксиданта SkQ1 предотвращает развитие ДСН-индуцированного колита у мышей и разборку плотных контактов в клетках кишечного эпителия Caco-2.

АФК могут выступать в качестве вторичных мессенджеров при передаче внутриклеточных сигнальных путей, в том числе NF- κ B, играющего важную роль в патогенезе ВЗК. В пораженных тканях толстой кишки пациентов с ЯК активность NF- κ B-сигналинга повышена, а блокада активности NF- κ B считается действенным методом лечения ЯК [77]. В этом случае именно окислительный стресс может активировать киназу ингибитора NF- κ B IKK (I-карпа-В kinase 2) и стимулировать ядерную транслокацию NF- κ B, приводя к экспрессии провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1, IL-8 в эпителиальных клетках кишечника, что способствует развитию воспаления [78–80]. Стоит отметить, что NF- κ B играет неоднозначную роль в кишечном эпителии. С одной стороны, он необходим для нормального самообновления кишечного эпителия, с другой стороны, его избыточная или неуместная активация может наоборот снизить барьерную функцию.

Такие антиоксиданты, как аскорбиновая кислота и тритерпеноид олеонанового ряда (2,3,19,23-тетрагидроксиолеан-12-еп-28-овая кислота), снижают ДСН-индуцированный колит *in vivo* за счет снижения активности NF- κ B и повышения экспрессии белков, участвующих в антиоксидантной защите клеток [81, 82]. Эти данные дополнительно доказывают наличие связи между NF- κ B и окислительным стрессом при ВЗК.

Таблица 2. Роль окислительного стресса в патогенезе ВЗК

Мишень	Воздействие/модель	Эффект	Ссылка
ДНК, липиды, белки АФК	Пациенты с ВЗК ДСН-индуцированный колит, пациенты с ВЗК	Окисление ДНК, белков и липидов Окислительный стресс	[64–67] [27, 67, 68]
Актин	ДСН, механический и осмотический стресс	Окисление под действием АФК, нарушение структуры цитоскелета	[67]
Окклюдин, ZO-1, β-катенин	H ₂ O ₂ <i>in vitro</i>	Фосфорилирование и перераспределение белков плотных и адгезивных контактов, что приводит к дестабилизации этих типов межклеточных контактов	[71]
Антиоксидантные ферменты GPx1, SOD	Пациенты с ВЗК	Снижение количества этих антиоксидантных ферментов	[64]
Антиоксидантные ферменты GPx1, GI-GPx ^a	Нокаутные по <i>Gpx1</i> , <i>Gpx2</i> мыши	Окислительный стресс в толстой кишке, развитие колита	[69]
UCP2	ДСН-индуцированный колит у мышей, нокаутных по гену <i>Ucp2</i>	Более тяжелое течение колита, чем у мышей дикого типа, перераспределение белков плотных контактов	[70]
мтАФК	Нокдаун Cav1.3 и TRPV6, MitoTEMPO на фоне действия ДСН (<i>in vitro</i>)	Снижение АФК и предотвращение разрушения плотных контактов	[72]
мтАФК	MitoTEMPO на фоне ДСН-индуцированного колита или ВЗК человека	Снижение окислительного стресса и воспаления кишки	[27]
мтАФК	MitoQ в модели ДСН-индуцированного колита и колита у мышей, нокаутных по <i>Gpx1</i> , <i>Gpx2</i>	Предотвращение патологических изменений в кишке и развития колита	[73]
мтАФК	SkQ1 <i>in vitro</i> и в модели ДСН-индуцированного колита	Предотвращение развития колита и разборки плотных контактов	[76]

^a GI-GPx (gastrointestinal glutathione peroxidase) — гастроинтестинальная гутатионпероксидаза.

Кроме того, АФК могут активировать киназы MAPK, также играющие критическую роль в воспалительном сигналинге. Активация MAPK-киназ p38 и JNK вовлечена в прогрессирование ЯК [83].

Стоит отметить, что мтАФК участвуют не только в патогенезе ВЗК, но и необходимы для нормального функционирования и обновления кишечного эпителия. Так, сопутствующая низкая активность антиоксидантов каталазы и супероксиддисмутазы-2 (SOD2) может представлять собой одну из основных причин апоптотической гибели апикальных энтероцитов. Показано, что сигнальные пути Notch и АКТ, играющие важную роль в формировании крипт в культуре кишечных органоидов, модулируются мтАФК [12].

Исходя из этого, логично предположить, что избыточный уровень мтАФК приводит к нарушению барьерной функции кишечного эпителия и участвует в патогенезе ВЗК как за счет прямого воздействия на плотные контакты, так и за счет

повышения уровня синтеза провоспалительных цитокинов. Использование митохондриальнонаправленных антиоксидантов, снижающих количество мтАФК, оказывает защитное действие на кишечный эпителий, восстанавливая его барьерную функцию, что позволяет рассматривать их как перспективные таргетные препараты для лечения ВЗК. Результаты исследований, в которых показано участие окислительного стресса в ВЗК, суммированы в табл. 2.

Наряду с АФК существенную роль в развитии ВЗК играют АФА. Последние представляют собой оксид азота (NO) и продукты его метаболизма. NO генерируется ферментом NO-синтазой (NOS), катализирующей превращение L-аргинина в L-цитруллин. Существует несколько изоформ NOS, в том числе митохондриальная. АФА образуются в результате взаимодействия NO с O₂⁻. АФА, аналогично АФК, оказывают повреждающее воздействие на органические молекулы клет-

ки, такие как липиды мембран, ДНК и белки. Избыток АФА приводит к развитию нитрозативного стресса и вовлечен в механизм развития окислительного стресса. Стоит отметить, что окислительный и нитрозативный стрессы лежат в основе многих заболеваний, протекающих на фоне воспаления [63, 84–86].

У пациентов с ВЗК детектируют повышенный уровень нитритов/нитратов в плазме крови, повышенную активность NOS в биоптатах образцов от пациентов с ЯК и БК [87]. Это подтверждает роль АФА в патогенезе ВЗК. АФА влияют на проницаемость кишечного барьера, индуцируя апоптоз энтероцитов и некроз, а также нарушая структуры плотных контактов [88]. Более подробно с ролью АФА в патогенезе ВЗК можно ознакомиться в обзорах [89–92].

РОЛЬ ДИНАМИКИ И ГОМЕОСТАЗА МИТОХОНДРИЙ В РАЗВИТИИ ВЗК

Растет число свидетельств роли нарушения динамики и гомеостаза митохондрий в патогенезе ВЗК. Гомеостаз митохондрий в первую очередь определяется балансом процессов митофагии и биогенеза митохондрий, а также опосредованным шаперонами митохондриальным ответом на неправильно свернутые белки, в результате чего происходит устранение дефектных митохондрий и обновление их пула. Нарушения этих процессов могут приводить как к накоплению дефектных митохондрий, так и к недостатку нормальных органелл.

У больных ЯК в период ремиссии, при которой заболевание ограничивается дистальным отделом толстой кишки, S. Hsieh и соавт. [35] наблюдали снижение экспрессии белка-шаперона прохИБИТИНА, локализованного на внутренней мембране митохондрий и регулирующего многие их функции, в том числе правильную сборку комплексов ЭТЦ. A. Theiss и соавт. [93] обнаружили снижение уровня прохИБИТИНА в кишечном эпителии пациентов с БК, а также в кишечном эпителии мышей в нескольких моделях экспериментального колита. Показано, что в условиях окислительного стресса экспрессия прохИБИТИНА снижалась, а сверхэкспрессия прохИБИТИНА предотвращала нарушение проницаемости клеток кишечного эпителия человека Caco2-BBE. D. Jackson и соавт. [94] показали, что у мышей с дефицитом прохИБИТИНА в эпителиальных клетках кишечника происходило спонтанное развитие воспаления кишечника. Нарушения ультраструктуры митохондрий и ответ на неправильно свернутые белки развивались через неделю после делеции гена прохИБИТИНА. Одновременно наблюдалась активация инфлам-массомы NLRP3 под действием митохондриальных АФК, вследствие чего усиливалась секреция провоспалительных цитокинов. MitoTEMPO так-

же нивелировал признаки митохондриальной дисфункции и воспаления кишки у мышей, дефицитных по прохИБИТИНУ [94]. Таким образом, корректная работа митохондриального шаперона прохИБИТИНА обеспечивает целостность эпителиального барьера за счет предотвращения образования мтАФК.

В случае слишком активного накопления неправильно свернутых белков и неспособности шаперонов справиться со стрессом митохондрии подвергаются фрагментации и дальнейшей митофагии [95]. Основную роль в процессе дробления митохондрий играет динаминподобный белок-1 (DNM1L). Значительное снижение $\Delta\Psi$ и избыточную продукцию мтАФК считают признаком дисфункции митохондрий и сигналом для систем контроля их качества, в частности системы PINK1-Parkin, которая обеспечивает избирательную аутофагию (митофагию) дефектных митохондрий [60, 96, 97]. К основным регуляторам биогенеза митохондрий относится белок PGC-1 α : он запускает пролиферацию митохондрий, что восстанавливает их количество на фоне митофагии. Баланс между митофагией дефектных митохондрий и биогенезом новых органелл — необходимое условие гомеостаза. Поддержание нормального состояния пула митохондрий обеспечивает адекватный клеточный ответ на метаболические изменения и стресс, а также их адаптивную роль во внутриклеточных сигнальных путях [95, 98, 99]. Нарушения этого процесса повышают чувствительность клеток к повреждающим воздействиям и способствуют развитию барьерной дисфункции.

Дробление митохондрий часто предшествует митофагии. Показано, что при ДСН-индуцированном колите в кишечном эпителии мышей усилен процесс дробления митохондрий, а ингибирование фрагментации митохондрий снижало признаки колита [100].

Инвазия бактерий в клетки кишечного эпителия приводит к нарушению гомеостаза митохондрий. Так, показано, что воздействие инвазивного штамма *Escherichia coli* на монослой клеток линии T84, в отличие от неинвазивного, вызывало DNM1L-зависимую фрагментацию митохондрий, выход цитохрома C в цитоплазму, снижение $\Delta\Psi$ и количества АТФ. Более того, инвазивные бактерии снижали экспрессию генов, необходимых для слияния и биогенеза митохондрий: *OPA1* и *PGC1A*. В этом случае ингибиторы DNM1L, такие как Mdivi1 и P110, снижали фрагментацию митохондрий лишь на короткий период времени. Возможно, эта неспособность пула митохондрий поддерживать слитное состояние объясняется сниженным содержанием факторов, необходимых для биогенеза и слияния митохондрий (*OPA1* и *PGC-1 α*) при постоянно происходящей избыточной фрагментации и митофагии. Необходи-

мость интернализации бактерий в этой модели подтверждена тем, что только живые бактерии, имеющие пили I типа, необходимые для инвазии, вызывали описанные выше эффекты [101]. Таким образом, интернализация бактерий в энтероциты может вызывать нарушение митохондриального гомеостаза на морфологическом и функциональном уровне, что играет роль на ранних этапах патогенеза ВЗК. Тем не менее точный механизм влияния бактерий на митохондрии неизвестен. Показано лишь, что белок EspF, характерный для патогенных штаммов *E. coli*, вызывает снижение $\Delta\Psi_m$ [102], что может усиливать митофагию. Еще один возможный механизм влияния интернализированных бактерий на фрагментацию митохондрий – механические силы, генерируемые движущимися внутри эукариотических клеток бактериями. Такие механические силы могут вызывать локальную активацию системы фрагментации митохондрий [103].

Эти данные показывают, что при ВЗК усиливается фрагментация митохондрий и развивается их дисфункция, а ингибирование фрагментации может затормозить развитие колита.

Нарушения митофагии также ассоциированы с повышенной восприимчивостью к ВЗК. Так, полиморфизм в гене *IRGM* (immunity-related GTPase family M protein), кодирующего GTPазу, участвующую в регуляции фрагментации митохондрий и митофагии, ассоциирован с БК. Мыши с делецией гена *Irgm* проявляют повышенную восприимчивость к экспериментальному колиту [104, 105]. Полиморфизм гена *ATG16L1*, играющего роль в общей аутофагии, также связан с риском развития БК [106]. Если учесть, что митофагия – это механизм устранения дисфункциональных митохондрий, из приведенных выше данных становится ясно, что в патогенез ВЗК вовлечен процесс накопления дисфункциональных митохондрий.

Белок PGC-1 α , играющий критическую роль в биогенезе митохондрий, высоко экспрессирован в кишечном эпителии. У пациентов с ВЗК его экспрессия снижена [107]. В тоже время стоит отметить, что в криптах, где находятся стволовые клетки кишечного эпителия, уровень экспрессии PGC-1 α низкий. Считается, что в энтероцитах по мере их дифференцировки повышается экспрессия PGC-1 α , что определяет высокую дыхательную активность митохондрий, при этом наблюдается низкий уровень антиоксидантной защиты. Это приводит к накоплению мтАФК и активирует программу апоптоза терминальнодифференцированных клеток, что необходимо для самообновления кишечного эпителия [108].

В одном из исследований продемонстрирована защитная роль PGC-1 α в поддержании барьерной функции кишечного эпителия и при ЯК. У пациентов с ЯК и у мышей с ДСН-индуцирован-

ным колитом PGC-1 α ацетируется и направляется на протеасомную деградацию, что приводит к снижению его уровня. В этом случае мыши, нокаутные по *Pgc1a* в кишечном эпителии, были более восприимчивы к ДСН-индуцированному колиту, а митохондрии таких мышей проявляли признаки дисфункции, выраженной в снижении активности комплексов I и IV ЭТЦ. Фармакологическая активация PGC-1 α снижала признаки колита и восстанавливала морфологию митохондрий. Более того, показано, что у мутантных мышей повышена проницаемость кишечного эпителия для бактерий, что связано с нарушением в экспрессии белков плотных контактов. На основании этих данных К. Cunningham и соавт. [28] пришли к выводу, что снижение уровня PGC-1 α в кишечном эпителии способствует нарушениям структуры и функции митохондрий, тем самым вызывая снижение барьерной функции и облегчая транслокацию бактерий.

Все это позволяет заключить, что нарушение митохондриального гомеостаза и накопление дисфункциональных митохондрий при недостаточном биогенезе новых органелл ассоциированы с патогенезом ВЗК. Повышенное содержание поврежденных митохондрий индуцирует энергетический и окислительный стресс клеток кишечного эпителия, что снижает его барьерную функцию; при этом система контроля качества митохондриальных белков также ассоциирована с ВЗК, хотя точные механизмы этих процессов неизвестны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный анализ литературных данных позволяет заключить, что митохондрии играют критическую роль в поддержании барьерной функции кишечного эпителия, регулируя целостность плотных контактов энтероцитов и самообновление клеток эпителия. При ВЗК наблюдается дисфункция митохондрий кишечного эпителия, проявляющаяся в нарушении энергетической функции, повышенной продукции АФК и нарушении динамики митохондрий, – все это индуцирует их фрагментацию. Нарушение энергетической функции митохондрий приводит к снижению выработки АТФ и, как следствие, развитию воспаления и увеличению проницаемости эпителия для бактерий. Кроме того, низкий уровень АТФ снижает способность кишечного эпителия к самообновлению, что необходимо для регенерации ткани после повреждений. В свою очередь, активация киназы AMPK, реагирующей на падения уровня АТФ в клетке, может стать одной из стратегий в лечении ВЗК.

Избыточная продукция мтАФК при ВЗК нарушает структуру межклеточных контактов и усиливает продукцию провоспалительных цитоки-

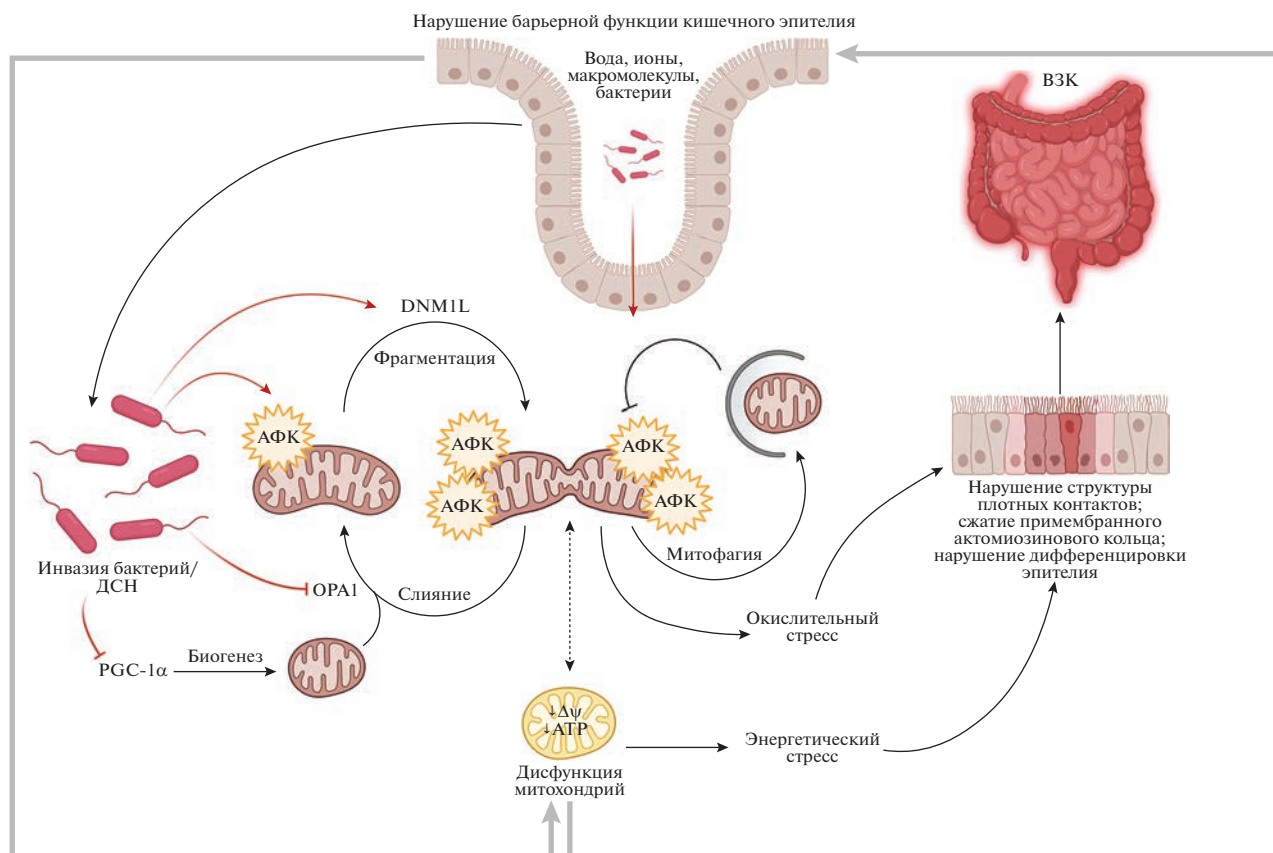


Рис. 1. Роль митохондрий в патогенезе ВЗК. Нарушение барьерной функции кишечного эпителия, вызванное различными факторами (микробиота кишки, генетическая предрасположенность, питание, лекарства и др.), приводит к инвазии бактерий в клетки эпителия. Это оказывает влияние на состояние митохондрий: усиливается генерация мтАФК, митохондриальная динамика сдвигается в сторону фрагментации митохондрий и ингибируется их биогенез. Поврежденные фрагментированные митохондрии могут подвергаться митофагии, которая служит защитным механизмом, поддерживающим нормальное состояние митохондриального пула. Однако избыточное накопление дисфункциональных митохондрий, характеризующихся сниженными значениями $\Delta\Psi$ и продукции АТФ при повышенном уровне генерации мтАФК, приводит к энергетическому и окислительному стрессам. Это может быть одной из причин нарушения структуры плотных межклеточных контактов и цитоскелета в клетках кишечного эпителия, а также снижения способности эпителиальной выстилки к самообновлению. Вследствие этого эпителиальный барьер становится еще более проницаем для бактерий, а бактериальные антигены стимулируют иммунную систему собственной пластинки слизистой. Это приводит к выделению провоспалительных цитокинов, которые дополнительно повышают проницаемость эпителиального барьера. Все это формирует порочный круг, который может быть причиной хронизации ВЗК. Иллюстрация сделана с использованием программы BioRender.com (<https://www.biorender.com/>).

нов. Применение антиоксидантов, в том числе митохондриальнонаправленных, может частично компенсировать нарушение барьерной функции эпителия кишечника. Как правило, дисфункциональные митохондрии характеризуются фрагментированным фенотипом. При ВЗК наблюдается нарушение динамики митохондрий, выражающееся в усилении дробления. Применение агентов, способных подавить фрагментацию митохондрий, позволит восстанавливать барьерную функцию кишечного эпителия. В норме дисфункциональные митохондрии подвергаются утилизации в ходе процесса митофагии, но при ВЗК этот процесс нарушен. Следовательно, использование агентов, усиливающих митофагию, можно также рассматривать в качестве потенциальных препа-

ратов для терапии ВЗК. На рис. 1 представлена схема, отражающая роль дисфункции митохондрий в нарушении барьерной функции кишечного эпителия и патогенезе ВЗК. Имеющиеся на сегодняшний день литературные данные задают направление для дальнейших возможных исследований и разработок. Более детально изучив механизмы влияния митохондрий на развитие ВЗК, можно создать основу для разработки митохондриальнонаправленных противовоспалительных препаратов.

Авторы выражают глубокую признательность д.б.н. Черняку Борису Викторовичу, заведующему лабораторией биоэнергетики клетки НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, за конструктивную критику.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00061).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kaplan G.G. (2015) The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**(12), 720–727.
- de Lange K.M., Barrett J.C. (2015) Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *J. Autoimmun.* **64**, 91–100.
- Fiocchi C. (2015) Inflammatory bowel disease pathogenesis: where are we? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **30**(Suppl. 1), 12–18.
- Kucharzik T., Maaser C., Lügering A., Kagnoff M., Mayer L., Targan S., Domschke W. (2006) Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm. Bowel Dis.* **12**(11), 1068–1083.
- Coskun M. (2014) Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Front. Med.* **1**, 24.
- Bischoff S.C., Barbara G., Buurman W., Ockhuizen T., Schulzke J.D., Serino M., Tilg H., Watson A., Wells J.M. (2014) Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* **14**, 189.
- Shen L., Turner J.R. (2006) Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**(4), G577–G582.
- Zolotova N.A., Akhrieva Kh.M., Zayratyants O.V. (2019) Epithelial barrier of the colon in health and patients with ulcerative colitis. *Eksp. Klin. Gastroenterol.* **162**(2), 4–13.
- Suzuki T. (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol. Life Sci.* **70**(4), 631–659.
- Guttman J.A., Finlay B.B. (2009) Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**(4), 832–841.
- Schoultz I., Keita Å.V. (2020) The intestinal barrier and current techniques for the assessment of gut permeability. *Cells.* **9**(8), 1909.
- Rath E., Moschetta A., Haller D. (2018) Mitochondrial function — gatekeeper of intestinal epithelial cell homeostasis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **15**(8), 497–516.
- Van Itallie C.M., Holmes J., Bridges A., Gookin J.L., Coccato M.R., Proctor W., Colegio O.R., Anderson J.M. (2008) The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J. Cell. Sci.* **121**(Pt 3), 298–305.
- Backert S., Boehm M., Wessler S., Tegtmeyer N. (2013) Transmigration route of *Campylobacter jejuni* across polarized intestinal epithelial cells: paracellular, transcellular or both? *Cell Commun. Signal.* **11**, 72.
- Peterson L.W., Artis D. (2014) Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**(3), 141–153.
- Roda G., Sartini A., Zambon E., Calafiore A., Marocchi M., Caponi A., Belluzzi A., Roda E. (2010) Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **16**(34), 4264–4271.
- Schmitz H., Barmeyer C., Fromm M., Runkel N., Foss H.D., Bentzel C.J., Riecken E.O., Schulzke J.D. (1999) Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* **116**(2), 301–309.
- Oshima T., Miwa H., Joh T. (2008) Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**(Suppl. 2), S146–S150.
- Landy J., Ronde E., English N., Clark S.K., Hart A.L., Knight S.C., Ciclitira P.J., Al-Hassi H.O. (2016) Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **22**(11), 3117–3126.
- Marin M.L., Greenstein A.J., Geller S.A., Gordon R.E., Aufses A.H Jr. (1983) A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. *Am. J. Gastroenterol.* **78**(9), 537–547.
- Zeissig S., Bürgel N., Günzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., Kroesen A.J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D. (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut.* **56**(1), 61–72.
- Das P., Goswami P., Das T.K., Nag T., Sreenivas V., Ahuja V., Panda S.K., Gupta S.D., Makharia G.K. (2012) Comparative tight junction protein expressions in colonic Crohn's disease, ulcerative colitis, and tuberculosis: a new perspective. *Virchows Arch.* **460**(3), 261–270.
- Ungaro R., Mehandru S., Allen P.B., Peyrin-Biroulet L., Colombel J.F. (2017) Ulcerative colitis. *Lancet.* **389**(10080), 1756–1770.
- Mayer L. (2010) Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. *J. Gastroenterol.* **45**(1), 9–16.
- Liu J.Z., van Sommeren S., Huang H., Ng S.C., Alberts R., Takahashi A., Ripke S., Lee J.C., Jostins L., Shah T., Abedian S., Cheon J.H., Cho J., Dayani N.E., Franke L., Fuyuno Y., Hart A., Juyal R.C., Juyal G., Kim W.H., Morris A.P., Poustchi H., Newman W.G., Midha V., Orchard T.R., Vaheedi H., Sood A., Sung J.Y., Malekzadeh R., Westra H.J., Yamazaki K., Yang S.K.; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; International IBD Genetics Consortium; Barrett J.C., Alizadeh B.Z., Parkes M., Bk T., Daly M.J., Kubo M., Anderson C.A., Weersma R.K. (2015) Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.* **47**(9), 979–986.

26. Novak E.A., Mollen K.P. (2015) Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**, 62.
27. Wang A., Keita A.V., Phan V., McKay C.M., Schoultz I., Lee J., Murphy M.P., Fernando M., Ronaghan N., Balce D., Yates R., Dicay M., Beck P.L., MacNaughton W.K., Söderholm J.D., McKay D.M. (2014) Targeting mitochondria-derived reactive oxygen species to reduce epithelial barrier dysfunction and colitis. *Am. J. Pathol.* **184**(9), 2516–2527.
28. Cunningham KE, Vincent G, Sodhi CP, Novak EA, Ranganathan S, Egan CE, Stolz D.B., Rogers M.B., Firek B., Morowitz M.J., Gittes G.K., Zuckersbraun B.S., Hackam D.J., Mollen K.P. (2016) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1- α (PGC1 α) protects against experimental murine colitis. *J. Biol. Chem.* **291**(19), 10184–101200.
29. Jackson D.N., Theiss A.L. (2020) Gut bacteria signaling to mitochondria in intestinal inflammation and cancer. *Gut. Microbes.* **11**(3), 285–304.
30. Kłos P., Dabrowski S.A. (2021) The role of mitochondria dysfunction in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(21), 11673.
31. Ho G.T., Theiss A.L. (2022) Mitochondria and inflammatory bowel diseases: toward a stratified therapeutic intervention. *Annu. Rev. Physiol.* **10**(84), 435–459.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-060821-083306>
32. Bourgonje A.R., Feelisch M., Faber K.N., Pasch A., Dijkstra G., van Goor H. (2020) Oxidative stress and redox-modulating therapeutics in inflammatory bowel disease. *Trends. Mol. Med.* **26**(11), 1034–1046.
33. Cunningham K., Novak E., Vincent G., Mollen K.P., Chinnder S. (2015) Antibiotic treatment protects against intestinal inflammation in peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC1 α) deficient mice in experimental colitis. *J. Am. Coll. Surg.* **221**(4), S28–S29.
34. Söderholm J.D., Olaison G., Peterson K.H., Franzén L.E., Lindmark T., Wirén M., Tagesson C., Sjö Dahl R. (2002) Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut.* **50**(3), 307–313.
35. Hsieh S.Y., Shih T.C., Yeh C.Y., Lin C.J., Chou Y.Y., Lee Y.S. (2006) Comparative proteomic studies on the pathogenesis of human ulcerative colitis. *Proteomics.* **6**(19), 5322–5331.
36. Bohovych I., Khalimonchuk O. (2016) Sending out an SOS: mitochondria as a signaling hub. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 109.
37. Pickles S., Vigié P., Youle R.J. (2018) Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr. Biol.* **28**(4), R170–R185.
38. Haberman Y., Karns R., Dexheimer P.J., Schirmer M., Somekh J., Jurickova I., Braun T., Novak E., Bauman L., Collins M.H., Mo A., Rosen M.J., Bonkowski E., Gotman N., Marquis A., Nistel M., Rufo P.A., Baker S.S., Sauer C.G., Markowitz J., Pfefferkorn M.D., Rosh J.R., Boyle B.M., Mack D.R., Baldassano R.N., Shah S., Leleiko N.S., Heyman M.B., Griffiths A.M., Patel A.S., Noe J.D., Aronow B.J., Kugathasan S., Walters T.D., Gibson G., Thomas S.D., Mollen K., Shen-Orr S., Huttenhower C., Xavier R.J., Hyams J.S., Denson L.A. (2019) Ulcerative colitis mucosal transcriptomes reveal mitochondriopathy and personalized mechanisms underlying disease severity and treatment response. *Nat. Commun.* **10**(1), 38.
39. Heller S., Penrose H.M., Cable C., Biswas D., Nakhouli H., Baddoo M., Flemington E., Crawford S.E., Savkovic S.D. (2017) Reduced mitochondrial activity in colonocytes facilitates AMPK α 2-dependent inflammation. *FASEB J.* **31**(5), 2013–2025.
40. Xue X, Bredell BX, Anderson ER, Martin A, Mays C, Nagao-Kitamoto H, Huang S., Györfy B., Greenston J.K., Hardiman K., Spence J.R., Kamada N., Shah Y.M. (2017) Quantitative proteomics identifies STEAP4 as a critical regulator of mitochondrial dysfunction linking inflammation and colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**(45), E9608–E9617.
41. Sifroni K.G., Damiani C.R., Stoffel C., Cardoso M.R., Ferreira G.K., Jeremias I.C., Rezin G.T., Scaini G., Schuck P.F., Dal-Pizzol F., Streck E.L. (2010) Mitochondrial respiratory chain in the colonic mucosal of patients with ulcerative colitis. *Mol. Cell. Biochem.* **342**(1–2), 111–115.
42. Restivo N.L., Srivastava M.D., Schafer I.A., Hoppel C.L. (2004) Mitochondrial dysfunction in a patient with crohn disease: possible role in pathogenesis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **38**(5), 534–538.
43. Dankowski T., Schröder T., Möller S., Yu X., Ellinghaus D., Bär F., Fellermann K., Lehnert H., Schreiber S., Franke A., Sina C., Ibrahim S.M., König I.R. (2016) Male-specific association between MT-ND4 11719 A/G polymorphism and ulcerative colitis: a mitochondria-wide genetic association study. *BMC Gastroenterol.* **16**(1), 118.
44. Crakes K.R., Santos Rocha C., Grishina I., Hirao L.A., Napoli E., Gaulke C.A., Fenton A., Datta S., Arredondo J., Marco M.L., Sankaran-Walters S., Cortopassi G., Giulivi C., Dandekar S. (2019) PPAR α -targeted mitochondrial bioenergetics mediate repair of intestinal barriers at the host-microbe intersection during SIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**(49), 24819–24829.
45. Park W.H., Han Y.W., Kim S.H., Kim S.Z. (2007) An ROS generator, antimycin A, inhibits the growth of HeLa cells via apoptosis. *J. Cell Biochem.* **102**(1), 98–109.
46. Liu Y., Schubert D.R. (2009) The specificity of neuroprotection by antioxidants. *J. Biomed. Sci.* **16**(1), 98.
47. Janssen Duijghuijsen L.M., Grefte S., de Boer V.C.J., Zeper L., van Dartel D.A.M., van der Stelt I., Bekkenkamp-Grovenstein M., van Norren K., Wichers H.J., Keijer J. (2017) Mitochondrial ATP depletion disrupts Caco-2 monolayer integrity and internalizes claudin 7. *Front. Physiol.* **8**, 794.
48. Smith S.A., Ogawa S.A., Chau L., Whelan K.A., Hamilton K.E., Chen J., Keilbaugh S., Fogt F., Bewtra M., Braun J., Xavier R.J., Clish C.B., Slaff B., Weljie A.M., Bushman F.D., Lewis J.D., Li H., Master S.R., Bennett M.J., Nakagawa H., Wu G.D. (2021)

- Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease alters intestinal epithelial metabolism of hepatic acylcarnitines. *J. Clin. Invest.* **131**(1), e133371.
49. Roediger W.E., Nance S. (1986) Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. *Br. J. Exp. Pathol.* **67**(6), 773–782.
 50. Umar S. (2010) Intestinal stem cells. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **12**(5), 340–348.
 51. Chandel N.S., Jasper H., Ho T.T., Passequé E. (2016) Metabolic regulation of stem cell function in tissue homeostasis and organismal ageing. *Nat. Cell. Biol.* **18**(8), 823–832.
 52. Rodríguez-Colman M.J., Schewe M., Meerlo M., Stigter E., Gerrits J., Pras-Raves M., Sacchetti A., Hornsveld M., Oost K.C., Snippert H.J., Verhoeven-Duif N., Fodde R., Burgering B.M. (2017) Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature*. **543**(7645), 424–427.
 53. Zhang F., Pirooznia M., Xu H. (2020) Mitochondria regulate intestinal stem cell proliferation and epithelial homeostasis through FOXO. *Mol. Biol. Cell.* **31**(14), 1538–1549.
 54. Bär F., Bochmann W., Widok A., von Medem K., Pangel R., Hirose M., Yu X., Kalies K., König P., Böhm R., Herdegen T., Reinicke A.T., Büning J., Lehnert H., Fellermann K., Ibrahim S., Sina C. (2013) Mitochondrial gene polymorphisms that protect mice from colitis. *Gastroenterology*. **145**(5), 1055–1063.e3.
 55. Wen Y.A., Xiong X., Scott T., Li A.T., Wang C., Weiss H.L., Tan L., Bradford E., Fan T.W.M., Chandel N.S., Barrett T.A., Gao T. (2019) The mitochondrial retrograde signaling regulates Wnt signaling to promote tumorigenesis in colon cancer. *Cell Death Differ.* **26**(10), 1955–1969.
 56. Mihaylova M.M., Shaw R.J. (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell. Biol.* **13**(9), 1016–1023.
 57. Chen L., Wang J., You Q., He S., Meng Q., Gao J., Wu X., Shen Y., Sun Y., Wu X., Xu Q. (2018) Activating AMPK to restore tight junction assembly in intestinal epithelium and to attenuate experimental colitis by metformin. *Front. Pharmacol.* **9**, 761.
 58. Chang K.W., Kuo C.Y. (2015) 6-Gingerol modulates proinflammatory responses in dextran sodium sulfate (DSS)-treated Caco-2 cells and experimental colitis in mice through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activation. *Food Funct.* **6**(10), 3334–3341.
 59. Sun X., Yang Q., Rogers C.J., Du M., Zhu M.J. (2017) AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. *Cell Death Differ.* **24**(5), 819–831.
 60. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* **94**(3), 909–950.
 61. Shanmugasundaram K., Nayak B.K., Friedrichs W.E., Kaushik D., Rodriguez R., Block K. (2017) NOX4 functions as a mitochondrial energetic sensor coupling cancer metabolic reprogramming to drug resistance. *Nat. Commun.* **8**(1), 997.
 62. Forrester S.J., Kikuchi D.S., Hernandez M.S., Xu Q., Griendling K.K. (2018) Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circ. Res.* **122**(6), 877–902.
 63. Butterfield D.A., Boyd-Kimball D. (2020) Mitochondrial oxidative and nitrosative stress and Alzheimer disease. *Antioxidants* (Basel). **9**(9), 818.
 64. Dincer Y., Erzin Y., Himmetoglu S., Gunes K.N., Bal K., Akcay T. (2007) Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **52**(7), 1636–1641.
 65. Balmus I.M., Ciobica A., Trifan A., Stanciu C. (2016) The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in inflammatory bowel disease: clinical aspects and animal models. *Saudi J. Gastroenterol.* **22**(1), 3–17.
 66. Kruidenier L., Kuiper I., Lamers C.B., Verspaget H.W. (2003) Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J. Pathol.* **201**, 28–36.
 67. Keshavarzian A., Banan A., Farhadi A., Komanduri S., Mutlu E., Zhang Y., Fields J.Z. (2003) Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. **52**(5), 720–728.
 68. Yasukawa K., Hirago A., Yamada K., Tun X., Ohkuma K., Utsumi H. (2019) *In vivo* redox imaging of dextran sodium sulfate-induced colitis in mice using Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging. *Free Radic. Biol. Med.* **136**, 1–11.
 69. Esworthy R.S., Steven Esworthy R., Aranda R., Martín M.G., Doroshov J.H., Binder S.W., Chu F.F. (2001) Mice with combined disruption of *Gpx1* and *Gpx2* genes have colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**(3), G848–G855.
 70. Zhang H., Kuai X.Y., Yu P., Lin L., Shi R. (2012) Protective role of uncoupling protein-2 against dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **27**(3), 603–608.
 71. Rao R. (2008) Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Front. Biosci.* **13**, 7210–7226.
 72. Gangwar R., Meena A.S., Shukla P.K., Nagaraja A.S., Dorniak P.L., Pallikuth S., Waters C.M., Sood A., Rao R. (2017) Calcium-mediated oxidative stress: a common mechanism in tight junction disruption by different types of cellular stress. *Biochem. J.* **474**(5), 731–749.
 73. Chu F.F., Esworthy R.S., Doroshov J.H., Grasberger H., Donko A., Leto T.L., Gao Q., Shen B. (2017) Deficiency in Duox2 activity alleviates ileitis in *GPx1*- and *GPx2*-knockout mice without affecting apoptosis incidence in the crypt epithelium. *Redox Biol.* **11**, 144–156.
 74. Dashdorj A., Jyothi K.R., Lim S., Jo A., Nguyen M.N., Ha J., Yoon K.S., Kim H.J., Park J.H., Murphy M.P., Kim S.S. (2013) Mitochondria-targeted antioxidant

- MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines. *BMC Med.* **11**, 178.
75. Bauer C., Duewell P., Mayer C., Lehr H.A., Fitzgerald K.A., Dauer M., Tschopp J., Endres S., Latz E., Schnurr M. (2010) Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. **59**(9), 1192–1199.
 76. Fedorov A.V., Chelombitko M.A., Chernyavskij D.A., Galkin I.I., Pletjushkina O.Y., Vasilieva T.V., Zinovkin R.A., Chernyak B.V. (2022) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 prevents the development of experimental colitis in mice and impairment of the barrier function of the intestinal epithelium. *Cells*. **11**(21), 3441.
 77. Gan H.T., Chen Y.Q., Ouyang Q. (2005) Sulfasalazine inhibits activation of nuclear factor- κ B in patients with ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**(7), 1016–1024.
 78. Piechota-Polanczyk A., Fichna J. (2014) Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **387**(7), 605–620.
 79. Ji Y., Dai Z., Sun S., Ma X., Yang Y., Tso P., Wu G., Wu Z. (2018) Hydroxyproline attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: involvement of the NF- κ B signaling and oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* **62**(21), e1800494.
 80. He Y., Li Z., Xu T., Luo D., Chi Q., Zhang Y., Li S. (2022) Polystyrene nanoplastics deteriorate LPS-modulated duodenal permeability and inflammation in mice via ROS driven-NF- κ B/NLRP3 pathway. *Chemosphere*. **307**(Pt. 1), 135662.
 81. Lifei-Luo, Zhang J., Li X., Zhu Y., Wang Y., Liu D. (2023) Sericic acid ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice by modulating the NF- κ B and Nrf2 pathways. *Curr. Mol. Pharmacol.* **16**(7), 759–770. <https://doi.org/10.2174/1874467215666220928100319>
 82. Yan H., Wang H., Zhang X., Li X., Yu J. (2015) Ascorbic acid ameliorates oxidative stress and inflammation in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**(11), 20245–20253.
 83. Wang Z., Li S., Cao Y., Tian X., Zeng R., Liao D.F., Cao D. (2016) Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 9875298.
 84. Shlapakova T.I., Kostin R.K., Tyagunova E.E. (2020) Reactive oxygen species: participation in cellular processes and progression of pathology. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **46**(5), 657–674.
 85. Reutov V.P., Samosudova N.V., Sorokina E.G. (2019) A model of glutamate neurotoxicity and mechanisms of the development of the typical pathological process. *Biophysics*. **64**(2), 233–250.
 86. Reutov V.P., Sorokina E.G. (2022) Causal relationship between physiological and pathological processes in the brain and in the gastrointestinal tract: the brain–intestine axis. *Biophysics*. **67**(6), 972–986.
 87. McCafferty D.M. (2000) Peroxynitrite and inflammatory bowel disease. *Gut*. **46**(3), 436–439.
 88. Chokshi N.K., Guner Y.S., Hunter C.J., Upperman J.S., Grishin A., Ford H.R. (2008) The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin. Perinatol.* **32**(2), 92–99.
 89. Pavlick K.P., Laroux F.S., Fuseler J., Wolf R.E., Gray L., Hoffman J., Grisham M.B. (2002) Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic. Biol. Med.* **33**(3), 311–322.
 90. Abot A., Fried S., Cani P.D., Knauf C. (2022) Reactive oxygen species/reactive nitrogen species as messengers in the gut: impact on physiology and metabolic disorders. *Antioxid. Redox Signal.* **37**(4–6), 394–415.
 91. Predonzani A., Cali B., Agnellini A.H., Molon B. (2015) Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: when inflammation says nitric oxide. *World J. Exp. Med.* **5**(2), 64–76.
 92. Guan G., Lan S. (2018) Implications of antioxidant systems in inflammatory bowel disease. *Biomed. Res. Int.* **2018**, 1290179.
 93. Theiss A.L., Idell R.D., Srinivasan S., Klapproth J.M., Jones D.P., Merlin D., Sitaraman S.V. (2007) Prohibitin protects against oxidative stress in intestinal epithelial cells. *FASEB J.* **21**(1), 197–206.
 94. Jackson D.N., Panopoulos M., Neumann W.L., Turner K., Cantarel B.L., Thompson-Snipes L., Dassopoulos T., Feagins L.A., Souza R.F., Mills J.C., Blumberg R.S., Venuprasad K., Thompson W.E., Theiss A.L. (2020) Mitochondrial dysfunction during loss of prohibitin 1 triggers Paneth cell defects and ileitis. *Gut*. **69**(11), 1928–1938.
 95. Zhu J., Wang K.Z.Q., Chu C.T. (2013) After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy*. **9**(11), 1663–1676.
 96. Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L., Anders M.W., Sheu S.S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**(4), C817–C833.
 97. Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J., Brown E.B., Gelbard H.A. (2011) Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*. **50**(2), 98–115.
 98. Palikaras K., Tavernarakis N. (2014) Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp. Gerontol.* **56**, 182–188.
 99. Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N. (2015) Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death Differ.* **22**(9), 1399–1401.
 100. Mancini N.L., Goudie L., Xu W., Sabouny R., Rajeev S., Wang A., Esquerre N., Al Rajabi A., Jayme T.S., van Tilburg Bernandes E., Nasser Y., Ferraz J.G.P., Shutt T., Shearer J., McKay D.M. (2020) Perturbed mitochondrial dynamics is a novel feature of colitis that can be targeted to lessen disease. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **10**(2), 287–307.
 101. Mancini N.L., Rajeev S., Jayme T.S., Wang A., Keita A.V., Workentine M.L., Hamed S., Söderholm J.D., Lopes F., Shutt T.E., Shearer J., McKay D.M. (2021) Crohn's disease pathobiont ad-

- herent-invasive *E. coli* disrupts epithelial mitochondrial networks with implications for gut permeability. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **11**(2), 551–571.
102. Nagai T., Abe A., Sasakawa C. (2005) Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J. Biol. Chem.* **280**(4), 2998–3011.
 103. Helle S.C.J., Feng Q., Aebersold M.J., Hirt L., Grüter R.R., Vahid A., Sirianni A., Mostowy S., Snedeker J.G., Šarić A., Idema T., Zambelli T., Kornmann B. (2017) Mechanical force induces mitochondrial fission. *Elife.* **6**, 30292.
 104. Singh S.B., Ornatowski W., Vergne I., Naylor J., Delgado M., Roberts E., Ponpuak M., Master S., Pilli M., White E., Komatsu M., Deretic V. (2010) Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat. Cell Biol.* **12**(12), 1154–1165.
 105. Liu B., Gulati A.S., Cantillana V., Henry S.C., Schmidt E.A., Daniell X., Grossniklaus E., Schoenborn A.A., Sartor R.B., Taylor G.A. (2013) Irgm1-deficient mice exhibit Paneth cell abnormalities and increased susceptibility to acute intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **305**(8), G573–G584.
 106. Salem M., Ammitzboell M., Nys K., Seidelin J.B., Nielsen O.H. (2015) ATG16L1: a multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy.* **11**(4), 585–594.
 107. Ussakli C.H., Ebace A., Binkley J., Brentnall T.A., Emond M.J., Rabinovitch P.S., Risques R.A. (2013) Mitochondria and tumor progression in ulcerative colitis. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**(16), 1239–1248.
 108. D'Errico I., Salvatore L., Murzilli S., Lo Sasso G., Latorre D., Martelli N., Egorova A.V., Polishuck R., Madeyski-Bengtson K., Lelliott C., Vidal-Puig A.J., Seibel P., Villani G., Moschetta A. (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1- α (PGC1 α) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(16), 6603–6608.

The Role of Mitochondrial in Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction during Inflammatory Bowel Disease

D. A. Chernyavskij¹, I. I. Galkin², A. N. Pavlyuchenkova^{1,2}, A. V. Fedorov³, and M. A. Chelombitko^{2,4,*}

¹Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

³Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

⁴The “Russian Clinical Research Center for Gerontology”, Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 129226 Russia

*e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru

Inflammatory bowel diseases are widely spread in industrial countries with every 20th citizen being affected. Dysregulation of epithelial barrier function is considered to play a key role in the development of inflammatory bowel diseases. Intestinal epithelium permeability depends mostly on the condition of intercellular contacts and epithelial cells' renewal ability. Mitochondria participate in the regulation of various intracellular processes besides performing the energetic function. Recent data indicate the potential role of mitochondria in intestinal epithelial barrier regulation and inflammatory bowel diseases onset. Mitochondrial dysfunction may be one of the reasons for disruption of the structure of tight junctions and the cytoskeleton of intestinal epithelial cells, as well as a decrease in the ability of the epithelial lining to self-renewal. All this leads to a decrease in the barrier function of the intestinal epithelium and the development of inflammatory bowel diseases. Nevertheless, the mechanisms of these processes are still unclear and further research is required.

Keywords: intestinal epithelium, mitochondria, inflammatory bowel diseases, reactive oxygen species, antioxidants

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 577.164.16

РЕДОКС-КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОБАЛАМИНОВ

© 2023 г. Ю. В. Шаталин^a, *, В. С. Шубина^a, М. Е. Соловьева^a, В. С. Акатов^a

^aИнститут теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: yury.shatalin@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.05.2023 г.

После доработки 17.05.2023 г.

Принята к публикации 18.05.2023 г.

Витамин В12, или кобаламин, жизненно необходимый для функционирования организма, используется в терапии дефицитных состояний. Витамин В12 обладает противовоспалительными и антиоксидантными свойствами, что может играть важную роль в предотвращении ряда заболеваний. При этом в комбинации с такими восстановителями, как аскорбат (витамин С) и тиолы, витамин В12 проявляет прооксидантную активность. В представленном обзоре рассмотрена роль витамина В12 в патогенезе заболеваний, сопровождающихся воспалением и окислительным стрессом, а также влияние этого витамина в отдельности и в сочетании с различными восстановителями, такими как аскорбат и тиолы, на развитие окислительного стресса. Обсуждаются механизмы прооксидантного действия сочетаний разных форм кобаламина (цианокобаламин, гидроксокобаламин) с восстановителями, понимание которых необходимо для разработки стратегий применения В12 в медицине.

Ключевые слова: гидроксокобаламин, цианокобаламин, окисление тиолов, активные формы кислорода, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S0026898423060174, **EDN:** QIFDSC

ВВЕДЕНИЕ

Витамином В12 называют группу структурно-близких соединений, известных также как кобаламины. В основе структуры этих комплексных соединений находится корриновый цикл и координационно связанный с ним ион кобальта. Метилкобаламин и аденозилкобаламин млекопитающих являются кофакторами таких метаболически важных ферментов, как метионинсинтаза и метилмалонил-КоА-мутаза соответственно. Цитозольная метионинсинтаза катализирует перенос метильной группы от N⁵-метилтетрагидрофолата на гомоцистеин с образованием метионина и тетрагидрофолата, который играет важную роль в метаболизме аминокислот и нуклеотидов. В частности, он участвует в синтезе пуринов и пиримидина тимина, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот. Метилмалонил-КоА-мутаза — фермент митохондриального матрикса, катализирует важнейшую биохимическую реакцию в метаболизме аминокислот и жирных кислот — изомеризацию метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА. Сукцинил-КоА, важный интермедиат цикла Кребса, является предшественником дельта-аминолевулиновой кислоты, необходимой для синтеза порфиринов и, соответственно, гемоглобина. Дефицит кобаламина способен приводить к возникновению различных патологических состояний, в том числе неврологических, психиат-

рических и гематологических. Идентифицированы генетические дефекты, приводящие к нарушению работы кобаламинзависимых ферментов, а также белков, участвующих в транспорте и метаболизме кобаламинов. При дефиците В12, а также при генетических заболеваниях с установленной В12-зависимой формой, необходимо проведение заместительной терапии. Недавно было установлено, что введение кобаламина может оказывать положительное влияние на организм при развитии некоторых воспалительных заболеваний, сопровождающихся развитием окислительного стресса [1–4], при которых наблюдается увеличение в плазме крови уровня транскобаламина (белка, транспортирующего кобаламин) и рецепторов, ответственных за его транспорт в клетки, что указывает на связь между кобаламином и ответом клеток на воспалительный процесс [5, 6]. С другой стороны, некоторые генетические заболевания, в частности метилмалоновая ацидемия и гомоцистинурия типа С (cblC), связаны с нарушениями метаболизма кобаламинов, которые приводят к развитию окислительного стресса [7]. Развитие окислительного стресса у больных cblC, по-видимому, может быть связано с присущей кобаламинам тиолоксидазной активностью, подавляемой в нормальных клеточных условиях [7]. Имеются также сведения о прооксидантной активности кобаламина в сочетании с такими восстановителями, как тиолы и аскорбат, о зависи-

мости этой активности от формы кобаламинов (цианокобаламин, гидроксокобаламин) [8]. Понимание механизмов прооксидантного действия витамина В12 необходимо для разработки стратегий его применения в терапии различных заболеваний, особенно в больших дозах. В нашем обзоре приведены сведения о роли витамина В12 в заболеваниях, связанных с воспалением и окислительным стрессом, о влиянии на окислительный стресс как самого витамина В12, так и его комбинаций с различными восстановителями, а также о механизмах прооксидантного действия сочетаний витамина В12 с восстановителями.

СТРУКТУРА КОБАЛАМИНОВ

Все формы витамина В12 представляют собой комплексы на основе корринового цикла, состоящего из четырех пиррольных групп, две из которых напрямую связаны друг с другом, а две другие соединены метиновыми мостиками (рис. 1). В центре корринового цикла координируется ион кобальта, связанный с четырьмя атомами азота в пиррольном кольце и способный формировать дополнительные связи на нижней и верхней поверхности корринового кольца (аксиальные положения). Образование координационной связи в этих положениях зависит от окислительно-восстановительного состояния иона кобальта, а также от окружающих условий. В восстановленном состоянии кобальт(I) в кобаламине имеет координационное число, равное 4, тогда как кобальт(II) и кобальт(III), преимущественно пяти- и шести-координированные, содержат в составе кобаламина один и два аксиальных лиганда соответственно. Нижнее аксиальное положение (α -положение) в кобаламине занято атомом азота 5,6-диметилбензимидазола (Bzm), ковалентно связанного с корриновым циклом. В зависимости от pH, температуры и окружения Bzm может диссоциировать. В соответствии с тем, формирует ли Bzm связь Co-N или нет, различают две конформации кобаламина, “base-on” и “base-off” соответственно. Верхнее аксиальное положение (β -положение) может быть занято цианидом (CN^-), водой (H_2O или HO^- в зависимости от pH), 5'-дезоксиаденозином или метильной группой, а также некоторыми другими лигандами.

В организме кобаламин находится преимущественно в форме метилкобаламина (MeCbl), аденозилкобаламина (AdoCbl) и гидроксокобаламина (HOCbl) [9]. Как уже упоминалось, MeCbl и AdoCbl являются кофакторами метионинсинтазы и метилмалонил-КоА-мутаза, соответственно, тогда как HOCbl — это промежуточный продукт, образующийся в ходе метаболизма кобаламинов. При физиологических значениях pH MeCbl и AdoCbl являются нейтральными соединениями, тогда как между формами HOCbl и H_2OCbl^+ в растворах устанавливается равновесие ($\text{p}K_a \approx 7.8$ [10]).

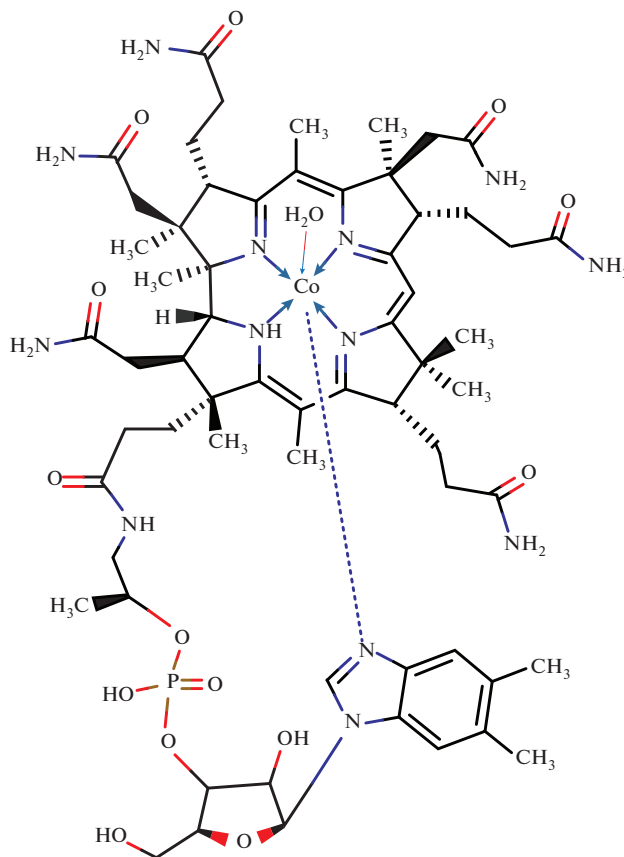


Рис. 1. Структура аквакобаламина.

Из этих соединений наиболее прочную связь с ионом кобальта формирует метильная группа в MeCbl, тогда как молекула воды в H_2OCbl^+ формирует самую слабую координационную связь и ее можно легко заместить другими лигандами [10–13]. Промежуточное соединение глутатионилкобаламин (GSCbl), образующееся в клетке, служит, вероятно, предшественником синтезируемых *de novo* мембраносвязанных MeCbl и AdoCbl [14–16]. Сообщается также о возможном формировании сульфиткобаламина (SO_3Cbl) в процессе метаболизма кобаламинов [11]. CNCbl является синтетической формой. Связь Co-CN чрезвычайно прочна. Константа связывания цианида с аквакобаламином составляет 10^{12} M^{-1} [17], что указывает на малую вероятность диссоциации иона цианида при взаимодействии свободного цианокобаламина с различными лигандами.

АБСОРБЦИЯ И ТРАНСПОРТ КОБАЛАМИНА

Витамин В12 содержится в продуктах животного происхождения, таких как печень, мясо, яйца и молоко, и полностью отсутствует в растениях. В желудке комплексы кобаламина с компонентами пищи разрушаются под действием пепсина и соляной кислоты, высвобождаемый при этом кобаламин связывается с одним из первых белков-пере-

носчиков — гаптокоррином. Этот белок вырабатывается слюнными железами и препятствует деградации кобаламина в желудочном соке, имеющем кислую реакцию [18, 19]. Попадая в двенадцатиперстную кишку, гаптокоррин деградирует, а В12 связывается с внутренним фактором (IF), или фактором Касла, синтезируемым париетальными клетками желудка. Далее комплекс IF-витамин В12 абсорбируется энтероцитами в терминальном отделе подвздошной кишки путем рецепторопосредованного эндоцитоза (кубам-рецептор). Здесь, в энтероцитах, комплекс попадает в лизосомы, где IF деградирует, а кобаламин выходит из лизосом. После этого кобаламин высвобождается через базолатеральную мембрану энтероцитов и попадает в кровоток. По всей видимости, этот процесс протекает при участии белка множественной лекарственной устойчивости-1 (MDR1) [11, 19]. В кровеносном русле кобаламин также находится в связанном состоянии. Около 20% кобаламина связываются с транскобаламином, белком, участвующим в переносе кобаламина по кровеносному руслу к клеткам и тканям организма [18, 20, 21], тогда как 80% кобаламина связываются с гаптокоррином. Примечательно, что данная фракция считается метаболически неактивной, рецепторы к гаптокоррину обнаружены только в печени.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ И ОБРАЗОВАНИЕ КОФЕРМЕНТНЫХ ФОРМ

В клетки кобаламин попадает в составе комплекса с транскобаламином при участии рецепторов CD320. По всей видимости, существуют и другие рецепторы транскобаламина, однако на данный момент они еще не идентифицированы [18]. Попадая в лизосомы, транскобаламин деградирует, а кобаламин высвобождается в цитозоль с помощью мембраносвязанных транспортеров LMBD1 (ген *cbfF*) и ABCD4 (ген *cbfJ*). В цитозоле кобаламины связываются с цитозольным шапероном MMACHC (белок метилмалоновой ацидурии и гомоцистинурии типа C), также называемым CblC (ген *cbfC*). MMACHC опосредует деалкилирование AdoCbl и MeCbl, а также деацилирование CNCbl и удаление OH-группы HOCbl. В процессе деалкилирования MMACHC проявляет глутатионтрансферазную активность, катализируя реакцию нуклеофильного замещения алкильной группы тиолат-анионом глутатиона. Деацилирование протекает с участием восстановленного флавина (FADH₂ или FMNH₂) в качестве кофактора и NADPH в качестве косубстрата. Глутатион (GSH) также вовлечен в деацилирование CNCbl и удаление OH-группы HOCbl в анаэробных условиях. Независимо от того, какая из перечисленных реакций протекает с участием MMACHC, “на выходе” формируется промежуточный продукт — коб(II)аламин.

Таким образом, любая форма витамина В12, поступающая в организм, в том числе AdoCbl и

MeCbl, в клетке теряет свой β-аксиальный лиганд, что говорит о том, что вводимые AdoCbl и MeCbl не могут напрямую использоваться метилмалонил-КоА-мутазой и метионинсинтазой соответственно.

Дальнейшая судьба коб(II)аламина связана с белком MMADHC (ген *cbfD*), функции которого до конца не установлены [18]. Считается, что MMADHC играет важную роль в регуляции биосинтеза обеих коферментных форм кобаламина (AdoCbl и MeCbl). При участии данного белка коб(II)аламин либо направляется в митохондрии для последующего биосинтеза AdoCbl, либо остается в цитозоле, где происходит образование MeCbl. В митохондриях белок CblB катализирует образование AdoCbl, который в дальнейшем переносится на метилмалонил-КоА-мутазу [22]. В данный процесс также вовлечен белок CblA, предположительно контролирующий связывание и удерживание образованного AdoCbl мутазой [22]. В цитозоле формирование MeCbl происходит при помощи метионинсинтазы-редуктазы (MTRR (ген *cbfE*)), которая непосредственно взаимодействует с метионинсинтазой (MTR, ген *cbfG*) [20]. Предполагается, что MeCbl может формироваться при участии мультибелкового комплекса, в состав которого входят, как минимум, MMACHC, MMADHC, MTRR и MTR [23].

Важно отметить, что известно несколько наследственных заболеваний, связанных с мутациями в генах, кодирующих белки, участвующие в транспорте и метаболизме кобаламинов (метилмалоновая ацидурия и гомоцистинурия, формы *cblA*–*cblJ*) [18, 19].

ДЕФИЦИТ КОБАЛАМИНА

Дефицит витамина В12 обычно обусловлен его недостаточным поступлением с пищей или нарушением всасывания в кишечнике [18]. Кратко остановимся на некоторых из основных причин дефицита кобаламина, рассмотренных в [18, 24]. В частности, причиной нарушения всасывания кобаламина могут быть:

1. Прекращение секреции IF-фактора, которое может быть связано с аутоиммунным заболеванием или хирургическим вмешательством (частичная или полная гастрэктомия).

2. Заболевания и прием лекарственных средств, приводящих к изменению секреции или pH желудочного сока. В качестве примера таких заболеваний можно привести хронический атрофический гастрит, характеризующийся уменьшением количества клеток, продуцирующих соляную кислоту и пепсин. Среди препаратов можно выделить ингибиторы протонной помпы, антагонисты рецептора 2 гистамина и антацидные средства. Недостаточное количество соляной кислоты или низкая активность пепсина приводят к тому, что В12 не высвобождается из комплексов с

компонентами пищи, в результате чего нарушается его всасывание.

3. Заболевания поджелудочной железы или панкреатэктомия: В12 не высвобождается из гапторринового комплекса из-за недостаточной активности ферментов поджелудочной железы.

4. Воспалительные заболевания кишечника, приводящие к нарушению всасывания В12 (болезнь Крона, целиакия, резекция подвздошной кишки).

5. Паразитарные инфекции (*Diphyllobothrium latum* и *Giardia lamblia*).

6. Некоторые лекарственные препараты, влияющие на всасывание или метаболизм витамина В12 (холестирамин (колестирамин), метформин).

Существуют также генетические дефекты, приводящие к нарушению работы кобаламинзависимых ферментов, а также белков, участвующих в транспорте и метаболизме кобаламина [18]. В последнем случае функциональный дефицит кобаламина также приводит к инактивации метионинсинтазы и метилмалонил-КоА-мутаза.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ КОБАЛАМИНА

В большинстве случаев для лечения и профилактики дефицита В12 используют гидроксокобаламин (НОСbl) или цианокобаламин (СНСbl) [9, 25, 26]. НОСbl биоидентичен форме В12, которая образуется в организме человека, тогда как СНСbl, напротив, является синтетической формой. Между тем, впервые витамин В12 удалось выделить именно в форме СНСbl, и он получил широкое распространение для лечения дефицита витамина В12. СНСbl более стабилен, чем остальные формы кобаламина, его легче получить, а сам процесс получения экономически более выгоден, что способствует широкому использованию СНСbl в качестве биологически активной добавки (витаминов) и для обогащения пищевых продуктов [26]. В России для лечения дефицита В12 применяют только СНСbl [27], тогда как в некоторых странах (Великобритания и др.) НОСbl полностью заменил СНСbl в качестве препарата первого выбора для заместительной терапии [25, 26]. В основном это обусловлено более длительным временем удерживания НОСbl в организме, что позволяет использовать его через большие интервалы времени по сравнению с СНСbl [25].

Следует отметить, что НОСbl может использоваться также при заболеваниях, не связанных с дефицитом витамина В12 (атрофия зрительного нерва Лебера и токсическая амблиопия) [25].

Благодаря способности прочно связывать цианид-ионы, НОСbl применяют в качестве антидота при отравлениях цианидом [9, 25]. В этом случае НОСbl вводят в чрезвычайно высоких дозах (5–10 г внутривенно [28]), а его концентрация в плазме может достигать нескольких сотен микромолей (267–1011 мкМ [29]). В норме кон-

центрация кобаламина, находящегося в связанном с белком состоянии, составляет 0.17–0.92 нМ.

Помимо этого, высокие дозы гидроксокобаламина рассматривают в качестве средства спасения при развитии рефрактерного вазоплегического шока, потенциально опасного для жизни осложнения после операции на сердце [30].

Введение витамина В12 необходимо при заболеваниях с установленной В12-зависимой формой [21], в частности, при таких орфанных заболеваниях, как метилмалоновая ацидемия и гомоцистинурия типа С (cblC). Важно, что СНСbl не эффективен при заболевании cblC, тогда как пациенты отвечают на применение высоких доз НОСbl [7, 31–36]. В отдельных случаях для достижения оптимального метаболического ответа необходимо, чтобы концентрация НОСbl в сыворотке крови приближалась к микромолярным величинам [35, 37, 38]. Лечение таких больных может длиться несколько месяцев [35, 39], при этом последствия длительной терапии высокими дозами НОСbl не исследованы должным образом [37].

ВИТАМИН В12 И ЗАБОЛЕВАНИЯ, СОПРОВОЖДАЮЩИЕСЯ ВОСПАЛЕНИЕМ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

Показано, что кобаламин положительно влияет на организм при развитии некоторых воспалительных заболеваний, сопровождающихся развитием окислительного стресса [1–3]. В свою очередь, при воспалительных заболеваниях наблюдается увеличение уровня транскобаламина (белка, транспортирующего кобаламин) в плазме крови и рецепторов, ответственных за его транспорт в клетки [5, 6], что предполагает связь между кобаламином и ответом клеток на воспаление. Кобаламины способны модулировать иммунный ответ и влиять на продукцию цитокинов и факторов роста [40–42]. На животных моделях показано, что дефицит витамина В12 приводит к снижению иммунного ответа на вирусную и бактериальную инфекцию [43, 44]. У пациентов с тяжелым дефицитом витамина В12 наблюдается снижение числа CD8+ лимфоцитов (что приводит к нарушению нормального соотношения CD4/CD8) и активности NK-клеток. Лечение кобаламином позволяет, по меньшей мере частично, нормализовать соотношение CD4/CD8. После введения этого витамина число клеток субпопуляции CD8+ увеличивается и в контрольной группе [41]. Введение кобаламина нормализует уровень фактора некроза опухоли (TNF α) и эпидермального фактора роста (EGF) у пациентов с дефицитом витамина В12 [40, 42]. Кобаламин подавляет продукцию фактора транскрипции NF- κ B [42].

В настоящее время НОСbl проходит вторую фазу клинических исследований [4], оценивается возможность применения высоких доз НОСbl (5 г) при септическом шоке. Хотя исследование еще не

завершено, установлено, что введение НОСbI приводит к снижению уровня H_2S [4]. Увеличение синтеза H_2S наблюдается при сепсисе и рассматривается как один из факторов, способствующих развитию вазоплегического шока [4, 45]. Введение кобаламина приводит также к снижению дозы вазопрессорного препарата (норадреналин) [4].

Витамин В12 и окислительный стресс

Получены данные, свидетельствующие о том, что дефицит витамина В12 может сопровождаться развитием окислительного стресса [46]. В частности, на это указывают результаты изучения маркеров окислительного стресса у больных с неврологическими проявлениями при дефиците витамина В12 (<211 пг/мл) [46]. Установлено, что витамин В12 может выполнять защитные функции в условиях окислительного стресса [47]. Так, пероральный прием витамина В12 (CNCbI) в высоких дозах уменьшает ишемическое и реперфузионное повреждение почки мыши [47]. Как известно, окислительный стресс и воспаление — два взаимосвязанных процесса, которые играют ключевую роль в ишемическом и реперфузионном повреждении ткани [48]. Прием высоких доз CNCbI приводит к практически полному восстановлению функций и морфологии почек. Отмечено снижение маркеров воспаления, апоптоза и фиброза, повреждений ДНК, индуцированных ишемией/реперфузией, а также продукции супероксид-аниона в почках на фоне приема витамина В12. Кроме того, обнаружено, что прием CNCbI приводит к восстановлению уровней мРНК генов *Gpx1* (глутатионпероксидаза 1), *Sod1* и *Sod2* (супероксид-дисмутаза 1 и 2), снижающихся после ишемии/реперфузии, а также к снижению уровня мРНК гена *Nox2* (NADPH-оксидаза 2), повышенного после ишемии/реперфузии [47]. Таким образом, можно считать, что механизмы, лежащие в основе нефропротекторного действия CNCbI, довольно сложны и могут включать в себя увеличение активности антиоксидантных систем (глутатионпероксидаза, супероксид-дисмутаза) и снижение накопления супероксид-аниона как за счет воздействия на его генерацию посредством *Nox2*, так и за счет непосредственного взаимодействия коб(II)аламина с супероксид-анионом [47].

Важно отметить развитие окислительного стресса при некоторых генетических заболеваниях, связанных с нарушениями метаболизма кобаламинов. В частности, это отмечено при таких орфанных заболеваниях, как метилмалоновая ацидемия и гомоцистинурия типа С (cblC) [7, 49]. Дефекты CblC (ген *cblC*) приводят к нарушению превращения витамина В12 в его коферментные формы (MeCbl и AdCbl) [50, 51]. Функциональный дефицит MeCbl и AdCbl приводит к инактивации кобаламинзависимых ферментов и накоплению гомоцистеина и метилмалоновой кисло-

ты. Как уже упоминалось, CNCbI не эффективен при cblC [31, 32], тогда как пациенты отвечают на лечение высокими дозами НОСbI [31–36], в результате которого увеличивается активность обоих кобаламинзависимых ферментов. Причина различий в результатах лечения препаратами НОСbI и CNCbI до сих пор остается неясной. Между тем, у пациентов с cblC, получающих высокие дозы НОСbI, наблюдается развитие окислительного стресса, истощение пула глутатиона и цистеина [7]. Это позволяет предположить, что в основе развития окислительного стресса может лежать способность НОСbI катализировать окисление серосодержащих соединений, сопровождающееся продукцией АФК. Примечательно, что патологические варианты CblC (R161G/Q) проявляют тиолоксидазную активность, подавленную в CblC дикого типа [49, 52]. Данные мутанты окисляют GSH и восстанавливают растворенный кислород до супероксид-аниона. Принимая во внимание вышесказанное, можно предположить, что при дефектах CblC окисление GSH кобаламинами может опосредоваться мутантным CblC и/или (при лечении высокими дозами НОСbI) происходить спонтанно. В обоих случаях данный окислительно-восстановительный процесс сопровождается продукцией АФК и может вносить вклад в развитие окислительного стресса и истощение пула глутатиона и цистеина у пациентов с cblC, получающих высокие дозы гидроксокобаламина [7].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что кобаламины способны модулировать развитие окислительного стресса. Однако молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе их модулирующего действия, не установлены и требуют дальнейшего изучения.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОБАЛАМИНОВ И ИХ КОМБИНАЦИЙ С ВОССТАНОВИТЕЛЯМИ (АСКОРБАТ, ТИОЛЫ)

Исследования *in vitro* показали, что CNCbI способен защищать от гибели клетки проксимальных канальцев почки, подвергнутые гипоксии/реперфузии. В присутствии CNCbI снижалась также генерация АФК [47]. Установлено, что кобаламины (НОСbI, CNCbI, MeCbl) в комбинации с такими тиолами, как GSH и *N*-ацетилцистеин (NAC), а также их тиолатокобаламиновые комплексы способны защищать клетки линии Sk-Nep-1 от окислительного повреждения, вызванного добавкой экзогенного пероксида водорода или гомоцистеина [53]. Установлено, что тиолатокобаламины существенно более эффективны, чем сами тиолы или тиолы в комбинации с кобаламинами. Тиолатокобаламины проявляют высокую антиоксидантную активность и могут рассматриваться в качестве средств, способных подавлять окислительный стресс [53].

С другой стороны, результаты, полученные ранее в нашей лаборатории, показали, что комбинация HOCbl с аскорбиновой кислотой, GSH , NAC и дитиотреитолом (DTT) оказывает цитотоксическое действие на клетки линий HEp-2 [54, 55] и MCF-7 [8]. Окисление ряда тиолов и аскорбиновой кислоты катализируется HOCbl и сопровождается накоплением пероксида водорода в культуральной среде [54, 55]. На ключевую роль пероксида водорода в цитотоксическом действии использованных комбинаций указывает способность каталазы полностью предотвращать накопление H_2O_2 и клеточную гибель. Недавно нами было показано, что цитотоксическое действие кобаламинов в комбинации с отдельными соединениями или отсутствие такого действия зависит от формы кобаламина [8]. В частности, цитотоксический эффект вызывает комбинация аскорбиновой кислоты с HOCbl , но не с CNCbl [8]. Согласно нашим данным, это связано с существенно более высокой скоростью окисления аскорбата в присутствии HOCbl , в результате которого наблюдается накопление пероксида водорода в культуральной среде. Кроме того, в присутствии HOCbl (но не CNCbl) существенно увеличивалось цитотоксическое действие еще одного серосодержащего соединения — диэтилдитиокарбамата (DDC). В этом случае каталаза лишь частично предотвращала цитотоксическое действие данной комбинации, и накопление H_2O_2 в среде не было зарегистрировано. Согласно нашим данным, основными продуктами реакции DDC с HOCbl являются дисульфиды и его окисленные формы, сульфоны и сульфоксиды [56]. Вероятно, АФК, формирующиеся в процессе окисления DDC , катализируемого HOCbl , быстро превращаются в активные формы серы. Важно, что гибель клеток (HEp-2 , A431 , A549), индуцированная комбинацией $\text{DDC} + \text{HOCbl}$, отличалась от апоптоза, аутофагии и некроза [57]. Обнаружено развитие тяжелого стресса эндоплазматического ретикулума, экстенсивная вакуолизация эндоплазматического ретикулума, приводящая к индукции параптозоподобной клеточной гибели [57, 58]. Кратковременная инкубация клеток рака молочной железы (линия клеток MCF-7) с активными формами серы переключала регулируемую форму гибели на энтоз (взаимное поглощение/уничтожение клеток) в половине популяции [57, 58]. В свою очередь, комбинации HOCbl с GSH , NAC , DTT и аскорбиновой кислотой приводили к апоптотической гибели опухолевых клеток [54, 55].

Таким образом, существующие данные указывают на то, что окислительно-восстановительные реакции, в которые вовлечены кобаламины, способны приводить как к накоплению, так и к элиминированию АФК и, по всей видимости, активных форм серы. Вопрос о том, какие активные формы серы наиболее токсичны для клеток, требует дальнейшего изучения.

МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КОБАЛАМИНОВ

Взаимодействия кобаламинов с высоко- и низкомолекулярными серосодержащими соединениями, в том числе с тиолами, представляют важную часть их окислительно-восстановительной и координационной химии в норме и при патологии [11, 59–62]. Известно, что кобаламины катализируют реакции окисления серосодержащих соединений, включая тиолы. В ходе этих реакций образуются АФК. В частности, кобаламин-катализируемое окисление 2-меркаптоэтанола и дитиотреитола приводит к образованию пероксида водорода и дисульфидов [63]. В результате аквакобаламин-катализируемого окисления 2-меркаптоэтанола формируется супероксид-анион [64]. Недавно методом люминол-зависимой хемилюминесценции нами было показано образование АФК в процессе кобаламин-катализируемого окисления GSH , NAC , DTT и 2-нитро-5-тиобензоата (TNB). Каталитической активностью обладали как $\text{H}_2\text{OCbl}^+/\text{HOCbl}$, так и CNCbl [8]. Согласно существующим данным, координированная вода в аквакобаламине может быть легко замещена другими лигандами [10–13], в отличие от цианогруппы в цианокобаламине, которая формирует прочную связь Co-CN [17]. Следовательно, окисление серосодержащих соединений может протекать по разным механизмам (подробно механизмы рассмотрены в [8]). Кратко, в H_2OCbl^+ происходит координация тиола/тиолат-аниона атомом серы к иону кобальта в β -аксиальном положении. Далее образуется тиильный радикал (схема 1) и тиолатокоб(II)аламин. Тиильный радикал претерпевает дальнейшие превращения, в ходе которых образуется дисульфид, а тиолатокоб(II)аламин окисляется растворенным кислородом, что приводит к образованию супероксид-аниона и регенерации тиолатокоб(III)аламина в системе. Наиболее вероятно, что в CNCbl лиганд координируется к иону кобальта в α -аксиальном положении (схема 1). В результате одноэлектронного переноса далее формируется тиильный радикал и, вероятно, комплекс Cbl(II)CN^- (схема 1). Последующее окисление кобальта растворенным кислородом приводит к образованию супероксид-аниона и регенерации цианокобаламина в системе. Тиильный радикал далее превращается в дисульфид. Главное отличие между реакциями тиолов с CNCbl и $\text{H}_2\text{OCbl}^+/\text{HOCbl}$ состоит в том, что последний способен образовывать устойчивые тиолатокобаламиновые комплексы, вероятно, способные взаимодействовать с супероксид-анионом и пероксидом водорода, приводя к их элиминированию. Важно отметить, что в процессе окислительно-восстановительных реакций $\text{H}_2\text{OCbl}^+/\text{HOCbl}$ восстанавливается до коб(II)аламина, который, как показано, спосо-

бен напрямую взаимодействовать с супероксид-анионом и пероксидом водорода [65, 66]. Если же в ходе окисления тиолов формируются неустойчивые комплексы тиолатокобаламинов, то, вероятно, супероксид-анион восстанавливается коб(II)аламином до H_2O_2 . Скорость взаимодействия супероксид-аниона с коб(II)аламином сопоставима со скоростью дисмутации суперок-

сида под действием супероксид-дисмутазы ($7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ у коб(II)аламина в сравнении с $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ у супероксид-дисмутазы) [66], что указывает на способность коб(II)аламина эффективно улавливать супероксид-анион, по всей видимости, не только в модельных, но и в биологических системах.

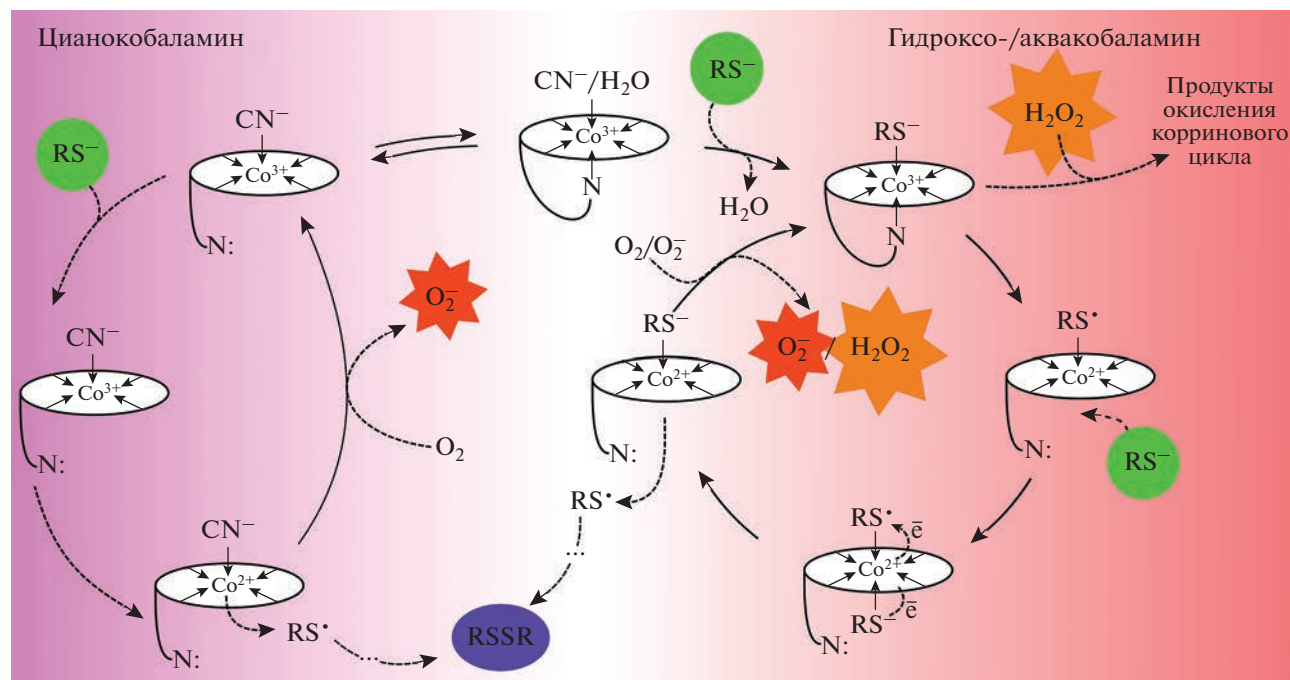


Схема 1. Схематическое представление катализируемого кобаламином окисления тиолов. Тиолы окисляются до дисульфидов. Окисление сопровождается продукцией супероксид-аниона. В случае H_2O_2 или H_2O_2 -катализируемого окисления тиолов, $O_2^{\cdot -}$, по всей видимости, восстанавливается комплексами тиолатокоб(II)аламина до H_2O_2 .

В условиях *in vivo* в составе ферментативных комплексов, таких, например, как метионинсинтаза, кобаламин восстанавливается до коб(I)аламина, что играет важную физиологическую роль. Коб(I)аламин является сильным восстановителем, способным взаимодействовать с соединениями серы в моделируемых условиях [67]. Однако отсутствуют прямые экспериментальные подтверждения наличия свободного коб(I)аламина в условиях *in vivo*. По-видимому, это связано с низким электрохимическим потенциалом восстановления $Co(II)$ до $Co(I)$. По всей видимости, в условиях *in vivo* этот процесс протекает только в составе ферментативных комплексов, в которых происходит ослабление аксиальных взаимодействий и, как результат, увеличивается окислительно-восстановительный потенциал реакции: $Co(II) \rightarrow Co(I)$ [67].

Хотя в результате кобаламин-катализируемого окисления тиолов формируются дисульфиды,

окисление других серосодержащих соединений может приводить к формированию активных форм серы. В частности, катализируемое кобаламином окисление DDC приводит к образованию дисульфирама и его окисленных производных, сульфонов и сульфоксидов [56]. Таким образом, превращения радикальных форм, возникающих в результате кобаламин-катализируемого окисления серосодержащих соединений, на данный момент остаются неясными.

Наиболее вероятно, что в условиях низкой концентрации тиола ($\sim 100 \text{ мкМ}$) и нормального содержания кислорода (260 мкМ) во внеклеточном пространстве тиольные радикалы будут преимущественно реагировать с кислородом (схема 2, путь 1) с контролируемой диффузией скоростью с образованием тиопероксидных радикалов ($RSOO^{\cdot}$) [68, 69]. Это связано с тем, что константы скоростей прямой реакции глутатионильного и цистеинильного радикалов с кислородом на по-

рядок превышают константы скоростей взаимодействия этих радикалов с тиолами (табл. 1). Образующиеся тиопероксильные радикалы могут далее распадаться до исходных реагентов с константой скорости 10^5 с^{-1} [68, 69], самоконденсироваться с образованием соответствующего дисульфида и, предположительно, синглетного кислорода [69] (схема 2, путь 2) или, что более вероятно, реагировать с другим тиолом с образованием сульфеновой кислоты и сульфинильного радикала ($\text{RSO}^\bullet$) с константой скорости $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [70] (схема 2, путь 3). Высокореакционный сульфенил-радикал может взаимодействовать с тиолами (схема 2, путь 4) с образованием сульфеновой кислоты и тиильного радикала [71]. Далее сульфеновая кислота, в зависимости от условий, может реагировать с тиолом с образованием дисульфида (схема 2, путь 5) [72, 73], подвергаться окислению

супероксид-анионом или пероксильным радикалом (схема 2, путь 6), пероксидом водорода (схема 2, путь 7) [74] или самоконденсироваться до тиосульфата (схема 2, путь 8). Эти реакции зарегистрированы в моделируемых условиях (табл. 1), но, по-видимому, в физиологических условиях окисление тиолов останавливается на стадии образования дисульфида. Несмотря на высокую скорость взаимодействия тиильного радикала (путь 1) и сульфеновой кислоты (путь 6) с супероксид-анионом, уровень АФК, образующихся в цикле окисления-восстановления кобаламина, сохраняется на протяжении длительного времени, а образование АФК имеет сложную кинетику [75]. Эти данные позволяют предположить, что окисление тиолов идет сразу по нескольким направлениям.

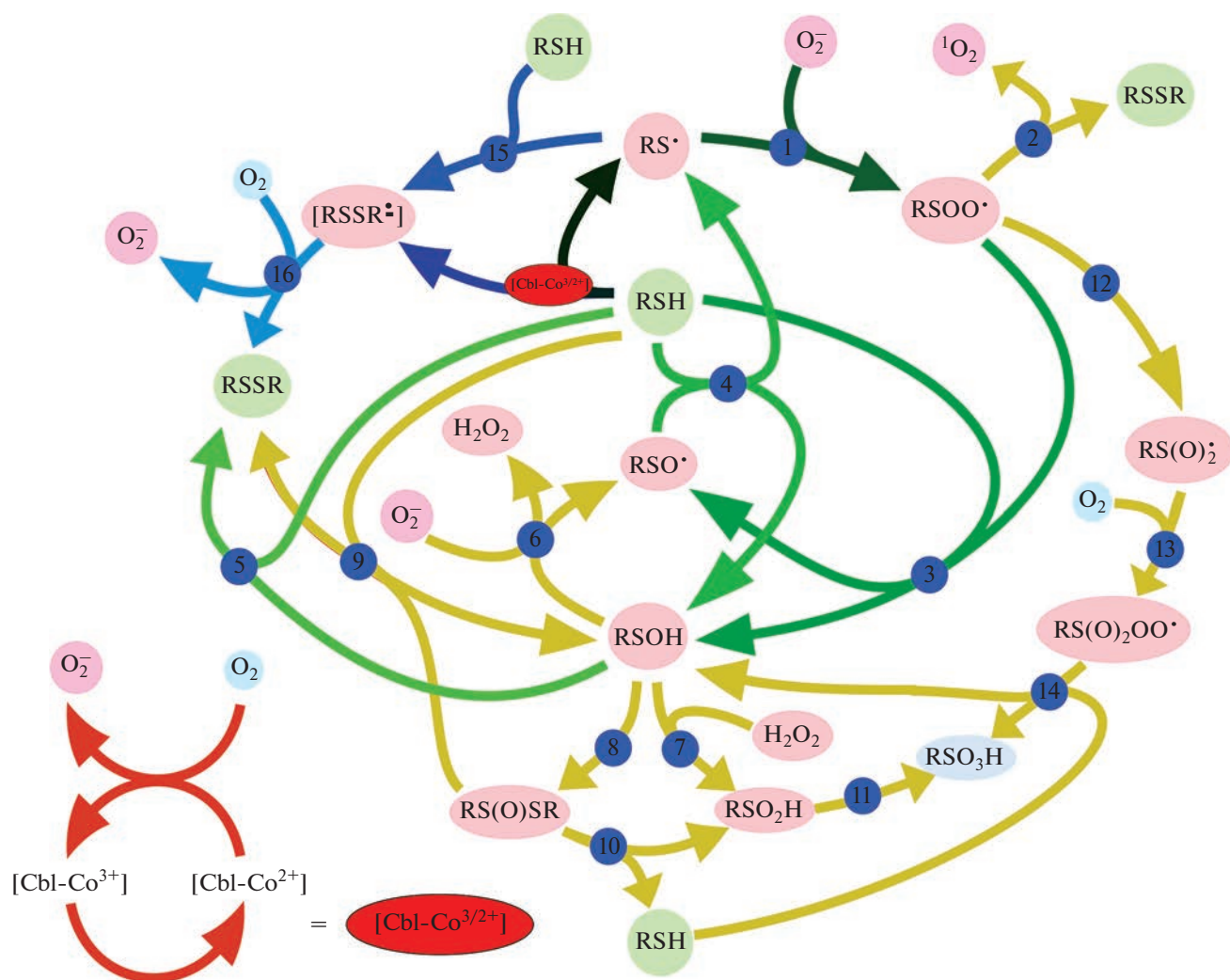


Схема 2. Схематическое представление вероятных путей превращения радикальных форм, формирующихся в результате катализируемого кобаламином окисления тиолов. Цифрами обозначены пути превращений сульфопродуктов; их описание приведено в тексте.

Альтернативные пути окисления серосодержащих соединений включают образование тиосульфатов, тиосульфонов, дисульфоксидов, сульфеновой и сульфоновой кислот. Тиосульфид является неустойчивым интермедиатом и может восстанавливаться тиолом до дисульфида и сульфеновой кислоты (схема 2, путь 9) [72] или гидролизироваться до сульфеновой кислоты и тиола (схема 2, путь 10) [76]. Сульфеновая кислота окисляется кислородом до сульфоновой кислоты (схема 2, путь 11), аналогично окисляется и сульфенил-радикал (схема 2, пути 13 и 14) [70]. В условиях высокой концентрации тиолов или при реакции дитиолов с кобаламинами тиольный радикал преобразуется в дисульфид-анион-радикал (схема 2, путь 15) [77, 78], окисляющийся растворенным кислородом до дисульфида и супероксидного анион-радикала (схема 2, путь 16) [68]. Согласно приведенным в табл. 1 скоростям реакций, окисление тиолов быстро завершается на стадии образования дисульфида. При этом другим конечным продуктом окисления тиола является сульфеновая кислота. Практически все преобразования сульфопроизводных, за исключением реакций 2 и 16, не связаны с генерацией АФК. На стадиях 6 и 7 происходит даже уменьшение количества супероксид-аниона и пероксида водорода. Остается неясным, при каких условиях возникает окислительный стресс, связанный с нарушением нормальной работы белков, и каковы мишени формирующихся реактивных сульфопроизводных.

Важно также отметить, что в результате метаболических превращений таких биогенных тиолов, как цистеин и глутатион, в организме образуются сероводород, персульфиды, тиосульфаты, сульфиты и другие соединения [79]. Некоторые из этих продуктов обнаружены в плазме крови в норме, в том числе таурин (32.7–80.8 мкМ) и S-сульфоцистеин (0.131–1.7 мкМ) [79].

Необходимо также отметить, что кобаламины способны взаимодействовать не только с тиолами, но и с продуктами их окисления. Как показано недавно, цистеинсульфеновая кислота и гипотаурин способны образовывать комплексы с НОСbI [83]. Эти комплексы характеризуются наличием координационной связи сера-кобальт и более низкой константой связывания по сравнению с тиолатокобаламинами. В частности, константа связывания глутатион-кобаламин составляет 10^9 M^{-1} , тогда как у комплексов цистеин-сульфеновая кислота-кобаламин и гипотаурин-кобаламин эти константы составляют 1.1×10^3 и $6.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ соответственно [83]. Более окисленные лиганды (цистеинсульфеновая кислота и таурин) формируют комплексы с кобаламином только в области слабощелочных значений pH (7.5–9.5) и характеризуются образованием координационной связи Co-N и существенно меньшими значениями констант связывания [83]. Не-

смотря на то, что комплексы окисленных соединений серы с кобаламинами менее устойчивы по сравнению с тиолатокобаламинами, по-видимому, их образование может играть важную роль в накоплении активных форм серы.

Химия окисленных производных серы становится существенно более сложной при взаимодействии с белками, поскольку образующиеся интермедиаты могут стабилизироваться микроокружением. Время жизни большинства низкомолекулярных редокс-активных производных серы составляет несколько секунд [72], тогда как время полураспада сульфеновой группы в окисленном альбумине или других белках возрастает до нескольких минут [84, 85]. Тем не менее, несмотря на высокую реакционную способность окисленных сульфопроизводных и малое время их жизни, накапливаются данные, свидетельствующие об их формировании не только в патологических, но и в нормальных физиологических условиях. Таким образом, белки, содержащие восстановленные тиольные группы в своей структуре, являются потенциальными мишенями активных форм, формирующихся в условиях тиол-опосредованного окислительного стресса.

Окислительная модификация тиольных групп белков

Изучению тиол-опосредованной сигнализации посвящено несколько крупных обзоров [86–88]. Такая сигнализация сопровождается окислительной модификацией тиольных групп, в результате которой образуются дисульфидные связи и нитрозотиолы, а также сульфеновые, сульфеновые и сульфоновые кислоты. Последние две модификации считаются необратимыми [86, 87]. Образование сульфеновой кислоты регистрируется в белках, участвующих в регуляции апоптоза, активации и пролиферации иммунных клеток [89–91]. Сульфеновые группы идентифицированы также в каталитических центрах некоторых ферментов, включая пероксиредоксины (Prx), NADH-пероксидазу и другие [86, 87, 92]. Известно, что остатки цистеина в молекулах некоторых факторов транскрипции (например, NF- κ B, Fos и Jun) и белков, участвующих во внутриклеточной сигнализации и метаболизме (например, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GPDH), глутатионредуктазы (GR), протеин-тирозинфосфатазы (PTP), киназы и протеазы), могут окисляться до сульфеновых групп в условиях *in vitro* [87]. Согласно [93, 94], уровень окисленных тиолов в клетке коррелирует с редокс-потенциалом клеточных компартментов и увеличивается в следующем порядке: митохондрии, цитоскелет, ядро, митохондриальная мембрана, лизосомы, аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум. В последнем компартменте уровень глутатионилированных белков достигает 4.6%, тогда как общее количе-

Таблица 1. Основные окислительно-восстановительные реакции соединений серы

Окислитель	Восстановитель	Продукт(ы)	Скорость реакции	Ссылка
Тиильный радикал (RS [•])	Кислород (O ₂)	Тиопероксил-радикал (RSOO [•])	$k_1 = 1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (глутатион) $k_1 = 8.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (цистеин)	[68, 69]
Тиильный радикал (RS [•])	Тиол (RSH)	Дисульфид-анион-радикал (RSS ^{-•} R)	$k_1 = 8.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (глутатион) $k_1 = 1.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (цистеин)	[77, 78]
Тиильный радикал (RS [•])	Аскорбат	Тиол; Дигидроаскорбат	$k_1 = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (глутатион) $k_1 = 12 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (цистеин)	[75]
Дисульфид-анион-радикал (RSS ^{-•} R)	Кислород (O ₂)	Супероксид-анион	$k_1 = 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (глутатион) $k_1 = 15 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (цистеин)	[68]
Тиопероксил-радикал (RSOO [•])	Тиол (RSH)	Сульфенил-радикал (RSO [•]); Сульфеновая кислота (RSOH)	$k_1 = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (меркаптоэтанол)	[70]
Тиопероксил-радикал (RSOO [•])		Сульфонил-радикал (RS(O)O [•])	$k_1 = 2 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$ (меркаптоэтанол)	[70]
Сульфеновая кислота (RSOH)	Пероксил-радикал (R'OO [•])	Сульфенил-радикал (RSO [•]); Гидроксипероксид (R'OOH)	$k_1 = 3 \times 10^6 \text{ c}^{-1}$ (9-триптиценсульфеновая кислота + пероксил-радикал, 30°C в хлорбензоле)	[80]
Тиосульфат (RS(O)SR)	Тиол (RSH)	Сульфеновая кислота (RSOH); Дисульфид (RSSR)	$k_1 = 3.6\text{--}4.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (цистеин)	[72]
Сульфеновая кислота (RSOH)	Пероксид водорода	Сульфиновая кислота (RS(O)OH)	$k_1 = 0.4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (альбумин) $k_1 = 57 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (пероксиредоксин Prx 1)	[74]
Сульфонил-радикал (RS(O)O [•])	Кислород	Сульфенил пероксилрадикал (RS(O)2OO [•])	$k_1 = 1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (метилсульфонил-радикал)	[81]
Сульфенил-радикал (RSO [•])	Тиол (RSH)	Сульфеновая кислота (RSOH)		[71]
Сульфонил-радикал (RS(O)O [•])/ Сульфиновая кислота (RS(O)OH)	Кислород	Сульфиновая кислота (RS(O) ₂ OH)		[70]
Тиосульфат (RS(O)SR)		Тиол; сульфиновая кислота	$k_1 = 1 \times 10^3 \text{ c}^{-1}$ (тиосульфат цистеина)	[76]
Сульфенил пероксил-радикал (RS(O)2OO [•])	Тиол	Сульфиновая кислота (RS(O) ₃ H); сульфеновая кислота (RSOH)		[82]
Сульфеновая кислота	Тиол	Дисульфид	$k_1 > 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (цистеин)	[72]

ство окисленных белков, содержащих дисульфидные связи, сульфеновые, сульфиновые и нитрозотиольные группы, составляет 16.4%, что больше, чем в остальных компартментах [93, 94]. Таким образом, эндоплазматический ретикулум содержит больше чувствительных к окислению белков. Эти данные также согласуются с полученными нами результатами, согласно которым ключевой стадией окислительного повреждения, индуцированного комбинацией DDC с HOCbl, является ингибирование ряда белков, отвечающих

за посттрансляционную модификацию и ингибирование деубиквитиназы, ассоциированной с ретротранслоконом, локализованным в мембране эндоплазматического ретикулума [58]. Эти процессы приводят к развитию тяжелого стресса эндоплазматического ретикулума, экстенсивной вакуолизации эндоплазматического ретикулума, а также к индукции параптозо-подобной клеточной гибели. В целом, можно предположить, что взаимодействие кобаламинов с серосодержащими лигандами может приводить к окислительному

стрессу опосредованно, через образование активных форм кислорода и серы, способных индуцировать окислительную модификацию белков, что в ряде случаев сопровождается стрессом эндоплазматического ретикула. Однако точные механизмы действия формирующихся активных форм и белковые мишени, вовлеченные в развитие стресса эндоплазматического ретикула, требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Витамин B12 необходим для нормального функционирования организма, а его дефицит приводит к развитию серьезных патологических состояний. Лечение дефицита B12, а также ряда других заболеваний, включает введение данного витамина, в отдельных случаях в довольно высоких дозах. Современные данные указывают на необходимость тщательного выбора формы витамина B12 при терапии B12-зависимых заболеваний, в частности, использования гидроксокобаламина как более эффективного при многих патологиях. Несмотря на противовоспалительные и антиоксидантные свойства, кобаламины способны в определенных условиях индуцировать окислительный стресс. В свою очередь, эффект, который оказывает витамин B12, существенно зависит от используемой формы, что может быть связано с формированием устойчивых тиолатокобаламиновых комплексов в случае гидроксокобаламина. Понимание механизмов прооксидантного действия разных форм витамина B12 в сочетании с серосодержащими соединениями и дальнейших превращений образующихся радикальных форм необходимо для разработки стратегий применения B12 в терапии различных заболеваний.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-01025-23-01 на 2023 г.)

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McCaddon A., Hudson P.R. (2010) *L*-methylfolate, methylcobalamin, and *N*-acetylcysteine in the treatment of Alzheimer's disease-related cognitive decline. *CNS Spectr.* **15**, 2–5.
- Regland B., Forsmark S., Halaouate L., Matousek M., Peilot B., Zachrisson O., Gottfries C.-G. (2015) Response to vitamin B12 and folic acid in myalgic encephalomyelitis and fibromyalgia. *PLoS One.* **10**, e0124648.
- Wheatley C. (2006) A scarlet pimpernel for the resolution of inflammation? The role of supra-therapeutic doses of cobalamin, in the treatment of systemic inflammatory response syndrome (SIRS), sepsis, severe sepsis, and septic or traumatic shock. *Med. Hypotheses.* **67**, 124–142.
- Patel J.J., Willoughby R., Peterson J., Carver T., Zelten J., Markiewicz A., Spiegelhoff K., Hipp L.A., Canales B., Szabo A., Heyland D.K., Stoppe C., Zielonka J., Freed J.K. (2023) High-dose IV hydroxocobalamin (vitamin B12) in septic shock. *Chest.* **163**, 303–312.
- Kalra S., Ahuja R., Mutti E., Veber D., Seetharam S., Scalabrino G., Seetharam B. (2007) Cobalamin-mediated regulation of transcobalamin receptor levels in rat organs. *Arch. Biochem. Biophys.* **463**, 128–132.
- Rothenberg S.P., Quadros E.V., Regec A. 1999. Transcobalamin II. in: *Chemistry and Biochemistry of Vitamin B12*. Ed. Banerjee R. New York: John Wiley & Sons, pp. 441–473.
- Pastore A., Martinelli D., Piemonte F., Tozzi G., Boenzi S., Di Giovamberardino G., Petrillo S., Bertini E., Dionisi-Vici C. (2014) Glutathione metabolism in cobalamin deficiency type C (cblC). *J. Inher. Metab. Dis.* **37**, 125–129.
- Shatalin Y.V., Shubina V.S., Solovieva M.E., Akatov V.S. (2022) Differences in the formation of reactive oxygen species and their cytotoxicity between thiols combined with aqua- and cyanocobalamins. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 11032.
- Brayfield A. (2014) *Martindale: the Complete Drug Reference*. London, UK: PhP, Pharmaceut. Press.
- Xia L., Cregan A.G., Berben L.A., Brasch N.E. (2004) Studies on the formation of glutathionylcobalamin: any free intracellular aquacobalamin is likely to be rapidly and irreversibly converted to glutathionylcobalamin. *Inorg. Chem.* **43**, 6848–6857.
- Wingert V., Mukherjee S., Esser A.J., Behringer S., Tanimowo S., Klenzendorf M., Derevenkov I.A., Makarov S.V., Jacobsen D.W., Spiekerkoetter U., Hannibal L. (2021) Thiolatocobalamins repair the activity of pathogenic variants of the human cobalamin processing enzyme CblC. *Biochimie.* **183**, 108–125.
- Salnikov D.S., Kucherenko P.N., Dereven'kov I.A., Makarov S.V., van Eldik R. (2014) Kinetics and mechanism of the reaction of hydrogen sulfide with cobalamin in aqueous solution. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 852–862.
- Suarez-Moreira E., Hannibal L., Smith C.A., Chavez R.A., Jacobsen D.W., Brasch N.E. (2006) A simple, convenient method to synthesize cobalamins: synthesis of homocysteinecobalamin, *N*-acetylcysteinecobalamin, 2-*N*-acetylamino-2-carbomethoxyethanethiolatocobalamin, sulfitecobalamin and nitrocobalamin. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2003**, 5269–5277.
- Paul C., Brady D.M. (2017) Comparative bioavailability and utilization of particular forms of B12 supplements with potential to mitigate B12-related genetic polymorphisms. *Integr. Med. Encinitas Calif.* **16**, 42–49.
- Zhang Y., Hodgson N., Trivedi M., Deth R. (2016) Neuregulin 1 promotes glutathione-dependent neuronal cobalamin metabolism by stimulating cysteine uptake. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–13.
- Pezacka E., Green R., Jacobsen D.W. (1990) Glutathionylcobalamin as an intermediate in the formation of

- cobalamin coenzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 443–450.
17. George P., Irvine D.H., Glauser S.C. (2006) The influence of chelation in determining the reactivity of the iron in hemoproteins. and the cobalt in vitamin B12 derivatives. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **88**, 393–415.
 18. Green R., Allen L.H., Bjørke-Monsen A.L., Brito A., Guéant J.L., Miller J.W., Molloy A.M., Nexo E., Stabler S., Toh B.H., Ueland P.M., Yajnik C. (2017) Correction: Vitamin B₁₂ deficiency. *Nat. Rev. Dis. Primer.* **3**, 17040.
 19. Esser A.J., Mukherjee S., Dereven'kov I.A., Makarov S.V., Jacobsen D.W., Spiekerkoetter U., Hannibal L. (2022) Versatile enzymology and heterogeneous phenotypes in cobalamin complementation type C disease. *iScience.* **25**, 104981.
 20. Rizzo G., Laganà A.S. (2020) A review of vitamin B12. In: *Molecular Nutrition*. Elsevier, pp. 105–129.
 21. Obeid R., Fedosov S.N., Nexo E. (2015) Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyanohydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**, 1364–1372.
 22. Froese D.S., Gravel R.A. (2010) Genetic disorders of vitamin B12 metabolism: eight complementation groups—eight genes. *Expert. Rev. Mol. Med.* **12**, e37.
 23. Bassila C., Ghemrawi R., Flayac J., Froese D.S., Baumgartner M.R., Guéant J.-L., Coelho D. (2017) Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1863**, 103–112.
 24. Ankar A., Kumar A. (2023) Vitamin B12 deficiency. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publ.
 25. Joint Formulary Committee (Great Britain) (2020) *BNF 80: September 2020–March 2021*. London: BMJ Group; Pharmaceutical Press.
 26. Vidal-Alaball J., Butler C., Cannings-John R., Goringe A., Hood K., McCaddon A., McDowell I., Papaioannou A. (2005) Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency. *Cochrane Database Syst. Rev.* **3**, Ed. Cochrane Metabolic and Endocrine Disorders Group. CD004655.
 27. Клинические рекомендации “Витамин-B12-Дефицитная анемия” 2021, разработанные Национальным гематологическим обществом, Национальным обществом детских гематологов и онкологов — Утверждены Минздравом РФ. https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/536_2
 28. Anon. (2008) *Physicians' desk reference: PDR 2008*. 62-nd. Ed. Montvale N.J. Thomson Healthcare, p. 3480.
 29. Forsyth J.C., Mueller P.D., Becker C.E., Osterloh J., Benowitz N.L., Rumack B.H., Hall A.H. (1993) Hydroxocobalamin as a cyanide antidote: safety, efficacy and pharmacokinetics in heavily smoking normal volunteers. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **31**, 277–294.
 30. Bak M.A., Smith J.A., Murfin B., Chen Y. (2022) High-dose hydroxocobalamin for refractory vasoplegia post cardiac surgery. *Cureus.* **14**(8), e28267.23.
 31. Andersson H.C., Shapira E. (1998) Biochemical and clinical response to hydroxocobalamin versus cyanocobalamin treatment in patients with methylmalonic acidemia and homocystinuria (cblC). *J. Pediatr.* **132**, 121–124.
 32. Bodamer O.A.F., Rosenblatt D.S., Appel S.H., Beaudet A.L. (2001) Adult-onset combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC). *Neurology.* **56**, 1113–1113.
 33. Huemer M., Diodato D., Schwahn B., Schiff M., Bandeira A., Benoist J.F., Burlina A., Cerone R., Couce M.L., Garcia-Cazorla A., la Marca G., Pasquini E., Vilarinho L., Weisfeld-Adams J.D., Kožich V., Blom H., Baumgartner M.R., Dionisi-Vici C. (2017) Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders *cblC*, *cblD*, *cblE*, *cblF*, *cblG*, *cblI* and *MTHFR* deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **40**, 21–48.
 34. Almannai M., Marom R., Divin K., Scaglia F., Sutton V.R., Craigen W.J., Lee B., Burrage L.C., Graham B.H. (2017) Milder clinical and biochemical phenotypes associated with the c.482G>A (p.Arg161Gln) pathogenic variant in cobalamin C disease: implications for management and screening. *Mol. Genet. Metab.* **122**, 60–66.
 35. Higashimoto T., Kim A.Y., Ogawa J.T., Sloan J.L., Almuqbil M.A., Carlson J.M., Manoli I., Venditti C.P., Gunay-Aygun M., Wang T. (2020) High dose hydroxocobalamin achieves biochemical correction and improvement of neuropsychiatric deficits in adults with late onset cobalamin C deficiency. *JIMD Rep.* **51**, 17–24.
 36. Fischer S., Huemer M., Baumgartner M., Deodato F., Ballhausen D., Boneh A., Burlina A.B., Cerone R., Garcia P., Gökçay G., Grünwald S., Häberle J., Jaeken J., Ketteridge D., Lindner M., Mandel H., Martinelli D., Martins E.G., Schwab K.O., Gruenert S.C., Schwahn B.C., Sztriha L., Tomaske M., Trefz F., Vilarinho L., Rosenblatt D.S., Fowler B., Dionisi-Vici C. (2014) Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the cblC defect. *J. Inherit. Metab. Dis.* **37**, 831–840.
 37. Carrillo-Carrasco N., Sloan J., Valle D., Hamosh A., Venditti C.P. (2009) Hydroxocobalamin dose escalation improves metabolic control in cblC. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 728–731.
 38. Van Hove J.L., Van Damme-Lombaerts R., Grünwald S., Peters H., Van Damme B., Fryns J.P., Arnout J., Wevers R., Baumgartner E.R., Fowler B. (2002) Cobalamin disorder cblC presenting with late-onset thrombotic microangiopathy. *Am. J. Med. Genet.* **111**, 195–201.
 39. Matos I.V., Castejón E., Meavilla S., O'Callaghan M., Garcia-Villoria J., López-Sala A., Ribes A., Artuch R., Garcia-Cazorla A. (2013) Clinical and biochemical outcome after hydroxocobalamin dose escalation in a series of patients with cobalamin C deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **109**, 360–365.
 40. Scalabrino G., Carpo M., Bamonti F., Pizzinelli S., D'Avino C., Bresolin N., Meucci G., Martinelli V., Comi G.C., Peracchi M. (2004) High tumor necrosis factor- α in levels in cerebrospinal fluid of cobalamin-deficient patients. *Ann. Neurol.* **56**, 886–890.
 41. Tamura J., Kubota K., Murakami H., Sawamura M., Matsushima T., Tamura T., Saitoh T., Kurabayashi H., Naruse T. (1999) Immunomodulation by vitamin B12: augmentation of CD8⁺ T lymphocytes and natural killer (NK) cell activity in vitamin B12-deficient patients by

- methyl-B12 treatment: vit. B12 augments CD8⁺ cells and NK cell activity. *Clin. Exp. Immunol.* **116**, 28–32.
42. Veber D., Mutti E., Tacchini L., Gammella E., Tredici G., Scalabrino G. (2008) Indirect down-regulation of nuclear NF- κ B levels by cobalamin in the spinal cord and liver of the rat. *J. Neurosci. Res.* **86**, 1380–1387.
 43. Mottram L., Speak A.O., Selek R.M., Cambridge E.L., McIntyre Z., Kane L., Mukhopadhyay S., Grove C., Colin A., Brandt C., Duque-Correa M.A., Forbester J., Nguyen T.A., Hale C., Vasiliou G.S., Arends M.J., Wren B.W., Dougan G., Clare S. (2016) Infection susceptibility in gastric intrinsic factor (vitamin B₁₂)-defective mice is subject to maternal influences. *mBio.* **7**, e00830-16.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00830-16>
 44. Vellema P., Rutten V.P.M.G., Hoek A., Moll L., Wentink G.H. (1996) The effect of cobalt supplementation on the immune response in vitamin B12 deficient Texel lambs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **55**, 151–161.
 45. Кочкин А.А., Яворовский А.Г., Берикашвили Л.Б., Лихванцев В.В. (2020) Современная вазопрессорная терапия септического шока (обзор). *Общая реаниматология.* **16**, 77–93.
 46. Misra U.K., Kalita J., Singh S.K., Rahi S.K. (2017) Oxidative stress markers in vitamin B12 deficiency. *Mol. Neurobiol.* **54**, 1278–1284.
 47. Li F., Bahnson E.M., Wilder J., Siletsky R., Hagaman J., Nickeleit V., Hiller S., Ayesha A., Feng L., Levine J.S., Takahashi N., Maeda-Smithies N. (2020) Oral high dose vitamin B12 decreases renal superoxide and post-ischemia/reperfusion injury in mice. *Redox Biol.* **32**, 101504.
 48. Андрианова Н.В., Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю. (2020) Воспаление и окислительный стресс как мишени для терапии ишемического повреждения почек (обзор). *Биохимия.* **85**, 1873–1886.
 49. Gherasim C., Ruetz M., Li Z., Hudolin S., Banerjee R. (2015) Pathogenic mutations differentially affect the catalytic activities of the human B12-processing chaperone CblC and increase futile redox cycling. *J. Biol. Chem.* **290**, 11393–11402.
 50. Wang X., Yang Y., Li X., Li C., Wang C. (2019) Distinct clinical, neuroimaging and genetic profiles of late-onset cobalamin C defects (cblC): a report of 16 Chinese cases. *Orphanet. J. Rare Dis.* **14**, 109.
 51. Sloan J.L., Carrillo N., Adams D., Venditti C.P. (1993) Disorders of intracellular cobalamin metabolism. In: *GeneReviews*®. Eds Adam M.P., Mirzaa G.M., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J., Gripp K.W., Amemiya A. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.
 52. Li Z., Shanmuganathan A., Ruetz M., Yamada K., Lesniak N.A., Kräutler B., Brunold T.C., Koutmos M., Banerjee R. (2017) Coordination chemistry controls the thiol oxidase activity of the B12-trafficking protein CblC. *J. Biol. Chem.* **292**, 9733–9744.
 53. Birch C.S., Brasch N.E., McCaddon A., Williams J.H.H. (2009) A novel role for vitamin B12: cobalamins are intracellular antioxidants *in vitro*. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 184–188.
 54. Соловьева М.Е., Соловьев В.В., Фасхутдинова А.А., Кудрявцев А.А., Акатов В.С. (2007) Прооксидантное и цитотоксическое действие N-ацетилцистеина и глутатиона в сочетаниях с витамином B12b. *Цитология.* **1**, 70–78.
 55. Solovieva M.E., Solovyev V.V., Kudryavtsev A.A., Trizna Y.A., Akatov V.S. (2008) Vitamin B12b enhances the cytotoxicity of dithiothreitol. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1846–1856.
 56. Solovieva M.E., Shatalin Yu.V., Solovyev V.V., Sazonov A.V., Kutysheiko V.P., Akatov V.S. (2019) Hydroxycobalamin catalyzes the oxidation of diethyldithiocarbamate and increases its cytotoxicity independently of copper ions. *Redox Biol.* **20**, 28–37.
 57. Solovieva M., Shatalin Y., Fadeev R., Krestinina O., Baburina Y., Kruglov A., Kharechkin E., Kobyakova M., Rogachevsky V., Shishkova E., Akatov A.V. (2020) Vitamin B12b enhances the cytotoxicity of diethyldithiocarbamate in a synergistic manner, inducing the paraptosis-like death of human larynx carcinoma cells. *Bio-molecules.* **10**, 69.
 58. Solovieva M., Shatalin Y., Odinkova I., Krestinina O., Baburina Y., Lomovskaya Y., Pankratov A., Pankratova N., Buneeva O., Kopylov A., Medvedev A., Akatov V. (2022) Disulfiram oxy-derivatives suppress protein retrotranslocation across the ER membrane to the cytosol and initiate paraptosis-like cell death. *Membranes.* **12**, 845.
 59. Banerjee R., Gouda H., Pillay S. (2021) Redox-linked coordination chemistry directs vitamin B₁₂ trafficking. *Acc. Chem. Res.* **54**, 2003–2013.
 60. Dereven'kov I.A., Salnikov D.S., Silaghi-Dumitrescu R., Makarov S.V., Koifman O.I. (2016) Redox chemistry of cobalamin and its derivatives. *Coord. Chem. Rev.* **309**, 68–83.
 61. Dereven'kov I.A., Hannibal L., Dürr M., Salnikov D.S., Bui Thi T.T., Makarov S.V., Koifman O.I., Ivanović-Burmazović I. (2017) Redox turnover of organometallic B12 cofactors recycles vitamin C: sulfur assisted reduction of dehydroascorbic acid by Cob(II)alamin. *J. Organomet. Chem.* **839**, 53–59.
 62. Li Z., Mascarenhas R., Twahir U.T., Kallon A., Deb A., Yaw M., Penner-Hahn J., Koutmos M., Warncke K., Banerjee R. (2020) An interprotein Co–S coordination complex in the B₁₂-trafficking pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 16334–16345.
 63. Jacobsen D.W., Troxell L.S., Brown K.L. (1984) Catalysis of thiol oxidation by cobalamins and cobinamides: reaction products and kinetics. *Biochemistry.* **23**, 2017–2025.
 64. Jacobsen D.W., Pezacka E.H., Brown K.L. (1993) The inhibition of corrinoid-catalyzed oxidation of mercaptoethanol by methyl iodide: mechanistic implications. *J. Inorg. Biochem.* **50**, 47–63.
 65. Nazhat N.B., Golding B.T., Johnson G.R.A., Jones P. (1989) Destruction of vitamin B12 by reaction with ascorbate: the role of hydrogen peroxide and the oxidation state of cobalt. *J. Inorg. Biochem.* **36**, 75–81.
 66. Suarez-Moreira E., Yun J., Birch C.S., Williams J.H.H., McCaddon A., Brasch N.E. (2009) Vitamin B₁₂ and redox homeostasis: Cob(II)alamin reacts with superoxide at rates approaching superoxide dismutase (SOD). *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15078–15079.
 67. Dereven'kov I.A., Salnikov D.S., Makarov S.V., Boss G.R., Koifman O.I. (2013) Kinetics and mecha-

- nism of oxidation of super-reduced cobalamin and cobinamide species by thiosulfate, sulfite and dithionite. *Dalton Trans.* **42**, 15307–15316.
68. Quintiliani M., Badiello R., Tamba M., Esfandi A., Gorin G. (1977) Radiolysis of glutathione in oxygen-containing solutions of pH 7. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **32**, 195–202.
 69. Wefers H., Sies H. (1983) Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur. J. Biochem.* **137**, 29–36.
 70. Zhang X., Zhang N., Schuchmann H.-P., Von Sonntag C. (1994) Pulse radiolysis of 2-mercaptoethanol in oxygenated aqueous solution. Generation and reactions of the thiylperoxyl radical. *J. Phys. Chem.* **98**, 6541–6547.
 71. Winterbourn C.C., Metodiewa D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 322–328.
 72. Nagy P., Ashby M.T. (2007) Reactive sulfur species: kinetics and mechanisms of the oxidation of cysteine by hypohalous acid to give cysteine sulfenic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14082–14091.
 73. Chandler J.D., Nichols D.P., Nick J.A., Hondal R.J., Day B.J. (2013) Selective metabolism of hypothiocyanous acid by mammalian thioredoxin reductase promotes lung innate immunity and antioxidant defense. *J. Biol. Chem.* **288**, 18421–18428.
 74. Hugo M., Turell L., Manta B., Botti H., Monteiro G., Netto L.E.S., Alvarez B., Radi R., Trujillo M. (2009) Thiol and sulfenic acid oxidation of ahpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry*. **48**, 9416–9426.
 75. Forni L.G., Mönig J., Mora-Arellano V.O., Willson R.L. (1983) Thiyl free radicals: direct observations of electron transfer reactions with phenothiazines and ascorbate. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **2**, 961–965.
 76. Nagy P., Ashby M.T. (2007) Reactive sulfur species: kinetics and mechanism of the hydrolysis of cysteine thiosulfinate ester. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1364–1372.
 77. Mezyk S.P. (1996) Rate constant determination for the reaction of hydroxyl and glutathione thiyl radicals with glutathione in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **100**, 8861–8866.
 78. Zhao R., Lind J., Merenyi G., Eriksen T.E. (1994) Kinetics of one-electron oxidation of thiols and hydrogen abstraction by thiyl radicals from alpha-amino C–H bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 12010–12015.
 79. Kožich V., Schwahn B.C., Sokolová J., Křížková M., Ditroi T., Krijt J., Khalil Y., Křížek T., Vaculíková-Fantlová T., Stibůrková B., Mills P., Clayton P., Barvíková K., Blessing H., Sykut-Cegielska J., Dionisi-Vici C., Gasperini S., García-Cazorla Á., Haack T.B., Honzík T., Ješina P., Kuster A., Laugwitz L., Martinelli D., Porta F., Santer R., Schwarz G., Nagy P. (2022) Human ultrarare genetic disorders of sulfur metabolism demonstrate redundancies in H₂S homeostasis. *Redox Biol.* **58**, 102517.
 80. Amorati R., Lynett P.T., Valgimigli L., Pratt D.A. (2012) The reaction of sulfenic acids with peroxyl radicals: insights into the radical-trapping antioxidant activity of plant-derived thiosulfonates. *Chemistry*. **18**, 6370–6379.
 81. Tamba M., Dajka K., Ferreri C., Asmus K.-D., Chatgililoglu C. (2007) One-electron reduction of methanesulfonyl chloride. The fate of MeSO₂ Cl^{•-} and MeSO₂[•] intermediates in oxygenated solutions and their role in the *cis-trans*-isomerization of mono-unsaturated fatty acids. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8716–8723.
 82. Schöneich C. (2012) Radical-based damage of sulfur-containing amino acid residues. in: *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*. Eds Chatgililoglu C., Studer A. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. rad044.
 83. Dereven'kov I.A., Tsaba L.V., Pokrovskaya E.A., Makarov S.V. (2018) Studies on the interaction of aquacobalamin with cysteinesulfinic and cysteic acids, hypotaurine and taurine. *J. Coord. Chem.* **71**, 3194–3206.
 84. Gupta V., Carroll K.S. (2014) Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim. Biophys. Acta*. **1840**, 847–875.
 85. Turell L., Steglich M., Torres M.J., Deambrosi M., Antmann L., Furdui C.M., Schopfer F.J., Alvarez B. (2021) Sulfenic acid in human serum albumin: reaction with thiols, oxidation and spontaneous decay. *Free Radic. Biol. Med.* **165**, 254–264.
 86. Paulsen C.E., Carroll K.S. (2010) Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem. Biol.* **5**, 47–62.
 87. Paulsen C.E., Carroll K.S. (2013) Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem. Rev.* **113**, 4633–4679.
 88. Lorenzen I., Eble J.A., Hanschmann E.-M. (2021) Thiol switches in membrane proteins – extracellular redox regulation in cell biology. *Biol. Chem.* **402**, 253–269.
 89. Ovalle F., Grimes T., Xu G., Patel A.J., Grayson T.B., Thielen L.A., Li P., Shalev A. (2018) Verapamil and beta cell function in adults with recent-onset type 1 diabetes. *Nat. Med.* **24**, 1108–1112.
 90. Michalek R.D., Nelson K.J., Holbrook B.C., Yi J.S., Stridiron D., Daniel L.W., Fetrow J.S., King S.B., Poole L.B., Grayson J.M. (2007) The requirement of reversible cysteine sulfenic acid formation for T cell activation and function. *J. Immunol.* **179**, 6456–6467.
 91. Pantano C., Reynaert N.L., Vliet A.V.D., Janssen-Heininger Y.M.W. (2006) Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-κB signaling pathway. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1791–806.
 92. Paulsen C.E., Carroll K.S. (2009) Chemical dissection of an essential redox switch in yeast. *Chem. Biol.* **16**, 217–225.
 93. Duan J., Zhang T., Gaffrey M.J., Weitz K.K., Moore R.J., Li X., Xian M., Thrall B.D., Qian W.-J. (2020) Stoichiometric quantification of the thiol redox proteome of macrophages reveals subcellular compartmentalization and susceptibility to oxidative perturbations. *Redox Biol.* **36**, 101649.
 94. Zhang T., Gaffrey M.J., Li X., Qian W.-J. (2021) Characterization of cellular oxidative stress response by stoichiometric redox proteomics. *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* **320**, C182–C194.

Redox-Catalytic Properties of Cobalamins

Yu. V. Shatalin¹ *, V. S. Shubina¹, M. E. Solovieva¹, and V. S. Akatov¹

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

**e-mail: yury.shatalin@yandex.ru*

Vitamin B12, or cobalamin, is essential for normal body function and used in the therapy of different diseases. A several studies have shown that vitamin B12 has anti-inflammatory and antioxidant properties that can play an important role in the prevention of some diseases. On the other hand, it has been reported that vitamin B12 in combination with such reducing agents as ascorbate (vitamin C) and thiols showed prooxidant activity. This review provides information on the roles of vitamin B12 in diseases accompanied by inflammation and oxidative stress and the effects of vitamin B12 administrated alone and in combinations with different reducing agents such as ascorbate and thiols on oxidative stress. In addition, the mechanisms of prooxidant actions of combinations of vitamin B12 with these reducing agents depending on the form of vitamin B12 (hydroxocobalamin and cyanocobalamin) are discussed. Understanding the mechanisms of prooxidant action of vitamin B12 is necessary for developing strategies for therapeutic administration of vitamin B12.

Keywords: hydroxocobalamin, cyanocobalamin, thiol oxidation, reactive oxygen species, cytotoxicity

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 575.1;575.113;576.385;577.71;612.67

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР NRF2 В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЭНДОТЕЛИЯ

© 2023 г. Н. Д. Кондратенко^{a, b}, Л. А. Зиновкина^c, Р. А. Зиновкин^{a, b, *}

^aНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^bРоссийский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Российский геронтологический научно-клинический центр, Москва, 129226 Россия

^cФакультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: roman.zinovkin@gmail.com

Поступила в редакцию 16.04.2023 г.

После доработки 11.05.2023 г.

Принята к публикации 22.05.2023 г.

Транскрипционный фактор NRF2 — главный регулятор антиоксидантной защиты клетки, активируется под воздействием различных стимулов, таких как окислители и электрофилы, что индуцирует транскрипцию целого ряда генов, продукты которых участвуют в метаболизме ксенобиотиков и способствуют уменьшению окислительного стресса. NRF2 является одним из ключевых транскрипционных факторов, обеспечивающих функционирование клеток эндотелия — слоя клеток, выстилающих внутреннюю полость сосудов. Эндотелий выполняет множество гомеостатических функций: контролирует миграцию лейкоцитов во внутренние ткани, регулирует тромбообразование и сосудистый тонус, а также участвует в ангиогенезе. Нарушение функций эндотелия часто сопровождается воспалением и окислительным стрессом, что может приводить к клеточному старению, а также к гибели клеток путем апоптоза, некроза и ферроптоза. Эндотелиальная дисфункция вносит вклад в развитие таких распространенных сердечно-сосудистых заболеваний, как гипертензия и атеросклероз, а также сахарного диабета. Многие патофизиологические процессы в эндотелии, включая старческие изменения, сопряжены со снижением активности NRF2, что приводит к воспалительной активации и снижению активности систем антиоксидантной защиты клетки. Активация сигнального пути NRF2, как правило, способствует разрешению воспаления и устранению окислительного стресса. В данном обзоре рассмотрено значение NRF2 в осуществлении основных функций эндотелия в норме и патологии, а также преимущества и недостатки активации NRF2 как способа профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: транскрипционный фактор NRF2, эндотелий, старение, воспаление, окислительный стресс, возрастные изменения, атеросклероз, сахарный диабет, ангиогенез

DOI: 10.31857/S0026898423060101, EDN: QXHFSB

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности в мире.

Сокращения. Akt — протеинкиназа B; ARE — элемент антиоксидантного ответа; BH4 — тетрагидробиоптерин; DJ-1; PARK7 — белок 7 болезни Паркинсона; eNOS — эндотелиальная NO-синтаза; GCLC — каталитическая субединица глутамат-цистеин-лигазы; GSH — глутатион; ICAM-1 — молекула межклеточной адгезии типа 1; KEAP1 — Kelch-подобный белок 1, ассоциированный с ECH; Maf — фактор транскрипции мышечно-апоневротической фибросаркомы; Neh-домен — домен NRF2-ECH-гомологии; Nox4 — NADPH-оксидаза 4; NRF2 — ядерный фактор 2, родственник эритроидному фактору 2; p62/SQSTM1 — секвестосома 1; PAPC — 1-пальмитоил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин; VCAM-1 — молекула адгезии 1 клеток сосудов; β -TrCP — белок с повторами бета-транслуцина; АФК — активные формы кислорода; ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания; а.о. — аминокислотный остаток (при цифре).

По оценкам ВОЗ в 2019 году от ССЗ умерли около 18 млн человек, что составляет 32% всех случаев смерти. В большинстве случаев ССЗ сопровождаются нарушением функций эндотелия [1] — плоского слоя клеток, выстилающего внутреннюю поверхность сосудов и служащего барьером между кровью и внутренними структурами сосуда. Эндотелий выполняет множество функций, включая гемостаз (равновесие между тромбозом и антикоагуляцией), регуляцию тонуса сосудов (баланс между вазоконстрикцией и вазодилатацией), а также ангиогенез (рост сосудов), заживление ран, пролиферацию гладкомышечных клеток. Эндотелиальная дисфункция, как правило, сопровождается окислительным стрессом и воспалительными реакциями. Все это делает чрезвычайно актуальной разработку новых лекарственных препаратов

против избыточного воспаления и повреждающего действия окислительного стресса.

Транскрипционный фактор NRF2 — один из основных регуляторов гомеостаза, обеспечивает функционирование клетки в условиях стресса [2]. NRF2 контролирует экспрессию множества генов, участвующих в антиоксидантной защите, поддержании редокс-гомеостаза и детоксикации различных веществ. Известно, что снижение экспрессии NRF2 вызывает окислительный стресс и разбалансированный воспалительный ответ: гиперактивацию клеток врожденного иммунитета, высокую продукцию цитокинов и активных форм кислорода (АФК), которые не только уничтожают патогены, но и повреждают ткани организма-хозяина. Индукция NRF2 приводит к снижению окислительного стресса и восстановлению гомеостаза, что способствует уменьшению воспалительного ответа и разрешению воспаления.

В настоящем обзоре представлен всесторонний анализ данных о функциях NRF2 в сосудистой эндотелии. Рассмотрены механизмы и потенциальные мишени NRF2, влияющие на функцию эндотелиальных клеток, а также плюсы и минусы активации NRF2 для профилактики и лечения ССЗ.

NRF2: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И РЕГУЛЯЦИЯ

NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) — фактор транскрипции, контролирующий экспрессию множества генов, отвечающих за антиоксидантную защиту клетки и метаболизм ксенобиотиков. NRF2 относится к белкам Cap'n'Collar (CNC), содержащим лейциновую молнию. NRF2 человека состоит из 605 а.о. и содержит семь высококонсервативных аминокислотных последовательностей, известных как Neh-домены (NRF2-ECH homology domain). Домен Neh1 (а.о. 434–561) представляет собой лейциновую молнию и отвечает за взаимодействие с малыми белками семейства Maf [3]. Во взаимодействии с другими белками-партнерами NRF2 участвуют домены Neh4 (а.о. 112–134) и Neh5 (а.о. 182–200) [4, 5]. В комплексе с белковыми партнерами NRF2 связывается с ARE-элементами — последовательностями, располагающимися в промоторах генов-мишеней NRF2. В активации транскрипции генов, содержащих ARE-последовательности, участвует домен Neh3 (а.о. 561–605), находящийся в С-концевой части NRF2. Домен Neh3 содержит VFLVPK-мотив, который выполняет роль связывающего звена между NRF2 и хеликазой CHD6. Домен Neh2 (а.о. 1–86) содержит две последовательности — DLG и ETGE, которые отвечают за связывание NRF2 со своим негативным регулятором KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) [6]. В домене Neh6 (а.о. 336–386) находятся две по-

следовательности, которые распознает E3-убиквитинлигаза β -TrCP [7, 8]. Домен Neh7 (а.о. 209–316) отвечает за связывание NRF2 с рецептором ретиноевой кислоты RXR α [9]. Схема расположения Neh-доменов и взаимодействующих с ними белковых партнеров приведена на рис. 1.

В обычных физиологических условиях концентрация NRF2 в цитоплазме и ядре составляет 149 и 273 нМ соответственно [10]. Относительно низкое количество NRF2 в отсутствие стресса поддерживается благодаря его постоянному протеолизу, который инициирует негативный регулятор NRF2 — KEAP1 [11]. KEAP1 играет роль адапторного белка для E3-убиквитинлигазного комплекса Cullin 3. Связывание NRF2 с KEAP1 приводит к убиквитинилированию семи остатков лизина в домене Neh2 с последующей протеасомной деградацией NRF2 [12].

KEAP1 выполняет роль сенсора окислителей и электрофилов благодаря остаткам цистеина, экспонированным в цитоплазму [12, 13]. В 2009 году была предложена концепция “цистеинового кода”, согласно которой разные классы соединений-индукторов NRF2 связываются с разными цистеиновыми остатками KEAP1, основные из которых Cys151 и Cys273 [14]. Так, различные комбинации модификаций остатков цистеина вызывают специфические биологические эффекты, характерные для каждого индуктора NRF2 [15]. Для нормального функционирования KEAP1 необходима связь этого белка с активным цитоскелетом [16]. KEAP1 функционирует в виде димера и связывается с NRF2 с помощью Kelch-доменов. Оба Kelch-домена димера KEAP1 связываются с Neh2-доменом NRF2: один — с DLG-мотивом с низкой аффинностью, другой — с ETGE-мотивом с высокой аффинностью [17, 18]. Благодаря тому, что взаимодействие двух белков KEAP1 с NRF2 происходит с разной аффинностью, была предложена модель “hinge and latch”, согласно которой KEAP1, связанный с ETGE-мотивом, выполняет роль “молнии”, обеспечивая сильное взаимодействие с NRF2, а KEAP1, связанный с DLG-мотивом, играет роль “застежки”, которая размыкается под воздействием окислителей или электрофилов [19].

Взаимодействие окислителей или электрофилов с цистеиновыми остатками KEAP1 приводит к нарушению его взаимодействия с E3-убиквитинлигазой Cullin 3, в результате чего протеасомная деградация NRF2 останавливается [20]. Из-за нарушения взаимодействия с DLG-мотивом NRF2 KEAP1 остается связанным с уже существующим NRF2, в отсутствие “вакантных” негативных регуляторов новосинтезированный NRF2 накапливается в цитоплазме [21]. Перемещению NRF2 в ядро и активации транскрипции его генов-мишеней способствует сигнал ядерной локализации

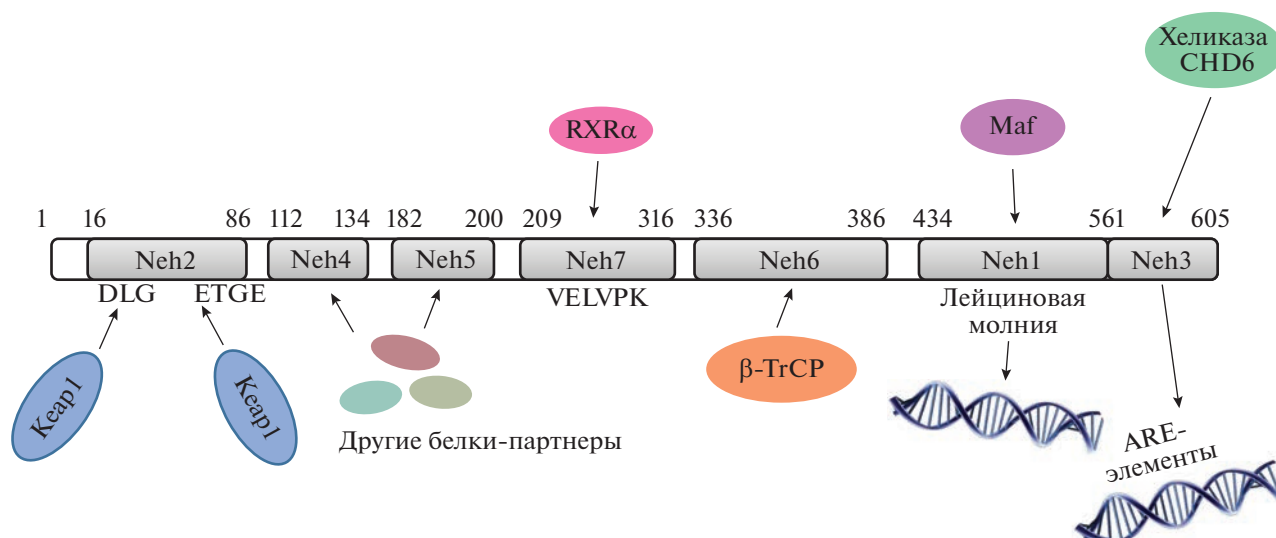


Рис. 1. Доменная структура транскрипционного фактора NRF2. NRF2 содержит семь консервативных Neh-доменов. При помощи Neh1 NRF2 взаимодействует с малыми белками семейства Maf, Neh7 связывает рецептор ретиноевой кислоты RXR α , а Neh4 и Neh5 — другие коактиваторы и корепрессоры. Домен Neh2 содержит DLG и ETGE-мотивы, с которыми взаимодействует негативный регулятор NRF2 KEAP1. Домен Neh3, находящийся в С-концевой области, представляет собой связующее звено между NRF2 и хеликазой CDH6, благодаря чему NRF2 активирует транскрипцию своих генов-мишеней, промоторы которых содержат ARE-элементы. Домен Neh6 содержит два дедрона (последовательности, которые узнает E3-убиквитинлигаза β -TrCP).

[20, 22]. При добавлении индуктора NRF2 диэтилмалеата концентрация NRF2 в цитоплазме и ядре возрастает до 619 и 2733 нМ соответственно [10]. После восстановления редокс-гомеостаза KEAP1 перемещается в ядро при участии α 6-кариоферина (KPNA6), чтобы “облегчить” экспорт NRF2 из ядра и возобновить его постоянный протеолиз [23, 24]. Так как KEAP1 является основным регулятором активности NRF2, действие многих индукторов NRF2 связано именно с воздействием на KEAP1. Так, многие вещества растительного происхождения (например, сульфорафан, содержащийся в растениях семейства Капустные), являются электрофилами, способными связываться с цистеиновыми остатками KEAP1 и таким образом активировать NRF2.

Помимо редокс-зависимой регуляции посредством связывания с остатками цистеина KEAP1, активность NRF2 может регулироваться и другими способами, не зависящими от редокс-баланса. Например, в домене Neh6 NRF2 мыши расположена последовательность, содержащая остатки серинов, которые могут фосфорилироваться киназой GSK-3 β [8]. При фосфорилировании эта последовательность превращается в фосфодегрон, который распознается E3-убиквитинлигазой β -TrCP, в результате чего NRF2 подвергается деградации в протеасомах. По-видимому, регуляция активности с помощью β -TrCP происходит в условиях значительного угнетения активности KEAP1 [25].

NRF2 активируется также при стрессе эндоплазматического ретикулума. Накопление в клетке неправильно свернутых белков вызывает стрессовый ответ (UPR, unfolded protein response). Во время UPR-ответа активируется киназа эндоплазматического ретикулума, подобная протеинкиназе R (PERK), которая останавливает трансляцию и клеточный цикл, а также активирует NRF2 [26–28]. Кроме PERK, в UPR-ответе участвуют белки IRE1 и XBP1 [29], под контролем которых находится промотор гена *Hrd1*, кодирующего одноименную E3-убиквитинлигазу [30]. Hrd1 связывается с Neh4- и Neh5-доменами NRF2, что приводит к протеасомной деградации последнего. С активностью Hrd1 связано снижение уровня NRF2 в печени при циррозе [30].

Помимо E3-убиквитинлигаз, регулирующих уровень NRF2, направляя его на протеасомную деградацию, существует ряд белков, в аминокислотной последовательности которых присутствуют мотивы, идентичные или напоминающие ETGE-мотив NRF2 [31]. Эти белки могут конкурировать с NRF2 за связывание с KEAP1, стабилизируя NRF2 в цитоплазме и вызывая его последующее перемещение в ядро. Самым известным белком, активирующим NRF2 таким образом, является p62/SQSTM1, содержащий STGE-мотив. p62/SQSTM1 входит в состав аутофагосом и участвует в транспортировке белков, которые должны подвергнуться деградации в процессе аутофагии [32]. Нарушение аутофагии приводит к накоплению аутофагосом,

а соответственно, и белка p62, который связывает KEAP1 и таким образом активирует NRF2 [33].

DJ-1 — один из важных регуляторов антиоксидантной системы клетки, также способен активировать NRF2, однако молекулярные механизмы этой активации до сих пор не выяснены. Предполагалось, что DJ-1 может дестабилизировать комплекс KEAP1-NRF2 [34], но этот механизм не был подтвержден последующими исследованиями [35].

Продукт гена-мишени NRF2, фермент гемоксигеназа-1 (Hmox1), катализирует превращение гема в биливердин с одновременным высвобождением иона железа и CO [36]. CO обладает противовоспалительным и антиапоптотическим действием, что делает гемоксигеназу-1 важной терапевтической мишенью при эндотелиальной дисфункции [37]. Генетический нокаут гемоксигеназы-1 связан с увеличением окислительного стресса, а также с нарушением коагуляционной функции эндотелия [38, 39].

Еще одна мишень NRF2 — это ген *Nqo1*, кодирующий фермент NADPH:хинон-оксидоредуктазу-1, известную также как диафораза-1. Диафораза-1 катализирует двухэлектронное восстановление хинона до гидрохинона [40], что позволяет избежать одноэлектронного восстановления хинона другими ферментами, например, редуктазой цитохрома P450, которое сопровождается образованием супероксид-аниона ($O_2^{\cdot-}$). Антиоксидантное действие диафоразы-1 заключается в предотвращении генерации АФК в образовании антиоксидантных форм кофермента Q и α -токоферола [41, 42].

Биосинтез и метаболизм глутатиона (GSH) также находятся под контролем NRF2. GSH обеспечивает поддержание редокс-баланса в клетке за счет как прямого захвата проникающих в клетку окислителей, так и участия в работе ферментов антиоксидантной защиты (например, глутатионпероксидазы) в качестве кофактора [43, 44]. Так, активация NRF2 приводит к повышению экспрессии гена *GCLC*, кодирующего каталитическую субъединицу глутамат-цистеин-лигазы — ключевого фермента биосинтеза GSH, а также гена *GSR*, кодирующего глутатионредуктазу [45, 46].

СОСУДИСТЫЙ ЭНДОТЕЛИЙ

Эндотелий — однослойный пласт клеток, выстилающий внутреннюю полость сосудов, обеспечивает ключевые процессы в сердечно-сосудистой системе, такие как проницаемость и тонус сосудов, свертывание крови и регуляцию воспалительных реакций.

В регуляции тонуса сосудов участвует оксид азота (II) (NO), продуцируемый эндотелиальными клетками [47]. NO образуется при окислении *L*-аргинина до *L*-цитруллина в активном центре эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [48].

На обращенной внутрь сосуда поверхности эндотелиальных клеток располагается гликокаликс, состоящий из гликопротеинов, глюкозаминогликанов и протеогликанов [49]. Гликокаликс участвует в противосвертывающей функции эндотелия, так как один из глюкозаминогликанов — гепарансульфат — служит кофактором антитромбина III [50].

Эндотелий выполняет роль барьера между циркулирующими клетками крови и тканевой жидкостью. Этот барьер пластичен и может менять свою проницаемость в зависимости от условий окружающей среды. В нормальных условиях лейкоциты мало контактируют с эндотелием. Проникновение патогенов или появление в кровотоке маркеров повреждения клеток вызывает воспалительный ответ эндотелия, заключающийся в усиленной продукции цитокинов и экспрессии на поверхности клеток таких молекул адгезии, отвечающих за взаимодействие с лейкоцитами, как Р- и Е-селектины, интегрины, ICAM-1 и VCAM-1 [51–54]. В результате лейкоциты распластаются по поверхности эндотелия и мигрируют сквозь стенку сосуда в очаг воспаления, что сопровождается повышением проницаемости эндотелиального барьера и облегчает миграцию лейкоцитов через стенку сосуда [55]. В регуляции потока лейкоцитов участвует гликокаликс эндотелиальных клеток: разрушение гликокаликса приводило к повышению проницаемости сосудов и усиленной адгезии лейкоцитов к поверхности эндотелия [56, 57].

Воспаление является естественной иммунной реакцией организма на инфекцию, которая должна прекратиться после уничтожения патогена. Но некоторые воспалительные состояния, такие как сепсис, вызывают генерализованный и гипертрофированный ответ эндотелия. Окислительный стресс, сопутствующий воспалительному ответу, способствует развитию эндотелиальной дисфункции, что выражается в невозможности осуществления гомеостатических функций, избыточной продукции АФК и провоспалительных медиаторов, снижении способности к ангиогенезу, протромботической активности, в снижении биодоступности NO, а также в ухудшении вазодилатации и вазоконстрикции. Эндотелиальная дисфункция связана с развитием цитокинового шторма и таких заболеваний, как гипертензия, сахарный диабет, атеросклероз, венозный тромбоз [58–62].

NRF2 И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ЭНДОТЕЛИИ

В результате активности дыхательной цепи митохондрий, а также специализированных ферментов, таких как NADPH-оксидаза, в клетках постоянно синтезируются АФК — чрезвычайно реакционноспособные молекулы, которые в не-

больших количествах участвуют в передаче различных сигналов в клетках. К АФК относятся пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($OH^\cdot$) и супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$). В физиологических условиях АФК эффективно элиминируются системами антиоксидантной защиты клетки. Однако при образовании слишком большого количества АФК или при нарушении работы систем, отвечающих за их уничтожение, может развиваться окислительный стресс. Возникновение окислительного стресса в клетках эндотелия может приводить к развитию эндотелиальной дисфункции, которая, как уже упоминалось, вносит значительный вклад в развитие сахарного диабета, атеросклероза, а также хронической болезни почек или острого респираторного дистресс-синдрома [63]. В некоторых случаях повреждения нуклеиновых кислот, белков и липидов, возникающие в результате окислительного стресса, вызывают апоптоз клеток [64].

Активация транскрипционного фактора NRF2 — многообещающий подход к терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом и с развивающейся впоследствии эндотелиальной дисфункцией. В ряде работ показано, что активация NRF2 способна предотвращать повышение уровня АФК и гибель клеток под действием различных окислительных стимулов. Так, индукция NRF2-ответа повышала выживаемость клеток эндотелия аорты, коронарных артерий и пупочной вены человека при окислительном стрессе, вызванном H_2O_2 [51–54, 65–67]. Частично это обусловлено способностью NRF2 поднимать уровень GSH за счет увеличения экспрессии гена *GCLC* [68]. Активация NRF2 также восстанавливала индуцированное *трет*-бутилгидропероксидом снижение экспрессии VE-кадгерина — белка межклеточных контактов — и нарушение его внутриклеточного распределения [69].

Активность NRF2 также снижала уровень окислительного стресса в эндотелиальных клетках, вызванного воздействием уремической сыворотки [70], лептина [71], бензо[а]пирена [72] и доксорубина [73].

Под действием АФК в клетках эндотелия легочных артерий увеличивается секреция трансформирующего фактора роста TGF β 1 [74]. TGF β 1, в свою очередь, способен индуцировать эндотелиально-мезенхимальный переход, который вносит вклад в развитие легочной артериальной гипертензии [75, 76]. Легочная гипертензия сопровождается обструкцией легочных путей и может приводить к правожелудочковой недостаточности. При эндотелиально-мезенхимальном переходе клетки эндотелия приобретают мезенхимальный фенотип, что выражается в снижении экспрессии эндотелиальных маркеров (CD31 и VE-кадгерина) и повышении экспрессии маркеров клеток фибробластного типа (FSP1, виментина, проколлагена I

и гладкомышечного α -актина) [77]. Также АФК вызывают повышение уровня провоспалительных цитокинов, что дополнительно вносит вклад в эндотелиально-мезенхимальный переход [78]. Индукция NRF2 под действием сальвианолевой кислоты А снижала уровень АФК и экспрессию маркеров мезенхимального фенотипа [79].

Дисфункция эндотелия приводит к невозможности выполнения им гомеостатических функций, например, в результате снижения выработки NO. Один из регуляторов активности eNOS — ее кофактор тетрагидробиоптерин (BH4), действует как аллостерический регулятор, способствующий связыванию L-аргинина с активным центром eNOS, а также может напрямую связывать супероксид-анион [80]. Нарушение соотношения BH4 : eNOS приводит к “разобщению” eNOS, в результате которого фермент начинает продуцировать супероксид-анион вместо NO. АФК, образование которых связано с развитием различных ССЗ, способны окислять BH4 в клетках эндотелия и нарушать тем самым стехиометрическое соотношение BH4 : eNOS, что ведет к разобщению eNOS и продукции супероксид-аниона [81–83]. Супероксид-анион, помимо своего собственного вклада в развитие окислительного стресса, способен реагировать с NO с образованием пероксинитрита — активной формы азота [84]. Снижение концентрации BH4 ведет к активации NRF2, который способствует восстановлению стехиометрического равновесия BH4: eNOS путем снижения экспрессии eNOS [85]. Дополнительный вклад в регуляцию количества eNOS может внести способность NRF2 увеличивать количество гемоксигеназы-1, которая снижает биодоступность гема, входящего в состав активного центра eNOS [85].

Тем не менее, NRF2 также может вносить вклад в развитие окислительного стресса. Например, при гипероксии NRF2 способен перемещаться в ядро и стимулировать экспрессию гена *Nox4*, кодирующего NADPH-оксидазу 4 и содержащего в промоторе ARE-элемент. *Nox4*, в свою очередь, продуцирует супероксид-анион, что вносит вклад в развитие окислительного стресса [86, 87].

NRF2 И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ В ЭНДОТЕЛИИ

Воспалительные реакции в эндотелии могут быть вызваны как провоспалительными цитокинами, так и молекулами патогенов, узнаваемыми соответствующими рецепторами. В результате воспалительной активации в эндотелии происходят значительные морфологические и функциональные изменения. Так, например, обработка клеток эндотелия липополисахаридом (LPS) вызывает повышение уровня молекул межклеточной адгезии (ICAM-1 и VCAM-1) и секреции ци-

токсинов (фактора некроза опухоли TNF и IL-1 β) [88, 89]. LPS вызывают также нарушение функций митохондрий: снижение мембранного потенциала и уровня АТФ, высвобождение цитохрома с в цитоплазму, снижение количества антиапоптотического белка Bcl2 и увеличение содержания проапоптотического белка BAK, активацию каспазы-3. В то же время индукция пути NRF2/MafF/ARE с помощью MitoQ предотвращала негативные последствия воздействия LPS [63]. Активация NRF2 снижала также адгезию лейкоцитов к поверхности эндотелия и его пролиабиленность [89–91].

Избыточное воспаление в эндотелии считается причиной многих острых и хронических заболеваний. Индукция NRF2-ответа снижает воспалительную активацию эндотелия, вызванную TNF, путем ингибирования транскрипционного фактора NF-kB [92], поднимает уровень GSH в клетках, снижает экспрессию MCP-1 и VCAM-1 и адгезию моноцитов к поверхности эндотелия [65].

NRF2 И ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЙ СТРЕСС

Эндотелий кровеносных сосудов постоянно подвергается физическому воздействию потоков крови [93]. Ламинарное течение крови, без завихрений, характерно для протяженных участков сосудов в состоянии покоя. В этом случае имеет место слоистое движение крови: вблизи стенок сосудов скорость потока плазмы крови минимальна, а в центре достигает максимума. Трение слоев крови характеризуется так называемым *напряжением сдвига* (shear stress). Действие напряжения сдвига при ламинарном течении крови способствует защите от атеросклероза [94].

Завихрения потоков крови в местах изгибов и разветвления артерий приводят к тому, что поток становится турбулентным, т.е. кровь начинает двигаться не только параллельно стенкам сосудов, но и перпендикулярно. Именно эти участки сосудов чаще всего подвергаются атерогенезу [94]. Возникшие атеросклеротические бляшки дополнительно усиливают турбулентные потоки, негативно влияющие на функции эндотелия.

Эндотелиальные клетки активно реагируют на изменения потока крови, распознавая их с помощью многочисленных механочувствительных рецепторов [95]. В результате этого активируются сигнальные пути, влияющие на окислительно-восстановительный баланс клетки, а также на экспрессию цитокинов, генов антиоксидантной защиты и межклеточных контактов [96]. Ламинарное напряжение сдвига через индукцию таких факторов, как eNOS и тромбомодулин (ТМ), обеспечивает атеропротективный, антиоксидантный, антикоагулянтный и противовоспалительный фенотип [97]. При этом гемодинамический стресс,

вызываемый турбулентными потоками, приводит к обратным эффектам и способствует развитию патофизиологических процессов в эндотелии. Важно отметить, что для здоровья сосудов опасно и слишком низкое напряжение сдвига.

Впервые индукция NRF2 в эндотелии под действием ламинарных потоков была обнаружена 20 лет назад [98]. С тех пор ключевая роль NRF2 в обеспечении противовоспалительных свойств ламинарных потоков была многократно подтверждена и изучена в деталях (см. обзор [99]).

Транскрипционный K $\ddot{u}$ ppel-подобный фактор 2 (KLF2) активируется в эндотелии под действием ламинарного потока крови и ингибируется турбулентными потоками [100]. KLF2 существенно усиливает активность NRF2, способствуя его перемещению в ядро [101]. Таким образом, в нормальных условиях NRF2 обеспечивает антиоксидантный и противовоспалительный фенотип эндотелия. При гемодинамическом стрессе активность KLF2 и, следовательно, NRF2 уменьшается, что приводит к развитию окислительного стресса и воспаления. В эндотелиальных клетках мышей, обработанных малой интерферирующей РНК к NRF2, а также в клетках с нокаутом гена *Nrf2* гемодинамический стресс значительно усиливает провоспалительный ответ [102].

Таким образом, путь KLF2–NRF2 играет важную роль в обеспечении сосудистого гомеостаза. Молекулярные механизмы активации NRF2 при гемодинамическом стрессе изучены не полностью и включают активацию других сигнальных путей, таких как фосфоинозитид-3-киназа (PI3K)–АКТ [103]. В индукции NRF2-ответа принимают участие АФК, синтезируемые NADPH-оксидазой, митохондриальной ЭТЦ и ксантиоксидазой [104]. В этом случае применение таких антиоксидантов, как NAC, приводит к уменьшению активности NRF2, что потенциально опасно для сосудистого эндотелия. Возможно, именно эта активность антиоксидантов и стала причиной неудачных многочисленных попыток использования антиоксидантов в клинической практике для профилактики ССЗ.

При этом роль NRF2 при гемодинамическом стрессе не сводится исключительно к защите эндотелия. Так, в отдельных случаях острый гемодинамический стресс может приводить к активации NRF2 и повышению синтеза провоспалительного хемокина IL-8, привлекающего иммунные клетки [105].

NRF2 И АТЕРОСКЛЕРОЗ

Атеросклероз — хроническое заболевание, характеризующееся образованием отложений липопротеинов на внутренней стенке сосудов. Окислительный стресс и эндотелиальная дис-

функция, часто являющаяся следствием стресса, вносят большой вклад в развитие атеросклероза [106]. Окислительный стресс, возникающий под действием различных стимулов, таких как свободные жирные кислоты или их окисленные производные, может приводить к дисфункции или гибели клеток эндотелия [107, 108]. Экспрессия молекул адгезии и секреция провоспалительных цитокинов усиливают адгезию моноцитов к поверхности эндотелия, а нарушение его барьерной функции — к накоплению в интиме сосудов макрофагов и липидов, формирующих атеросклеротические бляшки [109]. Кроме того, клетки поврежденного эндотелия продуцируют большое количество факторов роста, которые способствуют пролиферации клеток гладкой мускулатуры сосудов, секреции самими клетками внеклеточного матрикса и увеличению нестабильности атеросклеротических бляшек [110, 111].

РАРС (1-пальмитоил-2-арахидоноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) — компонент клеточных мембран и липопротеинов. Окисленный РАРС (oxРАРС) входит в состав атеросклеротических бляшек, окисленных липопротеинов низкой плотности (oxLDL), а также мембран апоптотических клеток [112]. Воздействие oxРАРС на клетки эндотелия приводит к увеличению экспрессии провоспалительных генов и молекул адгезии [113]. Обнаружено, что курение (один из факторов риска атеросклероза) связано с увеличенным образованием oxРАРС и репрессией защитного пути NRF2/ARE [114, 115]. Инкубация клеток линии HUVEC с сывороткой крови курящих людей, в которой повышен уровень oxРАРС, приводит к развитию в них окислительного стресса, вызванного повышением уровня АФК с одновременным снижением уровня GSH [116] за счет снижения экспрессии NRF2 и его гена-мишени *GCLC*. При этом стоит отметить, что, хотя большие концентрации oxРАРС вызывали репрессию NRF2/ARE-пути, относительно небольшая концентрация oxРАРС, наоборот, приводила к активации NRF2/ARE и увеличению экспрессии *Hmox1*, *GCLC* и *NQO1* в клетках HUVEC *in vitro* и в артериях мышей *in vivo* [116, 117]. Показано также, что и сам никотин вызывает увеличение количества АФК в клетках эндотелия и активацию NLRP3-инфламмосомы, приводя, в конечном счете, к гибели клеток путем пироптоза, что успешно предотвращается активацией NRF2 [118, 119].

Кроме oxРАРС, воспалительным действием обладают также свободные жирные кислоты, количество которых в кровотоке существенно повышается при ожирении [120]. Активация NRF2/ARE снижает также воспалительный ответ клеток на пальмитиновую кислоту [121, 122], наиболее распространенную циркулирующую жирную кислоту.

В развитие эндотелиальной дисфункции и атеросклероза вносит вклад еще один фактор — oxLDL [123]. Активация NRF2 под действием изотиоцианатов (сульфорафан, бензилизотиоцианат и фенетилизотиоцианат) также частично предотвращала активацию NF-kB и повышение экспрессии ICAM-1, VCAM-1, E-селектина, вызванное воздействием oxLDL на клетки эндотелия пупочной вены человека [124].

Развитие атеросклероза тесно связано с ферроптозом — одним из видов клеточной смерти, при котором происходит железозависимое окисление липидов [125, 126]. Это связано с нарушением метаболизма железа и снижением активности систем антиоксидантной защиты клетки [116, 127, 128]. Так, воздействие oxLDL на клетки эндотелия приводило к снижению экспрессии субъединицы 2 пренилдифосфатсинтазы (Prenyldiphosphate synthase subunit 2, PDSS2) — фермента, участвующего в синтезе коэнзима Q10 (CoQ10), а снижение контролируемой ею экспрессии NRF2 было связано с усиленной гибелью клеток путем ферроптоза, что успешно предотвращалось сверхэкспрессией PDSS2 [129]. Гибель клеток мог предотвращать и таншенин ПА, обладающий способностью активировать NRF2 [130].

Активация NRF2 с помощью различных веществ оказывала атеропротективное действие *in vivo*. Так, на мышах с дефицитом аполипопротеина Е и рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR), которых держали на высокожировой диете, показано, что индукторы NRF2 снижали уровень общего холестерина, триглицеридов и LDL в сыворотке крови [131–133]. Добавление в корм мышей индукторов NRF2 приводило к уменьшению площади поражения сосудов атеросклеротическими бляшками, увеличению стабильности бляшек, а также к снижению накопления липидов в печени. Кроме того, сверхэкспрессия гена гемоксигеназы-1 — одного из генов-мишеней NRF2, также вызывала уменьшение площади поражения атеросклеротическими бляшками в корне аорты и снижала уровень накопления железа в атеросклеротических бляшках [134]. В то же время, у мышей с дефицитом аполипопротеина Е нокаут *Hmox1* приводил к более тяжелому атеросклерозу.

Несмотря на то, что множество работ посвящено протективному влиянию активации NRF2 на течение атеросклероза, опубликованы работы, описывающие обратный эффект. Так, на модели атеросклероза, индуцированного высокожировой диетой у мышей с дефицитом ApoE, показано [135, 136], что нокаут *Nrf2* снижал площадь поражения сосудов атеросклеротическими бляшками. Похожие результаты получены и в работе [137], но различия в течении атеросклероза наблюдали только у самцов с нокаутом гена *Nrf2*.

NRF2 И ГИПЕРГЛИКЕМИЯ

Ключевую роль в нарушении функций внутренних органов (почек, сетчатки, нервной системы, а также сердца и сосудов) при сахарном диабете играет гипергликемия и связанная с ней эндотелиальная дисфункция. Гипергликемия приводит к истончению гликокаликса, необходимого для нормального функционирования эндотелия, и усиленной продукции таких АФК, как пероксид водорода и супероксид-анион [138, 139]. Под воздействием высокого уровня глюкозы в клетках эндотелия происходит нарушение межклеточных контактов, что приводит к увеличению проницаемости эндотелиального барьера, а также к апоптозу клеток эндотелия [140, 141], увеличению экспрессии молекул адгезии и усиленной адгезии лейкоцитов к поверхности эндотелия, к снижению биодоступности NO [142, 143]. Под воздействием высокого содержания глюкозы снижается соотношение GSH/GSSG в цитоплазме и митохондриях, что обусловлено снижением количества GSH с одновременным увеличением уровня глутатионилированных белков [144]. Кроме того, при высоком уровне глюкозы нарушается нормальное функционирование митохондрий, что выражается в снижении потенциала на внутренней мембране митохондрий и усиленной продукции АФК в митохондриях [145]. Нарушение функций митохондрий, в свою очередь, приводит к образованию активных стресс-фибрилл и усиленному апоптозу эндотелиальных клеток [145].

Выявлены негативные последствия воздействия гипергликемии не только на зрелые, но и на прогениторные клетки эндотелия. Показано, что эндотелиальные прогениторные клетки, выделенные из костного мозга мышей с диабетом, характеризовались сниженной способностью к миграции и пролиферации, повышенным уровнем окислительного стресса и сниженной активностью защитного пути NRF2/ARE [146].

Негативное воздействие гипергликемии на клетки эндотелия выражается также в снижении активности защитного NRF2/ARE-ответа. Так, в клетках эндотелия пупочной вены, полученных от пациентов с гестационным диабетом, выявлено снижение адаптивного NRF2-ответа на добавление 4-гидроксиноненаля (4-HNE) [147]. Вероятно, одной из причин этого может быть снижение количества белка DJ-1, способного активировать NRF2, в клетках эндотелия больных гестационным диабетом [147]. Кроме того, в гипергликемических условиях в клетках эндотелия снижается экспрессия SET8 — метилтрансферазы, которая отвечает за метилирование Lys20 в гистоне H4 [148]. Метилирование гистона H4 (H4K20me1), располагающегося в непосредственной близости от промотора гена *KEAP1*, приводит к “замалчиванию” его транскрипции. Таким образом, сниже-

ние экспрессии *SET8* вносит вклад в снижение активации NRF2/ARE-ответа при гипергликемии.

Гипергликемия не только нарушает нормальное функционирование эндотелия, но и снижает адаптивный NRF2-ответ. При этом активация NRF2 с помощью сверхэкспрессии или малых молекул-индукторов может снижать эндотелиальную дисфункцию, вызванную высоким уровнем глюкозы. Так, активация NRF2 препятствует повышению уровня АФК, малонового диальдегида и экспрессии *ICAM-1* и *VCAM-1* при высоком содержании глюкозы, а также восстанавливает способность клеток эндотелия к миграции и ангиогенезу [149, 150]. Вызванная инсулином активация NRF2 через сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR приводит к увеличению количества и активности GCLC, восстанавливает соотношение GSH/GSSG в цитоплазме и митохондриях и предотвращает апоптотическую гибель клеток [144]. Митохондриально-направленный антиоксидант MitoQ, способный активировать NRF2, восстанавливал мембранный потенциал митохондрий, снижал продукцию митохондриальных АФК и уменьшал количество активных стресс-фибрилл и адгезию лейкоцитов к поверхности эндотелия [145].

Активация NRF2 восстанавливает уровень NO и приводит к более успешному расслаблению аорты мышей с диабетом под действием ацетилхолина, снижая окислительный стресс и эндотелиальную дисфункцию [151, 152].

В мышинной модели сахарного диабета, индуцированного внутрибрюшинным введением стрептозотоцина, бутират натрия (NaB), обладающий способностью активировать NRF2, предотвращал повышение уровня *ICAM-1*, *VCAM-1*, 4-HNE и уровня экспрессии индуцибельной NO-синтазы iNOS в аорте, а также улучшал способность аорты к релаксации под действием ацетилхолина [149]. Активация NRF2 с помощью *трет*-бутилгидрохинона в прогениторных эндотелиальных клетках восстанавливает их способность к миграции, пролиферации и секреции факторов роста, а также снижает уровень окислительного стресса [146].

NRF2 И ТРОМБОЗ

Нарушения свертываемости крови могут приводить как к неконтролируемым кровотечениям, так и к образованию тромбов (тромбозам), которые представляют серьезную угрозу для жизни и здоровья человека. Однако до настоящего времени взаимосвязи тромбозов и активности NRF2 в эндотелии посвящено ограниченное число исследований. Вместе с тем известно, что гибель эндотелиальных клеток, вызванная сильными воспалительными реакциями организма, например, при сепсисе, может быть причиной возникновения тромбозов [153]. Реакции воспаления всегда

сопровождаются сильным окислительным стрессом [154], а поскольку NRF2 способен снижать как окислительный стресс, так и воспалительные реакции, логично предположить, что этот фактор может предотвращать гибель эндотелиальных клеток и, следовательно, развитие тромбоза.

Получены данные, косвенно подтверждающие эту гипотезу. Во-первых, показано, что липоксин A4 предотвращает тромбообразование, вызванное окислительным стрессом, с помощью активации NRF2 [155]. Во-вторых, у 89% пациентов с тромбозом глубоких вен обнаружены мутации в сигнальном пути NRF2/KEAP1, приводящие к снижению экспрессии мРНК гена *NRF2* [156]. Тем не менее, требуются дальнейшие исследования роли NRF2 при заболеваниях, связанных с нарушением свертываемости крови.

NRF2 И ВАЗОКОНСТРИКЦИЯ

Вазоконстрикция — сужение просвета сосудов, обусловленное сокращением мышечных стенок артерий и артериол, обеспечивает повышение давления крови, а также участвует в защите организма от кровопотерь, вызванных серьезными травмами. Вазодилатация — это процесс обратный вазоконстрикции, при котором мышечные стенки сосудов расслабляются и кровяное давление падает.

Сигнальная молекула NO(II) в низких концентрациях обеспечивает вазодилатацию путем активации растворимой гуанилатциклазы в гладкомышечных клетках сосудов. В высоких концентрациях NO вызывает апоптоз и некроз клеток, в том числе эндотелиальных [157]. Сигнальный путь NRF2 активируется в присутствии NO за счет S-нитрозилирования ингибиторного белка KEAP1 [158], которое включает защитные клеточные реакции для уменьшения NO-индуцированного повреждения.

Для уничтожения попавших в организм патогенов клетки иммунной системы продуцируют NO в высокой концентрации. По-видимому, активация NRF2 в этом случае может уменьшать окислительный стресс и способствовать выживанию патогенов, поэтому следует с осторожностью применять индукторы NRF2 при инфекционных заболеваниях.

NRF2 И СТАРЕНИЕ ЭНДОТЕЛИЯ

С окислительным стрессом тесно связано хроническое воспаление, сопутствующее старению (“inflammaging”) [159]. Большинство возрастных заболеваний, в том числе ССЗ, имеют в своей основе воспалительный компонент [160]. В стареющих сосудах увеличивается содержание маркеров воспаления и окислительного стресса [161, 162], а также повышается апоптоз [163]. Снижение си-

стемного воспаления и окислительного стресса в сосудах можно рассматривать как перспективный подход к замедлению процессов преждевременного старения.

Существует множество исследований, показывающих, что в эндотелии сосудов с возрастом уменьшается как количество NRF2, так и его активность, что может способствовать развитию эндотелиальной дисфункции и патологий сосудистой системы [164–166]. Дисфункция NRF2 может быть потенциальным механизмом, лежащим в основе возрастного нарушения ангиогенеза, при этом активация NRF2 восстанавливает ангиогенез [167].

Под действием ряда соединений, влияющих на клеточную ДНК, клетки эндотелия могут превращаться в так называемые сенесцентные, или старческие клетки, которые не способны к дальнейшему делению. Эти клетки экспрессируют типичные маркеры клеточного старения (бета-галактозидазу, p16, p21 и p53) и не выполняют большинство из своих функций. Стареющие клетки также приобретают секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP, senescence-associated secretory phenotype), при котором повышена секреция провоспалительных цитокинов, хемокинов и матриксных металлопротеиназ [168]. В мозговых артериях мышей с нокаутом *Nrf2* усиливаются возрастные изменения, которые сопровождаются повышением содержания маркеров воспаления [169]. Активация NRF2, наоборот, предотвращает появление сенесцентных клеток [170]. Индукция NRF2 с помощью *трет*-бутилгидрохинона препятствовала развитию SASP в прогениторных эндотелиальных клетках мышей со стрептозотоциновым диабетом [146]. Таким образом, активацию NRF2 можно рассматривать как многообещающее направление профилактики ССЗ при старении [171, 172].

NRF2 И ЭНДОТЕЛИЙ ОПУХОЛЕЙ

Согласно принятым в настоящее время представлениям, активация NRF2 защищает клетки от мутагенеза [173], что объясняется антиоксидантным действием ферментов, экспрессия которых находится под контролем NRF2: снижение окислительного стресса уменьшает вероятность потенциально мутагенных окислительных повреждений ДНК. Тем не менее, конститутивная активация NRF2 способствует развитию, прогрессированию и метастазированию опухолей [174]. В опухолевых тканях зачастую повышен уровень экспрессии NRF2, чья антиоксидантная активность способствует выживанию опухолевых клеток [175]. Кроме того, активность NRF2 влияет на ангиогенез, вызванный метаболическими изменениями в опухолевых клетках [176]. Показано, что нокдаун *NRF2* ингибирует образование кро-

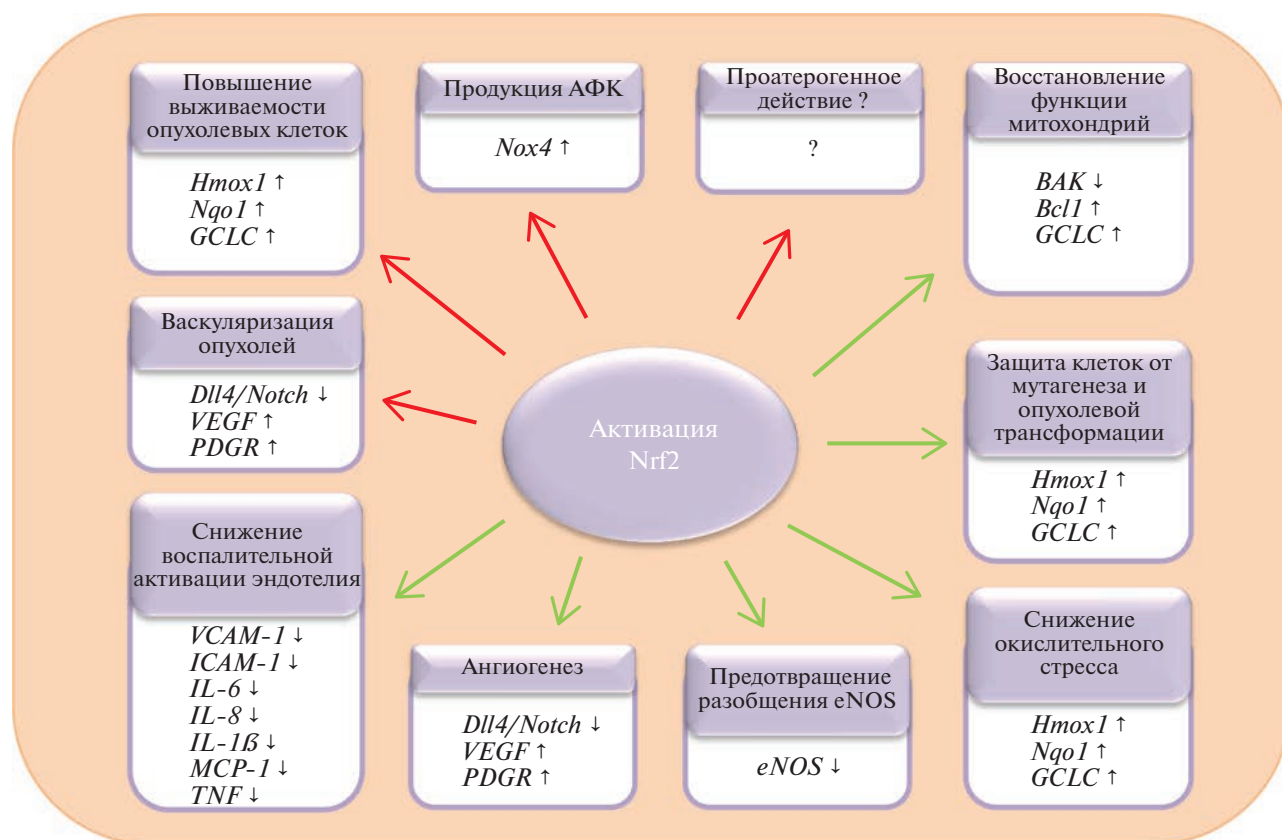


Рис. 2. Роль NRF2 в функциях эндотелия. К положительным эффектам NRF2 относятся снижение окислительного стресса и воспалительной активации эндотелия, восстановление нормальной функции митохондрий, увеличение биодоступности NO за счет предотвращения разобщения eNOS. Однако активация NRF2 может иметь и такие негативные последствия, как увеличение экспрессии гена *Nox4*, продукт которого, NADPH-оксидаза, продуцирует АФК. NRF2 играет двойную роль в образовании опухолей: механизмы, защищающие нормальные клетки от мутагенеза и опухолевой трансформации, способствуют выживанию опухолевых клеток. Кроме того, способность NRF2 стимулировать ангиогенез вносит дополнительный вклад в прогрессирование опухолей, способствуя их васкуляризации. Роль NRF2 в развитии атеросклероза остается изученной не до конца: имеются данные, указывающие как на защитное, так и на проатерогенное действие NRF2.

веносных сосудов путем уменьшения количества белка HIF-1α, что приводит к снижению уровней фактора роста эндотелия сосудов, тромбоцитарного фактора роста, ангиопоэтина и ангиогенина [177, 178]. Таким образом, активность NRF2 способствует как выживаемости опухолей, так и формированию новых сосудов. Это позволяет рассматривать NRF2 как перспективную мишень для терапии опухолей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Транскрипционный фактор NRF2 является главным регулятором антиоксидантного ответа клетки, который, активируя транскрипцию своих генов-мишеней, способствует снижению или предотвращению окислительного стресса и связанного с ним воспаления (рис. 2). К числу мишеней NRF2 относятся гены, продукты которых обладают антиоксидантными или противовоспалительными

свойствами. Например, *Hmox1* кодирует гемоксигеназу-1, продуктом гена *NQO1* является диафораза, а *GCLC* кодирует каталитическую субъединицу глутамат-цистеин-лигазы — ключевого фермента биосинтеза GSH. NRF2 активируется под воздействием целого ряда стимулов: это могут быть окислители и электрофилы; воспалительные стимулы, такие как oxPAPC или ультрафиолетовое излучение; ксенобиотики; биоактивные соединения, продуцируемые самим организмом (NO, инсулин или мелатонин), а также физическое воздействие тока крови на клетки [72, 117, 119, 144, 179, 180].

Эндотелий, выстилающий внутренние полости сосудов, участвует во многих процессах, необходимых для поддержания гомеостаза. Он обладает антитромботической активностью, контролирует миграцию лейкоцитов сквозь стенку сосуда в ткани, регулирует сосудистый тонус и ангиогенез, при этом в ангиогенезе участвует

транскрипционный фактор NRF2, способный ингибировать сигнальный путь Dll4/Notch [181]. Эндотелиальная дисфункция, возникающая при окислительном стрессе клеток эндотелия, является спутником таких заболеваний, связанных с хроническим воспалением, как диабет и атеросклероз. Активация NRF2 способствует снижению окислительного стресса, предотвращению эндотелиальной дисфункции и ее последствий. Так, активация NRF2 снижает уровень выработки АФК и повышает выживаемость клеток под действием H_2O_2 , трет-бутилгидропероксида, уремиической сыворотки, лептина, бензо[а]пирена и доксорубина [65–67, 69–73]. Индукция NRF2/ARE-ответа вызывала антиатерогенный эффект *in vivo* и *in vitro*, снижая адгезию лейкоцитов к поверхности эндотелия и уменьшая площадь поражения сосудов атеросклеротическими бляшками [121, 122, 124, 131–133]. Также активация NRF2 спасала эндотелиальные клетки от воспаления, вызываемого гипергликемией [144, 145, 149, 151, 152].

Несмотря на многочисленные работы, посвященные защитному действию NRF2, активация NRF2 может иметь и негативные последствия (рис. 2). Так, NRF2 может увеличивать экспрессию гена *Nox4*, продукт которого – NADPH-оксидаза – способен продуцировать АФК, внося тем самым дополнительный вклад в развитие окислительного стресса [86, 87]. Снижение площади поражения сосудов атеросклеротическими бляшками у мышей с дефицитом аполипопротеина E и LDLR и с нокаутом *Nrf2* указывает на возможную проатерогенную активность NRF2 [51–54, 135, 137]. В контексте развития опухолей NRF2 также играет двойную роль – активация NRF2 в нормальных клетках помогает предотвращать мутагенез и опухолевую трансформацию, при этом она же увеличивает выживаемость опухолевых клеток и способствует васкуляризации опухолей [173–178]. Положительные и отрицательные эффекты активации NRF2 в клетках эндотелия приведены на рис. 2.

Таким образом, активация транскрипционного фактора NRF2 представляется перспективным подходом к профилактике и лечению ССЗ, в том числе связанных со старением. Однако для выяснения побочного действия такой активации необходимо проведение дальнейших исследований.

Авторы благодарят Анастасию Приходько за конструктивную критику и помощь в редактировании текста.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (23-14-00061).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Widmer R.J., Lerman A. (2014) Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2014**(3), 291–308. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.43>
2. Kaspar J.W., Niture S.K., Jaiswal A.K. (2009) Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **47**(9), 1304–1309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035>
3. Motohashi H., Katsuoka F., Engel J.D., Yamamoto M. (2004) Small Maf proteins serve as transcriptional co-factors for keratinocyte differentiation in the Keap1–Nrf2 regulatory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**(17), 6379–6384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305902101>
4. Nioi P., Nguyen T., Sherratt P.J., Pickett C.B. (2005) The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* **25**(24), 10895–10906. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.10895-10906.2005>
5. Katoh Y., Itoh K., Yoshida E., Miyagishi M., Fukamizu A., Yamamoto M. (2001) Two domains of Nrf2 co-operatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells.* **6**(10), 857–868. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00469.x>
6. Tong K.I., Katoh Y., Kusunoki H., Itoh K., Tanaka T., Yamamoto M. (2006) Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell Biol.* **26**(8), 2887–2900. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.2887-2900.2006>
7. McMahon M., Thomas N., Itoh K., Yamamoto M., Hayes J.D. (2004) Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J. Biol. Chem.* **279**(30), 31556–31567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403061200>
8. Rada P., Rojo A.I., Chowdhry S., McMahon M., Hayes J.D., Cuadrado A. (2011) SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol. Cell Biol.* **31**(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1128/MCB.01204-10>
9. Wang H., Liu K., Geng M., Gao P., Wu X., Hai Y., Li Y., Li Y., Luo L., Hayes J.D., Wang X.J., Tang X. (2013) RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res.* **73**(10), 3097–3108. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3386>
10. Iso T., Suzuki T., Baird L., Yamamoto M. (2016) Absolute amounts and status of the Nrf2-Keap1-Cul3 complex within cells. *Mol. Cell Biol.* **36**(24), 3100–3112. <https://doi.org/10.1128/MCB.00389-16>
11. Kobayashi A., Kang M.-I., Okawa H., Ohtsuji M., Zenke Y., Chiba T., Igarashi K., Yamamoto M. (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal deg-

- radation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **24**(16), 7130–7139. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7130-7139.2004>
12. Zhang D.D., Lo S.-C., Cross J.V., Templeton D.J., Hannink M. (2004) Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* **24**(24), 10941–10953. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10941-10953.2004>
13. Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Cole R.N., Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Yamamoto M., Talalay P. (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(18), 11908–11913. <https://doi.org/10.1073/pnas.172398899>
14. Kobayashi M., Li L., Iwamoto N., Nakajima-Takagi Y., Kaneko H., Nakayama Y., Eguchi M., Wada Y., Kumagai Y., Yamamoto M. (2009) The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol. Cell. Biol.* **29**(2), 493–502. <https://doi.org/10.1128/MCB.01080-08>
15. Suzuki T., Takahashi J., Yamamoto M. (2023) Molecular basis of the KEAP1-NRF2 signaling pathway. *Mol. Cells.* **46**(3), 133–141. <https://doi.org/10.14348/molcells.2023.0028>
16. Kang M.-I., Kobayashi A., Wakabayashi N., Kim S.-G., Yamamoto M. (2004) Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**(7), 2046–2051. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308347100>
17. McMahon M., Thomas N., Itoh K., Yamamoto M., Hayes J.D. (2006) Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a “tethering” mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J. Biol. Chem.* **281**(34), 24756–24768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601119200>
18. Tong K.I., Kobayashi A., Katsuoka F., Yamamoto M. (2006) Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.* **387**(10–11), 1311–1320. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.164>
19. Tong K.I., Padmanabhan B., Kobayashi A., Shang C., Hirotsu Y., Yokoyama S., Yamamoto M. (2007) Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol. Cell. Biol.* **27**(21), 7511–7521. <https://doi.org/10.1128/MCB.00753-07>
20. Kobayashi A., Kang M.-I., Watai Y., Tong K.I., Shibata T., Uchida K., Yamamoto M. (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* **26**(1), 221–229. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.1.221-229.2006>
21. Baird L., Llères D., Swift S., Dinkova-Kostova A.T. (2013) Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**(38), 15259–15264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305687110>
22. Jain A.K., Bloom D.A., Jaiswal A.K. (2005) Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J. Biol. Chem.* **280**(32), 29158–29168. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502083200>
23. Sun Z., Wu T., Zhao F., Lau A., Birch C.M., Zhang D.D. (2011) KPNA6 (Importin {alpha}7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Mol. Cell. Biol.* **31**(9), 1800–1811. <https://doi.org/10.1128/MCB.05036-11>
24. Sun Z., Zhang S., Chan J.Y., Zhang D.D. (2007) Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **27**(18), 6334–6349. <https://doi.org/10.1128/MCB.00630-07>
25. Kuga A., Tsuchida K., Panda H., Horiuchi M., Otsuki A., Taguchi K., Katsuoka F., Suzuki M., Yamamoto M. (2022) The β -TrCP-mediated pathway cooperates with the Keap1-mediated pathway in Nrf2 degradation *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **42**(7), e0056321. <https://doi.org/10.1128/mcb.00563-21>
26. Brewer J.W., Diehl J.A. (2000) PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**(23), 12625–12630. <https://doi.org/10.1073/pnas.220247197>
27. Harding H.P., Zhang Y., Ron D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* **397**(6716), 271–274. <https://doi.org/10.1038/16729>
28. Cullinan S.B., Zhang D., Hannink M., Arvisais E., Kaufman R.J., Diehl J.A. (2003) Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* **23**(20), 7198–7209. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7198-7209.2003>
29. Back S.H., Schröder M., Lee K., Zhang K., Kaufman R.J. (2005) ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods.* **35**(4), 395–416. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.03.001>
30. Wu T., Zhao F., Gao B., Tan C., Yagishita N., Nakajima T., Wong P.K., Chapman E., Fang D., Zhang D.D. (2014) Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis. *Genes Dev.* **28**(7), 708–722. <https://doi.org/10.1101/gad.238246.114>
31. Hast B.E., Goldfarb D., Mulvaney K.M., Hast M.A., Siesser P.F., Yan F., Hayes D.N., Major M.B. (2013) Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res.* **73**(7), 2199–2210. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4400>
32. Pankiv S., Clausen T.H., Lamark T., Brech A., Bruun J.-A., Outzen H., Øvervatn A., Bjørkøy G., Johansen T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**(33), 24131–24145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>
33. Lau A., Wang X.-J., Zhao F., Villeneuve N.F., Wu T., Jiang T., Sun Z., White E., Zhang D.D. (2010) A non-canonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol. Cell. Biol.* **30**(13), 3275–3285. <https://doi.org/10.1128/MCB.00248-10>
34. Clements C.M., McNally R.S., Conti B.J., Mak T.W., Ting J.P.-Y. (2006) DJ-1, a cancer- and Parkinson’s disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA*. **103**(41), 15091–15096.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607260103>
35. Gan L., Johnson D.A., Johnson J.A. (2010) Keap1-Nrf2 activation in the presence and absence of DJ-1. *Eur. J. Neurosci*. **31**(6), 967–977.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07138.x>
 36. Tenhunen R., Marver H.S., Schmid R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **61**(2), 748–755.
<https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.748>
 37. Calay D., Mason J.C. (2014) The multifunctional role and therapeutic potential of HO-1 in the vascular endothelium. *Antioxid. Redox Signal*. **20**(11), 1789–1809.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5659>
 38. Yachie A., Niida Y., Wada T., Igarashi N., Kaneda H., Toma T., Ohta K., Kasahara Y., Koizumi S. (1999) Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest*. **103** (1), 129–135.
<https://doi.org/10.1172/JCI14165>
 39. Radhakrishnan N., Yadav S.P., Sachdeva A., Pruthi P.K., Sawhney S., Piplani T., Wada T., Yachie A. (2011) Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol*. **33**(1), 74–78.
<https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3181fd2aae>
 40. Ernster L. (1967) [56] DT diaphorase. In: *Methods in Enzymology*. Acad. Press. **10**, 309–317.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)10059-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)10059-1)
 41. Beyer R.E., Segura-Aguilar J., Di Bernardo S., Cavazzoni M., Fato R., Fiorentini D., Galli M.C., Setti M., Landi L., Lenaz, G. (1996) The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**(6), 2528–2532.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2528>
 42. Siegel D., Bolton E.M., Burr J.A., Liebler D.C., Ross D. (1997) The reduction of α -tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of α -tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol. Pharmacol*. **52**(2), 300–305.
<https://doi.org/10.1124/mol.52.2.300>
 43. Wu G., Fang Y.-Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr*. **134**(3), 489–492.
<https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>
 44. Han D., Hanawa N., Saberi B., Kaplowitz N. (2006) Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. **291**(1), G1–G7.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00001.2006>
 45. Harvey C.J., Thimmulappa R.K., Singh A., Blake D.J., Ling G., Wakabayashi N., Fujii J., Myers A., Biswal S. (2009) Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med*. **46**(4), 443–453.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040>
 46. Chan J.Y., Kwong M. (2000) Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim. Biophys. Acta*. **1517**(1), 19–26.
[https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(00\)00238-4](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(00)00238-4)
 47. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. **288**(5789), 373–376.
<https://doi.org/10.1038/288373a0>
 48. Griffith O.W., Stuehr D.J. (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol*. **57**, 707–736.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.003423>
 49. Reitsma S., Slaaf D.W., Vink H., van Zandvoort M.A.M.J., oude Egbrink M.G.A. (2007) The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*. **454**(3), 345–359.
<https://doi.org/10.1007/s00424-007-0212-8>
 50. Sugahara K., Mikami T., Uyama T., Mizuguchi S., Nomura K., Kitagawa H. (2003) Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **13**(5), 612–620.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.09.011>
 51. McEver R.P., Moore K.L., Cummings R.D. (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem*. **270**(19), 11025–11028.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.19.11025>
 52. Dustin M.L., Rothlein R., Bhan A.K., Dinarello C.A., Springer T.A. (1986) Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol*. **137**(1), 245–254.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.137.1.245>
 53. Sans M., Panés J., Ardite E., Elizalde J.I., Arce Y., Elena M., Palacín A., Fernández-Checa J.C., Anderson D.C., Lobb R., Piqué J.M. (1999) VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology*. **116**(4), 874–883.
[https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70070-3](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70070-3)
 54. Lampugnani M.G., Resnati M., Dejana E., Marchisio P.C. (1991) The role of integrins in the maintenance of endothelial monolayer integrity. *J. Cell Biol*. **112**(3), 479–490.
<https://doi.org/10.1083/jcb.112.3.479>
 55. Gotsch U., Borges E., Bosse R., Böggemeyer E., Simon M., Mossmann H., Vestweber D. (1997) VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment *in vivo*. *J. Cell Sci*. **110**(5), 583–588.
<https://doi.org/10.1242/jcs.110.5.583>
 56. Constantinescu A.A., Vink H., Spaan J.A.E. (2003) Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. **23**(9), 1541–1547.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000085630.24353.3D>
 57. Jacob M., Bruegger D., Rehm M., Welsch U., Conzen P., Becker B.F. (2006) Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology*. **104**(6), 1223–1231.
<https://doi.org/10.1097/00000542-200606000-00018>
 58. Castro-Ferreira R., Cardoso R., Leite-Moreira A., Mansilha A. (2018) The role of endothelial dysfunction and inflammation in chronic venous disease. *Ann. Vasc. Surg*. **46**, 380–393.
<https://doi.org/10.1016/j.avsg.2017.06.131>
 59. Weber C., Noels H. (2011) Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med*.

- 17(11), 1410–1422.
<https://doi.org/10.1038/nm.2538>
60. Ng H.H., Leo C.H., Parry L.J., Ritchie R.H. (2018) Relaxin as a therapeutic target for the cardiovascular complications of diabetes. *Front. Pharmacol.* **9**, 501.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00501>
61. Baszczuk A., Kopczyński Z., Thielemann A. (2014) Endothelial dysfunction in patients with primary hypertension and hyperhomocysteinemia. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **68**, 91–100.
<https://doi.org/10.5604/17322693.1087521>
62. De Lorenzo A., Escobar S., Tibirica E. (2020) Systemic endothelial dysfunction: a common pathway for COVID-19, cardiovascular and metabolic diseases. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **30**(8), 1401–1402.
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.05.007>
63. Cen M., Ouyang W., Zhang W., Yang L., Lin X., Dai M., Hu H., Tang H., Liu H., Xia J., Xu, F. (2021) MitoQ protects against hyperpermeability of endothelium barrier in acute lung injury via a Nrf2-dependent mechanism. *Redox Biol.* **41**, 101936.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101936>
64. Grimsrud P.A., Xie H., Griffin T.J., Bernlohr D.A. (2008) Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J. Biol. Chem.* **283**(32), 21837–21841.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R700019200>
65. Chen X.-L., Dodd G., Thomas S., Zhang X., Wasserman M.A., Rovin B.H., Kunsch C. (2006) Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**(5), H1862–H1870.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00651.2005>
66. Donovan E.L., McCord J.M., Reuland D.J., Miller B.F., Hamilton K.L. (2012) Phytochemical activation of Nrf2 protects human coronary artery endothelial cells against an oxidative challenge. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 132931.
<https://doi.org/10.1155/2012/132931>
67. Chen M., Zhang M., Zhang X., Li J., Wang Y., Fan Y., Shi R. (2015) Limb ischemic preconditioning protects endothelium from oxidative stress by enhancing Nrf2 translocation and upregulating expression of antioxidants. *PLoS One*. **10**, e0128455.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128455>
68. Cortese M.M., Suschek C.V., Wetzel W., Kröncke K.-D., Kolb-Bachofen V. (2008) Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radic. Biol. Med.* **44**(12), 2002–2012.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.013>
69. Li X., Zhang Q., Hou N., Li J., Liu M., Peng S., Zhang Y., Luo Y., Zhao B., Wang S., Zhang Y. (2019) Carnosol as a Nrf2 activator improves endothelial barrier function through antioxidative mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(4), 800.
<https://doi.org/10.3390/ijms20040880>
70. Chen Z.-W., Miu H.-F., Wang H.-P., Wu Z.-N., Wang W.-J., Ling Y.-J., Xu X.-H., Sun H.-J., Jiang X. (2018) Pterostilbene protects against uraemia serum-induced endothelial cell damage via activation of Keap1/Nrf2/HO-1 signaling. *Int. Urol. Nephrol.* **50**(3), 559–570.
<https://doi.org/10.1007/s11255-017-1734-4>
71. Teixeira T.M., da Costa D.C., Resende A.C., Soulage C.O., Bezerra F.F., Daleprane J.B. (2017) Activation of Nrf2-antioxidant signaling by 1,25-dihydroxycholecalciferol prevents leptin-induced oxidative stress and inflammation in human endothelial cells. *J. Nutr.* **147**(4), 506–513.
<https://doi.org/10.3945/jn.116.239475>
72. Rajendran P., Alzahrani A.M., Ahmed E.A., Veerarghavan V.P. (2021) Kirenol inhibits B[a]P-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial cells via modulation of the Nrf2 signaling pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, 5585303.
<https://doi.org/10.1155/2021/5585303>
73. Ismail M.B., Rajendran P., AbuZahra H.M., Veerarghavan V.P. (2021) Mangiferin inhibits apoptosis in doxorubicin-induced vascular endothelial cells via the Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(8), 4259.
<https://doi.org/10.3390/ijms22084259>
74. Montorfano I., Becerra A., Cerro R., Echeverría C., Sáez E., Morales M.G., Fernández R., Cabello-Verdugo C., Simon F. (2014) Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF- β 1 and TGF- β 2-dependent pathway. *Lab. Invest.* **94**(10), 1068–1082.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.100>
75. Saito A. (2013) EMT and EndMT: regulated in similar ways? *J. Biochem.* **153**(6), 493–495.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvt032>
76. Good R.B., Gilbane A.J., Trinder S.L., Denton C.P., Coghlan G., Abraham D.J., Holmes A.M. (2015) Endothelial to mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Pathol.* **185**(7), 1850–1858.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.019>
77. Zeisberg E.M., Tarnavski O., Zeisberg M., Dorfman A.L., McMullen J.R., Gustafsson E., Chandraker A., Yuan X., Pu W.T., Roberts A.B., Neilson E.G. (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* **13**(8), 952–961.
<https://doi.org/10.1038/nm1613>
78. Rieder F., Kessler S.P., West G.A., Bhilocha S., de la Motte C., Sadler T.M., Gopalan B., Stylianou E., Fiocchi C. (2011) Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am. J. Pathol.* **179**(5), 2660–2673.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.042>
79. Chen Y., Yuan T., Zhang H., Yan Y., Wang D., Fang L., Lu Y., Du G. (2017) Activation of Nrf2 attenuates pulmonary vascular remodeling via inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition: an insight from a plant polyphenol. *Int. J. Biol. Sci.* **13**(8), 1067–1081.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.20316>
80. Vázquez-Vivar J., Kalyanaram B., Martásek P., Hogg N., Masters B.S., Karoui H., Tordo P., Pritchard K.A. Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**(16), 9220–9225.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9220>
81. Stuehr D., Pou S., Rosen G.M. (2001) Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J. Biol. Chem.* **276**(18), 14533–14536.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R100011200>

82. Alp N.J., Channon K.M. (2004) Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**(3), 413–420.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000110785.96039.f6>
83. Li H., Förstermann U. (2013) Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**(2), 161–167.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.01.006>
84. Beckman J.S., Koppenol W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**(5), C1424–C1437.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424>
85. Heiss E.H., Schachner D., Werner E.R., Dirsch V.M. (2009) Active NF-E2-related factor (Nrf2) contributes to keep endothelial NO synthase (eNOS) in the coupled state: role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels. *J. Biol. Chem.* **284**(46), 31579–31586.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009175>
86. Pendyala S., Gorshkova I.A., Usatyuk P.V., He D., Pennathur A., Lambeth J.D., Thannickal V.J., Natarajan V. (2009) Role of Nox4 and Nox2 in hyperoxia-induced reactive oxygen species generation and migration of human lung endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* **11**(4), 747–764.
<https://doi.org/10.1089/ars.2008.2203>
87. Pendyala S., Moitra J., Kalari S., Kleeberger S.R., Zhao Y., Reddy S.P., Garcia J.G.N., Natarajan V. (2011) Nrf2 regulates hyperoxia-induced Nox4 expression in human lung endothelium: identification of functional antioxidant response elements on the Nox4 promoter. *Free Radic. Biol. Med.* **50**(12), 1749–1759.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.022>
88. Chen H., Xie K., Han H., Li Y., Liu L., Yang T., Yu Y. (2015) Molecular hydrogen protects mice against polymicrobial sepsis by ameliorating endothelial dysfunction via an Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **28**(1), 643–654.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.034>
89. Lin Q., Qin X., Shi M., Qin Z., Meng Y., Qin Z., Guo S. (2017) Schisandrin B inhibits LPS-induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells by activating Nrf2. *Int. Immunopharmacol.* **49**, 142–147.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.05.032>
90. Gao F., Li J.-M., Xi C., Li H.-H., Liu Y.-L., Wang Y.-P., Xuan L.-J. (2019) Magnesium lithospermate B protects the endothelium from inflammation-induced dysfunction through activation of Nrf2 pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* **40**(7), 867–878.
<https://doi.org/10.1038/s41401-018-0189-1>
91. Li C., Zhang W.-J., Frei B. (2016) Quercetin inhibits LPS-induced adhesion molecule expression and oxidant production in human aortic endothelial cells by p38-mediated Nrf2 activation and antioxidant enzyme induction. *Redox Biol.* **9**, 104–113.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.06.006>
92. Fratanzio D., Speciale A., Molonia M.S., Bashllari R., Palumbo M., Saija A., Cimino F., Monastera G., Virgili F. (2018) Alpha-lipoic acid, but not di-hydrolipoic acid, activates Nrf2 response in primary human umbilical-vein endothelial cells and protects against TNF- α induced endothelium dysfunction. *Arch. Biochem. Biophys.* **655**, 18–25.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.08.003>
93. Gimbrone M.A., Jr., García-Cardena G. (2013) Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol.* **22**(1), 9–15.
<https://doi.org/10.1016/j.carpath.2012.06.006>
94. Davies P.F. (2009) Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **6**(1), 16–26.
<https://doi.org/10.1038/ncpcardio1397>
95. Fang Y., Wu D., Birukov K.G. (2019) Mechanosensing and mechanoregulation of endothelial cell functions. *Compr. Physiol.* **9**(2), 873–904.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c180020>
96. Davies P.F., Civelek M., Fang Y., Fleming I. (2013) The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions *in vivo*. *Cardiovasc. Res.* **99**(2), 315–327.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt101>
97. Nayak L., Lin Z., Jain M.K. (2011) “Go with the flow”: how Krüppel-like factor 2 regulates the vaso-protective effects of shear stress. *Antioxid. Redox Signal.* **15**(5), 1449–1461.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3647>
98. Chen X.-L., Varner S.E., Rao A.S., Grey J.Y., Thomas S., Cook C.K., Wasserman M.A., Medford R.M., Jaiswal A.K., Kunsch C. (2003) Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells: a novel anti-inflammatory mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**(2), 703–711.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M203161200>
99. Ishii T., Warabi E., Mann G.E. (2021) Mechanisms underlying unidirectional laminar shear stress-mediated Nrf2 activation in endothelial cells: amplification of low shear stress signaling by primary cilia. *Redox Biol.* **46**, 102103.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102103>
100. Dekker R.J., van Soest S., Fontijn R.D., Salamanca S., de Groot P.G., VanBavel E., Pannekoek H., Horrevoets A.J.G. (2002) Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). *Blood.* **100**(5), 1689–1698.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0046>
101. Fledderus J.O., Boon R.A., Volger O.L., Hurttala H., Ylä-Herttuala S., Pannekoek H., Levonen A.-L., Horrevoets A.J.G. (2008) KLF2 primes the antioxidant transcription factor Nrf2 for activation in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**(7), 1339–1346.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.165811>
102. Takabe W., Warabi E., Noguchi N. (2011) Anti-atherogenic effect of laminar shear stress via Nrf2 activation. *Antioxid. Redox Signal.* **15**(5), 1415–1426.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3433>
103. Dai G., Vaughn S., Zhang Y., Wang E.T., Garcia-Cardena G., Gimbrone M.A. Jr. (2007) Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2. *Circ. Res.* **101**(7), 723–733.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.152942>
104. Warabi E., Takabe W., Minami T., Inoue K., Itoh K., Yamamoto M., Ishii T., Kodama T., Noguchi N.

- (2007) Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* **42**(2), 260–269.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.043>
105. Ward A.O., Sala-Newby G.B., Ladak S., Angelini G.D., Caputo M., Suleiman M.-S., Evans P.C., George S.J., Zakkar M. (2022) Nrf2-Keap-1 imbalance under acute shear stress induces inflammatory response in venous endothelial cells. *Perfusion.* **37**(6), 582–589.
<https://doi.org/10.1177/02676591211012571>
106. Kattoor A.J., Pothineni N.V.K., Palagiri D., Mehta J.L. (2017) Oxidative stress in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **19**(11), 42.
<https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
107. Gimbrone M.A. Jr, García-Cardena G. (2016) Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ. Res.* **118**(4), 620–636.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>
108. Xu Y.-J., Zheng L., Hu Y.-W., Wang Q. (2018) Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* **476**, 28–37.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.11.005>
109. Crea F., Libby P. (2017) Acute coronary syndromes: the way forward from mechanisms to precision treatment. *Circulation.* **136**, 1155–1166.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029870>
110. Celletti F.L., Waugh J.M., Amabile P.G., Brendolan A., Hilfiker P.R., Dake M.D. (2001) Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* **7**(4), 425–429.
<https://doi.org/10.1038/86490>
111. Bennett M.R., Sinha S., Owens G.K. (2016) Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ. Res.* **118**(4), 692–702.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306361>
112. Fruhwirth G.O., Loidl A., Hermetter A. (2007) Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1772**(7), 718–736.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.04.009>
113. Bochkov V.N., Oskolkova O.V., Birukov K.G., Levonen A.-L., Binder C.J., Stöckl J. (2010) Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid. Redox Signal.* **12**(8), 1009–1059.
<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2597>
114. Garbin U., Pasini A.F., Stranieri C., Cominacini M., Pasini A., Manfro S., Lugoboni F., Mozzini C., Guidi G.C., Faccini G., Cominacini L. (2009) Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation. *PLoS One.* **4**, e8225.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008225>
115. Cui M., Cui R., Liu K., Dong J.-Y., Imano H., Hayama-Terada M., Muraki I., Kiyama M., Okada T., Kitamura A., Umesawa M., Yamagishi K., Ohira T., Iso H. (2018) Associations of tobacco smoking with impaired endothelial function: the circulatory risk in communities study (CIRCS). *J. Atheroscler. Thromb.* **25**(9), 836–845.
<https://doi.org/10.5551/jat.42150>
116. Fratta Pasini A., Albiero A., Stranieri C., Cominacini M., Pasini A., Mozzini C., Vallerio P., Cominacini L., Garbin U. (2012) Serum oxidative stress-induced repression of Nrf2 and GSH depletion: a mechanism potentially involved in endothelial dysfunction of young smokers. *PLoS One.* **7**, e30291.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030291>
117. Jyrkkänen H.-K., Kansanen E., Inkala M., Kivelä A.M., Hurttala H., Heinonen S.E., Goldsteins G., Jauhiainen S., Tiainen S., Makkonen H., Oskolkova O., Afonyushkin T., Koistinaho J., Yamamoto M., Bochkov V.N., Ylä-Herttuala S., Levonen A.-L. (2008) Nrf2 regulates antioxidant gene expression evoked by oxidized phospholipids in endothelial cells and murine arteries *in vivo*. *Circ. Res.* **103**, e1–e9.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.176883>
118. Wu X., Zhang H., Qi W., Zhang Y., Li J., Li Z., Lin Y., Bai X., Liu X., Chen X., Yang H., Xu C., Zhang Y., Yang B. (2018) Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis. *Cell Death Dis.* **9**(2), 171.
<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0257-3>
119. Zhao Z., Wang X., Zhang R., Ma B., Niu S., Di X., Ni L., Liu C. (2021) Melatonin attenuates smoking-induced atherosclerosis by activating the Nrf2 pathway via NLRP3 inflammasomes in endothelial cells. *Aging.* **13**(8), 11363–11380.
<https://doi.org/10.18632/aging.202829>
120. Opie L.H., Walfish P.G. (1963) Plasma free fatty acid concentrations in obesity. *N. Engl. J. Med.* **268**, 757–760.
<https://doi.org/10.1056/NEJM196304042681404>
121. Fratanzio D., Speciale A., Ferrari D., Cristani M., Saija A., Cimino F. (2015) Palmitate-induced endothelial dysfunction is attenuated by cyanidin-3-O-glucoside through modulation of Nrf2/Bach1 and NF-κB pathways. *Toxicol. Lett.* **239**(3), 152–160.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.020>
122. Mahmoud A.M., Wilkinson F.L., Jones A.M., Wilkinson J.A., Romero M., Duarte J., Alexander M.Y. (2017) A novel role for small molecule glycomimetics in the protection against lipid-induced endothelial dysfunction: involvement of Akt/eNOS and Nrf2/ARE signaling. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1861**, 3311–3322.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.08.013>
123. Gao S., Zhao D., Wang M., Zhao F., Han X., Qi Y., Liu J. (2017) Association between circulating oxidized LDL and atherosclerotic cardiovascular disease: a meta-analysis of observational studies. *Can. J. Cardiol.* **33**, 1624–1632.
<https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.07.015>
124. Huang C.-S., Lin A.-H., Liu C.-T., Tsai C.-W., Chang I.-S., Chen H.-W., Lii C.-K. (2013) Isothiocyanates protect against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction by upregulating Nrf2-dependent antioxidant and suppressing NFκB activation. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 1918–1930.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201300063>
125. Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., Cantley A.M., Yang W.S., Morrison B., Stockwell B.R. (2012) Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* **149**(5), 1060–1072.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
126. Bai T., Li M., Liu Y., Qiao Z., Wang Z. (2020) Inhibition of ferroptosis alleviates atherosclerosis through attenuating lipid peroxidation and endothelial dys-

- function in mouse aortic endothelial cell. *Free Radic. Biol. Med.* **160**, 92–102.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.026>
127. Vinchi F., Porto G., Simmelbauer A., Altamura S., Passos S. T., Garbowski M., Silva A. M. N., Spaich S., Seide S.E., Sparla R., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. (2020) Atherosclerosis is aggravated by iron overload and ameliorated by dietary and pharmacological iron restriction. *Eur. Heart J.* **41**, 2681–2695.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz112>
 128. Guo Z., Ran Q., Roberts L.J. 2nd, Zhou L., Richardson A., Sharan C., Wu D., Yang H. (2008) Suppression of atherogenesis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 343–352.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.009>
 129. Yang K., Song H., Yin D. (2021) PDSS2 inhibits the ferroptosis of vascular endothelial cells in atherosclerosis by activating Nrf2. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **77**, 767–776.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000001030>
 130. He L., Liu Y.-Y., Wang K., Li C., Zhang W., Li Z.-Z., Huang X.-Z., Xiong Y. (2021) Tanshinone IIA protects human coronary artery endothelial cells from ferroptosis by activating the NRF2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **575**, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.067>
 131. Meng N., Chen K., Wang Y., Hou J., Chu W., Xie S., Yang F., Sun C. (2022) Dihydrohomoplantagin and homoplantagin, major flavonoid glycosides from *Salvia plebeia* R. Br. inhibit oxLDL-induced endothelial cell injury and restrict atherosclerosis via activating Nrf2 anti-oxidation signal pathway. *Molecules.* **27**(6), 1990.
<https://doi.org/10.3390/molecules27061990>
 132. Zhang T., Hu Q., Shi L., Qin L., Zhang Q., Mi M. (2016) Equol attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting endoplasmic reticulum stress via activation of Nrf2 in endothelial cells. *PLoS One.* **11**(12), e0167020.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167020>
 133. Zhu Y., Zhang Y., Huang X., Xie Y., Qu Y., Long H., Gu N., Jiang W. (2019) Z-ligustilide protects vascular endothelial cells from oxidative stress and rescues high fat diet-induced atherosclerosis by activating multiple NRF2 downstream genes. *Atherosclerosis.* **284**, 110–120.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.010>
 134. Juan S.H., Lee T.S., Tseng K.W., Liou J.Y., Shyue S.K., Wu K.K., Chau L.Y. (2001) Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* **104**(13), 1519–1525.
<https://doi.org/10.1161/hc3801.095663>
 135. Sussan T.E., Jun J., Thimmulappa R., Bedja D., Antero M., Gabrielson K.L., Polotsky V.Y., Biswal S. (2008) Disruption of Nrf2, a key inducer of antioxidant defenses, attenuates ApoE-mediated atherosclerosis in mice. *PLoS One.* **3**(11), e3791.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003791>
 136. Freigang S., Ampenberger F., Spohn G., Heer S., Shamshiev A.T., Kisielow J., Hersberger M., Yamamoto M., Bachmann M.F., Kopf M. (2011) Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis. *Eur. J. Immunol.* **41**(7), 2040–2051.
<https://doi.org/10.1002/eji.201041316>
 137. Barajas B., Che N., Yin F., Rowshanrad A., Orozco L.D., Gong K.W., Wang X., Castellani L.W., Reue K., Lusis A.J., Araujo J.A. (2011) NF-E2-related factor 2 promotes atherosclerosis by effects on plasma lipoproteins and cholesterol transport that overshadow antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**(1), 58–66.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.210906>
 138. Folli F., Corradi D., Fanti P., Davalli A., Paez A., Giaccari A., Perego C., Muscogiuri G. (2011) The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr. Diabetes Rev.* **7**(5), 313–324.
<https://doi.org/10.2174/157339911797415585>
 139. Nieuwdorp M., van Haeften T.W., Gouverneur M.C.L.G., Mooij H.L., van Lieshout M.H.P., Levi M., Meijers J.C.M., Holleman F., Hoekstra J.B.L., Vink H., Kastelein J.J.P., Stroes E.S.G. (2006) Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation *in vivo*. *Diabetes.* **55**(2), 480–486.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-1103>
 140. Nobe K., Miyatake M., Sone T., Honda K. (2006) High-glucose-altered endothelial cell function involves both disruption of cell-to-cell connection and enhancement of force development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**(2), 530–539.
<https://doi.org/10.1124/jpet.106.105015>
 141. Baumgartner-Parzer S.M., Wagner L., Pettermann M., Grillari J., Gessl A., Waldhäusl W. (1995) High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes.* **44**(11), 1323–1327.
<https://doi.org/10.2337/diab.44.11.1323>
 142. Du X.L., Edelstein D., Dimmeler S., Ju Q., Sui C., Brownlee M. (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J. Clin. Invest.* **108**(9), 1341–1348.
<https://doi.org/10.1172/JCI11235>
 143. Morigi M., Angioletti S., Imberti B., Donadelli R., Micheletti G., Figliuzzi M., Remuzzi A., Zoja C., Remuzzi G. (1998) Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF- κ B-dependent fashion. *J. Clin. Invest.* **101**(9), 1905–1915.
<https://doi.org/10.1172/JCI1656>
 144. Okouchi M., Okayama N., Alexander J.S., Aw T.Y. (2006) NRF2-dependent glutamate-*L*-cysteine ligase catalytic subunit expression mediates insulin protection against hyperglycemia-induced brain endothelial cell apoptosis. *Curr. Neurovasc. Res.* **3**(4), 249–261.
<https://doi.org/10.2174/156720206778792876>
 145. Yang M.-Y., Fan Z., Zhang Z., Fan J. (2021) MitoQ protects against high glucose-induced brain microvascular endothelial cells injury via the Nrf2/HO-1 pathway. *J. Pharmacol. Sci.* **145**(1), 105–114.
<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.10.007>
 146. Wang R.-Y. Liu L.-H., Liu H., Wu K.-F., An J., Wang Q., Liu E., Bai L.-J., Qi B.-M., Qi B.-L., Zhang L. (2018) Nrf2 protects against diabetic dysfunction of endothe-

- lial progenitor cells via regulating cell senescence. *Int. J. Mol. Med.* **42**(3), 1327–1340.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3727>
147. Cheng X., Chapple S.J., Patel B., Puszyk W., Sugden D., Yin X., Mayr M., Siow R.C.M., Mann G.E. (2013) Gestational diabetes mellitus impairs Nrf2-mediated adaptive antioxidant defenses and redox signaling in fetal endothelial cells *in utero*. *Diabetes*. **62**(12), 4088–4097.
<https://doi.org/10.2337/db13-0169>
148. Chen X., Qi J., Wu Q., Jiang H., Wang J., Chen W., Mao A., Zhu M. (2020) High glucose inhibits vascular endothelial Keap1/Nrf2/ARE signal pathway via downregulation of monomethyltransferase SET8 expression. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **52**(5), 506–516.
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa023>
149. Wu J., Jiang Z., Zhang H., Liang W., Huang W., Zhang H., Li Y., Wang Z., Wang J., Jia Y., Liu B., Wu H. (2018) Sodium butyrate attenuates diabetes-induced aortic endothelial dysfunction via P300-mediated transcriptional activation of Nrf2. *Free Radic. Biol. Med.* **124**, 454–465.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.034>
150. Sun C.C., Lai Y.N., Wang W.H., Xu X.M., Li X.Q., Wang H., Zheng J.Y., Zheng J.Q. (2020) Metformin ameliorates gestational diabetes mellitus-induced endothelial dysfunction via downregulation of p65 and upregulation of Nrf2. *Front. Pharmacol.* **11**, 575390.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.575390>
151. Wang F., Pu C., Zhou P., Wang P., Liang D., Wang Q., Hu Y., Li B., Hao X. (2015) Cinnamaldehyde prevents endothelial dysfunction induced by high glucose by activating Nrf2. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**(1), 315–324.
<https://doi.org/10.1159/000374074>
152. Wang D., Hou J., Wan J., Yang Y., Liu S., Li X., Li W., Dai X., Zhou P., Liu W., Wang P. (2021) Dietary chlorogenic acid ameliorates oxidative stress and improves endothelial function in diabetic mice via Nrf2 activation. *J. Int. Med. Res.* **49**(1), 300060520985363.
<https://doi.org/10.1177/0300060520985363>
153. Verhamme P., Hoylaerts M.F. (2006) The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin. Belg.* **61**(5), 213–219.
<https://doi.org/10.1179/acb.2006.036>
154. Lum H., Roebuck K.A. (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280** (4), C719–C741.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.C719>
155. Yang S., Zheng Y., Hou X. (2019) Lipoxin A4 restores oxidative stress-induced vascular endothelial cell injury and thrombosis-related factor expression by its receptor-mediated activation of Nrf2-HO-1 axis. *Cell. Signal.* **60**, 146–153.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.05.002>
156. Akin-Bali D.F., Eroglu T., Ilk S., Egin Y., Kankilic T. (2020) Evaluation of the role of Nrf2/Keap1 pathway-associated novel mutations and gene expression on antioxidant status in patients with deep vein thrombosis. *Exp. Ther. Med.* **20**(2), 868–881.
<https://doi.org/10.3892/etm.2020.8790>
157. Li C.-Q., Wogan G.N. (2005) Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* **226**(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.10.021>
158. Um H.-C., Jang J.-H., Kim D.-H., Lee C., Surh Y.-J. (2011) Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells. *Nitric Oxide*. **25**(2), 161–168.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.06.001>
159. Franceschi C., Campisi J. (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **69**(Suppl. 1), S4–S9.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
160. Guarner V., Rubio-Ruiz M.E. (2015) Low-grade systemic inflammation connects aging, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Interdiscip. Top. Gerontol.* **40**, 99–106.
<https://doi.org/10.1159/000364934>
161. Csiszar A., Ungvari Z., Edwards J.G., Kaminski P., Wolin M.S., Koller A., Kaley G. (2002) Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ. Res.* **90**(11), 1159–1166.
<https://doi.org/10.1161/01.res.0000020401.61826.ea>
162. Ungvari Z., Tarantini S., Donato A.J., Galvan V., Csiszar A. (2018) Mechanisms of vascular aging. *Circ. Res.* **123**(7), 849–867.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311378>
163. Csiszar A., Ungvari Z., Koller A., Edwards J.G., Kaley G. (2004) Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in aging. *Physiol. Genomics*. **17**, 21–30.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00136.2003>
164. Ungvari Z., Bailey-Downs L., Sosnowska D., Koncz P., Losonczy G., Ballabh P., de Cabo R., Sonntag W.E., Csiszar A. (2011) Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**(2), H363–H372.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01134.2010>
165. Chapple S.J., Siow R.C.M., Mann G.E. (2012) Cross-talk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**(8), 1315–1320.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.021>
166. Kloska D., Kopacz A., Piechota-Polanczyk A., Nowak W.N., Dulak J., Jozkowicz A., Grochot-Przeczek A. (2019) Nrf2 in aging – Focus on the cardiovascular system. *Vascul. Pharmacol.* **112**, 42–53.
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.08.009>
167. Valcarcel-Ares M.N., Gautam T., Warrington J.P., Bailey-Downs L., Sosnowska D., de Cabo R., Losonczy G., Sonntag W.E., Ungvari Z., Csiszar A. (2012) Disruption of Nrf2 signaling impairs angiogenic capacity of endothelial cells: implications for microvascular aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **67**(8), 821–829.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glr229>
168. van Deursen J.M. (2014) The role of senescent cells in ageing. *Nature*. **509**, 439–446.
<https://doi.org/10.1038/nature13193>
169. Fulop G.A., Kiss T., Tarantini S., Balasubramanian P., Yabluchanskiy A., Farkas E., Bari F., Ungvari Z., Csiszar A. (2018) Nrf2 deficiency in aged mice exacerbates cellular senescence promoting cerebrovascular inflammation. *Geroscience*. **40**, 513–521.
<https://doi.org/10.1007/s11357-018-0047-6>

170. Romero A., San Hipólito-Luengo Á., Villalobos L.A., Vallejo S., Valencia I., Michalska P., Pajuelo-Lozano N., Sánchez-Pérez I., León R., Bartha J.L., Sanz M.J., Erusalimsky J.D., Sánchez-Ferrer C.F., Romacho T., Peiró C. (2019) The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation. *Aging Cell*. **18**(3), e12913. <https://doi.org/10.1111/ace1.12913>
171. Arefin S., Buchanan S., Hobson S., Steinmetz J., Alsalhi S., Shiels P.G., Kublickiene K., Stenvinkel P. (2020) Nrf2 in early vascular ageing: calcification, senescence and therapy. *Clin. Chim. Acta*. **505**, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.02.026>
172. Zinovkin R.A., Kondratenko N.D., Zinovkina L.A. (2022) Does Nrf2 play a role of a master regulator of mammalian aging? *Biochemistry*. **87**, 1465–1476. <https://doi.org/10.1134/S0006297922120045>
173. Pillai R., Hayashi M., Zavitsanou A.-M., Papagiannakopoulos T. (2022) NRF2: KEAPing tumors protected. *Cancer Discov*. **12**(3), 625–643. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0922>
174. Wu S., Lu H., Bai Y. (2019) Nrf2 in cancers: a double-edged sword. *Cancer Med*. **8**(5), 2252–2267. <https://doi.org/10.1002/cam4.2101>
175. Rojo de la Vega M., Chapman E., Zhang D.D. (2018) NRF2 and the hallmarks of cancer. *Cancer Cell*. **34**(1), 21–43. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.022>
176. Wang Y.-Y., Chen J., Liu X.-M., Zhao R., Zhe H. (2018) Nrf2-mediated metabolic reprogramming in cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev*. **2018**, 9304091. <https://doi.org/10.1155/2018/9304091>
177. Ji X., Wang H., Zhu J., Zhu L., Pan H., Li W., Zhou Y., Cong Z., Yan F., Chen S. (2014) Knockdown of Nrf2 suppresses glioblastoma angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 α . *Int. J. Cancer*. **135**(3), 574–584. <https://doi.org/10.1002/ijc.28699>
178. Toth R.K., Warfel N.A. (2017) Strange bedfellows: nuclear factor, erythroid 2-like 2 (Nrf2) and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in tumor hypoxia. *Antioxidants* (Basel). **6**(2), 27. <https://doi.org/10.3390/antiox6020027>
179. Liu C., Vojnovic D., Kochevar I.E., Jurkunas U.V. (2016) UV-A irradiation activates Nrf2-regulated antioxidant defense and induces p53/caspase3-dependent apoptosis in corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **57**, 2319–2327. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19097>
180. Chen X.-L., Varner, S.E., Rao, A.S., Grey, J.Y., Thomas, S., Cook, C.K., Wasserman M.A., Medford R.M., Jaiswal A.K., Kunsch C. (2003) Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells: a novel anti-inflammatory mechanism. *J. Biol. Chem*. **278**(2), 703–711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203161200>
181. Wei Y., Gong J., Thimmulappa R.K., Kosmider B., Biswal S., Duh E.J. (2013) Nrf2 acts cell-autonomously in endothelium to regulate tip cell formation and vascular branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**(41), E3910–E3918. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309276110>

Transcription Factor NRF2 in Endothelial Functions

N. D. Kondratenko^{1, 2}, L. A. Zinovkina³, and R. A. Zinovkin^{1, 2, *}

¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Russian Clinical Research Center for Gerontology, Ministry of Health of the Russian Federation, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 129226 Russia

³Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: roman.zinovkin@gmail.com

The transcription factor NRF2 is the major regulator of cellular antioxidant defense. NRF2 is activated by various stimuli, such as oxidants and electrophiles, which induce the transcription of a number of genes whose products are involved in xenobiotic metabolism and contribute to the reduction of oxidative stress. NRF2 is one of the key transcription factors for endothelial cell function. Endothelium is a cell layer lining the inner cavity of blood vessels, which performs various homeostatic functions: it controls migration of leukocytes, regulates thrombosis and vascular tone, and drives angiogenesis. Endothelial dysfunction is often accompanied by inflammation and oxidative stress, which may lead to cellular aging as well as cell death by apoptosis, necrosis, and ferroptosis. Endothelial dysfunction contributes to the development of such common cardiovascular diseases as hypertension, diabetes, and atherosclerosis. Many pathophysiological processes in the endothelium, including senile changes, are associated with decreased NRF2 activity, leading to inflammatory activation and decreased activity of cellular antioxidant defense systems. Activation of the NRF2 signaling pathway generally contributes to the resolution of inflammation and oxidative stress. This review focuses on the importance of NRF2 in the basic functions of endothelium in normal and pathological conditions. In addition, the advantages and disadvantages of NRF2 activation as a way to prevent and treat cardiovascular diseases are discussed.

Keywords: transcription factor NRF2, endothelium, aging, inflammation, oxidative stress, age-related changes, atherosclerosis, diabetes, angiogenesis

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 577.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕЛИТТИНПОДОБНЫХ БЕЛКОВ С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 67 кДа, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С Na^+/K^+ -АТФазой

© 2023 г. Л. А. Варфоломеева^а, Е. А. Климанова^{б, *}, С. В. Сидоренко^б,
Д. А. Федоров^б, О. Д. Лопина^б

^аИнститут биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр биотехнологии
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^бБиологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 25.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Установлено, что мелиттин, пептид из яда пчелы, взаимодействует со многими белками, включая белки-мишени кальмодулина и ионтранспортирующие АТФазы Р-типа. Предполагается, что мелиттин имитирует белковый модуль, участвующий в белок-белковых взаимодействиях внутри клеток. Ранее методом перекрестной иммунопреципитации установлено, что натрий-калиевая АТФаза (Na^+/K^+ -АТФаза), содержащая $\alpha 1$ -изоформу каталитической субъединицы, соосаждается с белком с молекулярной массой около 70 кДа, взаимодействующим с антителами против мелиттина. В присутствии специфического ингибитора Na^+/K^+ -АТФазы (уабаина) количество белка с молекулярной массой 70 кДа, взаимодействующего с Na^+/K^+ -АТФазой, возрастает. Для идентификации мелиттинподобного белка в почках мыши использовали метод аффинной хроматографии с иммобилизованными антителами, специфичными к мелиттину. В результате получена фракция мелиттинподобных белков с молекулярной массой около 70 кДа. Методом масс-спектрометрического анализа установлено, что в полученной белковой фракции содержится три молекулярных шаперона из суперсемейства Hsp70: митохондриальный mtHsp70 (морталин), Hsp73, Grp78 эндоплазматического ретикула. Эти данные позволяют предполагать, что шапероны из суперсемейства Hsp70 содержат мелиттинподобный модуль.

Ключевые слова: мелиттин, Na^+/K^+ -АТФаза, Hsp70, мелиттинподобные белки

DOI: 10.31857/S0026898423060216, **EDN:** QLKRWL

Мелиттин — основной компонент яда европейской медовой пчелы *Apis mellifera*. По химической структуре это линейный пептид, состоящий из 26 аминокислотных остатков. N-концевая часть молекулы гидрофобна, в то время как C-концевой участок пептида гидрофилен и заряжен положительно. При физиологическом значении pH молекула мелиттина имеет заряд +6, причем четыре заряда расположены на C-конце молекулы (остатки лизина и аргинина), а два — на N-концевой ее части.

Структурно мелиттин представляет амфипатическую α -спираль, которая способна взаимодействовать с цитоплазматической мембраной [1]. При встраивании в мембрану эритроцитов мелиттин вызывает их гемолиз, причем сначала повы-

шается проводимость для ионов натрия и калия и только после этого происходит высвобождение гемоглобина [2]. Первая быстрая фаза этого процесса соответствует связыванию положительно заряженной C-концевой части молекулы мелиттина с мембраной, медленная фаза обусловлена перестройкой липидного бислоя и белковых комплексов в мембране.

Помимо воздействия на мембраны для мелиттина описано и специфическое действие на белки. По-видимому, мелиттин структурно похож на модуль внутриклеточных белков, который принимает участие в белок-белковых взаимодействиях. В частности, он имитирует участок связывания кальмодулина с его белковыми мишенями [3]. Известно, что каталитические субъединицы АТФаз Р-типа также специфически связывают мелиттин [4, 5]. Пептид взаимодействует с последовательностью MI/LDPPR, которая находится в

Сокращения. ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; HRP (horse radish peroxidase) — пероксидаза хрена.

α -субъединице H^+/K^+ -АТФазы из слизистой оболочки желудка [6]. Похожая последовательность присутствует во всех изоформах Na^+/K^+ -АТФазы (M(591)DPPRAA) и в Ca^{2+} -АТФазе саркоплазматического ретикулума (M(599)LDPPRKE). Белок с молекулярной массой около 70 кДа, взаимодействующий с антителами против мелиттина, был обнаружен в клетках слизистой оболочки желудка и в гомогенатах из скелетных мышц кролика. Этот белок непосредственно взаимодействует с цитоплазматическим участком полипептидной цепи α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы [5].

Цель работы заключалась в идентификации в почках мыши мелиттинподобных белков с молекулярной массой около 70 кДа, взаимодействующих с Na^+/K^+ -АТФазой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использованы ЭДТА, дезоксихолат натрия, глицин, мышинные моноклональные антитела против Hsp70 (Lot: 029K4845, “Sigma-Aldrich”, США), Tris, перекись водорода, коктейль ингибиторов протеаз, CHAPS и PMSF (“Sigma-Aldrich”); Affi-gel 10, акриламид, метилен-бис-акриламид и другие реагенты для проведения электрофореза в ПААГ (“Bio-Rad”, США); PVDF-мембраны (“ICN Biomedical”, США); Triton X-100, глутаровый альдегид, имидазол (“Merck”, Германия); Coomassie R-250 (“Serva”, Германия). Мелиттин из яда пчелы (свободный от фосфолипазы A2), полученный методом ВЭЖХ, покупали у фирмы “Аура” (Россия).

Получение модифицированного мелиттином аффинного сорбента. Для получения аффинного сорбента для выделения мелиттинспецифичных антител использовали сорбент Affi-gel 10. Сначала 5 мл геля дважды промывали 5-кратным объемом холодной деионизованной воды и один раз 5-кратным объемом холодного раствора 100 мМ MOPS (pH 7.4). Навеску мелиттина (75 мг) растворяли в 10 мл 100 мМ MOPS, pH 7.4 (из расчета 15 мг мелиттина на 1 мл геля). Раствор мелиттина (10 мл) добавляли к 5 мл носителя и инкубировали при перемешивании при 4°C в течение 2.5 ч. Жидкость декантировали, добавляли двукратный объем 100 мМ раствора MOPS (pH 7.4), в который для блокировки свободных сукцинимидных групп вносили 0.5 мл 1 М раствора этаноламина, pH 8.0 (из расчета 100 мкл раствора на 1 мл носителя). Полученную суспензию инкубировали в течение 1 ч при 4°C.

Получение поликлональных антител против мелиттина. Поликлональные антитела против мелиттина, сшитого 3%-ным глутаровым альдегидом (для повышения иммуногенности), были получены путем иммунизации кроликов, как описано ранее [5]. Антитела очищали с использованием мо-

дифицированного мелиттином Affi-gel 10. Готовый аффинный носитель объемом 5 мл и емкостью 15 мг белка на 1 мл помещали в хроматографическую колонку, в которую вносили частично очищенные антитела со скоростью 20 мл/ч. Носитель промывали последовательно 10-кратным объемом PBS (pH 7.2) с 0.1% Tween-80 (PBST), 5-кратным объемом буфера 100 мМ Gly-HCl (pH 2.5) и 10-кратным объемом PBST до нулевого значения оптической плотности. Фракцию не сорбирувавшихся на колонке белков элюировали PBST, содержащим 0.2% NaN_3 , а затем тем же раствором, содержащим дополнительно 300 мМ NaCl. Для элюции антител с колонки использовали буфер 100 мМ Gly-HCl, pH 2.5. В полученном препарате антител pH доводили до нейтральных значений с помощью 1 М раствора NaHCO_3 (pH 8.0) и диализовали дважды против PBS, содержащего 0.2% NaN_3 .

Концентрацию белка во фракциях, полученных в ходе аффинной хроматографии, определяли методом Лоури [7]. В качестве стандарта использовали раствор БСА (“Thermo Fisher Scientific”, США) с концентрацией 2 мг/мл.

Препарат антител, связывающихся с мелиттином, использовали в качестве лиганда для получения аффинного сорбента (по методике, приведенной выше для мелиттина) с целью выделения мелиттинподобных белков из гомогената почек мыши (к 1 мл носителя добавляли 6 мг антител).

Электрофорез белков в SDS-ПААГ и иммуноблоттинг. Фракции элюата, полученные в ходе аффинной хроматографии, анализировали электрофорезом в 10%-ном SDS-ПААГ. Электроперенос белков с геля на PVDF-мембрану проводили в течение 1 ч 30 мин при силе тока 200 мА. После окончания электропереноса мембрану блокировали в 5%-ном сухом молоке (“Valio”, Финляндия), приготовленном на PBST, в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Далее добавляли поликлональные антитела, специфичные к мелиттину и очищенные методом аффинной хроматографии, в разведении 1 : 1000 и инкубировали мембрану в течение 1 ч при комнатной температуре и перемешивании. Мембрану отмывали PBST от несвязавшихся первичных антител 3 раза по 10 мин и инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) мышинными антителами против IgG кролика (“Sigma-Aldrich”) в разведении 1 : 5000 в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации комплексов антиген-антитело использовали коммерческий набор ECL-kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (“Thermo Fisher Scientific”) и прибор ChemiDoc XRS+ Molecular Imager (“Bio-Rad”).

Очистка мелиттинподобных белков. Фракция мелиттинподобных белков с молекулярной мас-

сой ~70 кДа была очищена из гомогената почек мыши с использованием метода аффинной хроматографии [8]. Все операции по получению гомогената проводили при 4°C. Почки двух мышей общей массой 0.93 г измельчали ножницами, добавляли 10-кратный объем среды выделения (30 мМ имидазол, pH 7.4, 130 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 1.1% Triton X-100, 0.25% CHAPS, 2 мкМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз). Коктейль ингибиторов протеаз и PMSF вносили непосредственно перед выделением. Ткань гомогенизировали с помощью гомогенизатора Potter-Elvehjem ("Kleinfeld", США). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13000 g, осадок удаляли, а супернатант пропускали через бумажный складчатый фильтр. Далее супернатант в объеме 8 мл наносили на колонку с носителем Affi-gel 10 с иммобилизованными антителами, специфичными к мелиттину. Не связавшиеся с носителем компоненты сыворотки отмывали PBST с 0.2% NaN₃ и затем тем же раствором, содержащим дополнительно 300 мМ NaCl. Для элюции мелиттинподобных белков использовали буфер 100 мМ Gly-HCl (pH 2.5). Во фракциях, содержащих мелиттинподобные белки, pH доводили до нейтральных значений раствором 1 М NaHCO₃ (pH 8.0). Полученный препарат мелиттинподобных белков анализировали методами электрофореза по Лэммли [9] и иммуноблотинга.

Идентификация мелиттинподобных белков. Целевые фракции аффинной хроматографии анализировали методами электрофореза в 10%-ном SDS-ПААГ и иммуноблотинга с использованием в качестве первичных антител мелиттинсвязывающей фракции сыворотки кролика (см. выше), а в качестве вторичных — HRP-конъюгированные мышинные антитела против IgG кролика.

Кроме того, проведен масс-спектрометрический анализ полученных белков. Препараты мелиттинподобных белков для масс-спектрометрического анализа готовили следующим образом. Реактивы для электрофореза фильтровали через фильтры с размером пор 0.45 мкм в ламинарном боксе. Образцы белковой фракции наносили на ПААГ и проводили электрофорез при силе тока 25 мА в концентрирующем и 50 мА в разделяющем гелях по методу Лэммли. Гель окрашивали раствором Coomassie R-250. В ламинарном боксе из геля вырезали белковые полосы, измельчали их на кубики размером 1 мм × 1 мм и помещали в 100 мкл деионизованной воды. Полученные образцы белков анализировали в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Москва) с использованием метода tandem-масс-спектрометрии, сопряженной с ВЭЖХ с нанопотоками (LC-MS/MS).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлен профиль элюции сыворотки крови иммунизированного кролика (30 мл с концентрацией белка 3 мг/мл) на колонке с Affi-gel 10 с иммобилизованным мелиттином.

Фракцию поликлональных антител, элюированных с колонки после резкой смены pH, анализировали методом иммуноблотинга с окрашиванием вторичными антителами — HRP-конъюгированными антителами мыши против IgG кролика. На рис. 2 представлены результаты электрофореза этой фракции (2a) и последующего иммуноблотинга (2б) с использованием вторичных антител, а также детекция мелиттина на PVDF-мембране с использованием полученной сывороточной фракции антимелиттиновых антител (2в).

Как видно на рис. 2б, мышинные антитела против IgG кролика связываются с двумя белковыми полосами — с кажущимся молекулярным массам ~55 и ~25 кДа, которые соответствуют тяжелым и легким цепям IgG. Показано, что объединенный образец фракций 2–4 связывается с мелиттином (рис. 2в), то есть в очищенной аффинной хроматографией сыворотке кролика присутствуют целевые антитела.

Доказав, что полученные нами и очищенные методом аффинной хроматографии антитела связывают мелиттин, мы использовали их в качестве лиганда для аффинной хроматографии — с целью получения белков с мелиттинподобными детерминантами. Антитела, содержащиеся в объединенной фракции, иммобилизовали на носителе Affi-gel 10. Профиль элюции супернатанта, полученного после центрифугирования гомогената из почек мыши и нанесенного на Affi-gel 10 с иммобилизованными антителами на мелиттин, представлен на рис. 3. Белки, вышедшие с колонки при pH элюирующего буфера 2.5, проанализированы методами электрофореза в ПААГ и иммуноблотинга. Результаты анализа представлены на рис. 4.

Белки, находящиеся в белковой полосе с молекулярной массой ~70 кДа, анализировали с использованием технологии tandem-масс-спектрометрии, сопряженной с ВЭЖХ с нанопотоками (LC-MS/MS). Результаты анализа представлены в табл. 1.

Таким образом, масс-спектрометрический анализ показал, что в полученной нами фракции мелиттинподобных белков содержится семь белков, три из которых являются молекулярными шаперонами из суперсемейства Hsp70: mtHsp70 (морталин), Hsp73 и Grp78.

Для подтверждения этих данных мы провели иммуноблотинг фракции мелиттинподобных белков с использованием антител не только против мелиттина, но и против Hsp70. Как видно из

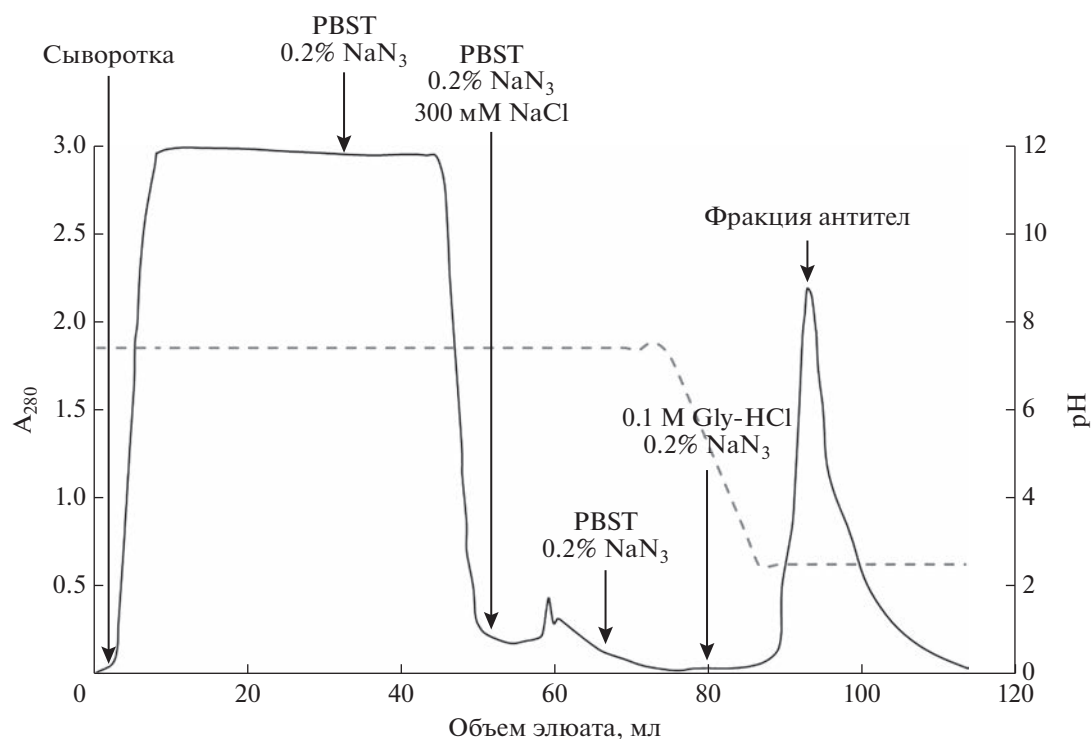


Рис. 1. Профиль элюции белков сыворотки крови кролика, иммунизированного мелиттином, с колонки с носителем Affi-gel 10, конъюгированной с мелиттином. Пунктирной линией указан градиент pH.

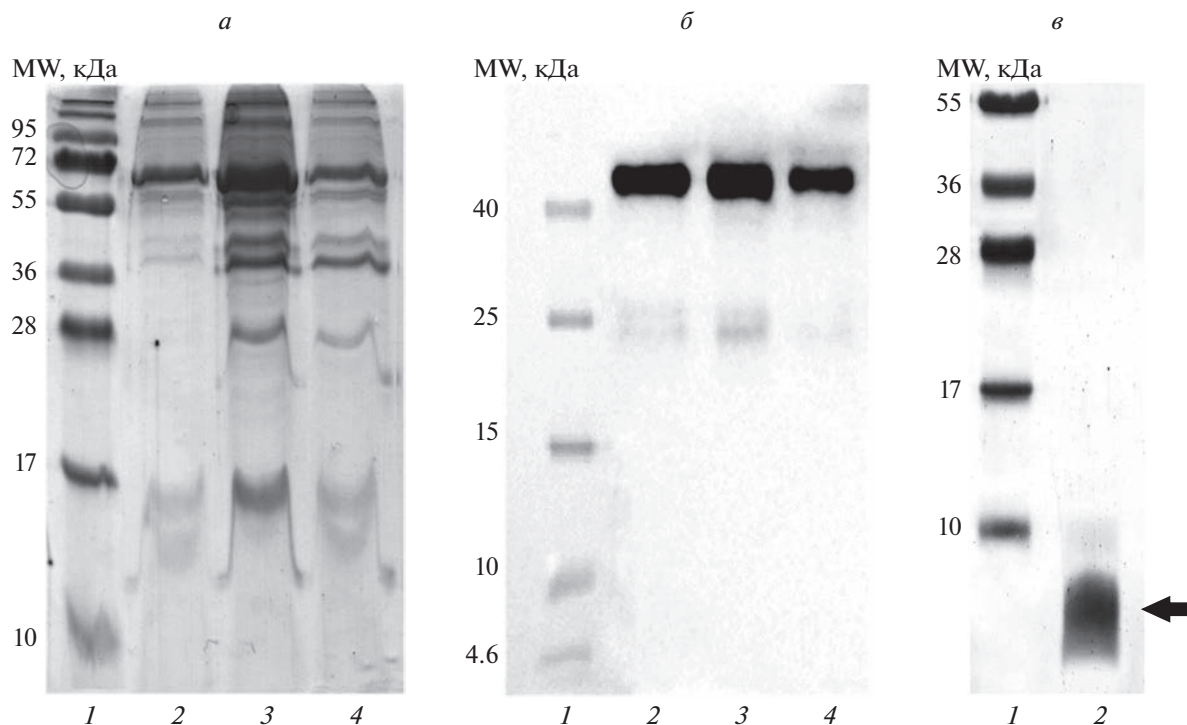


Рис. 2. Анализ белкового состава сыворотки иммунизированного мелиттином кролика в ходе аффинной хроматографии и анализ специфичности полученных антител. Анализ белкового состава фракций элюата аффинной хроматографии методом электрофореза в SDS-ПААГ (а) и идентификация фракций, содержащих IgG кролика, методом иммуноблотинга с использованием HRP-конъюгированных мышиных антител соответствующей специфичности (б). На дорожки 1а и 1в нанесены маркеры молекулярной массы белков PageRuler Plus Prestained Protein Ladder ("Thermo Fisher Scientific", США), 1б – Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder ("Thermo Fisher Scientific"); на дорожки 2–4 – фракции антител, соответствующие пику их элюции. Анализ специфичности антител (в) во фракциях, полученных в результате аффинной хроматографии, методом иммуноблотинга с использованием мелиттина (указано стрелкой) в качестве антигена.

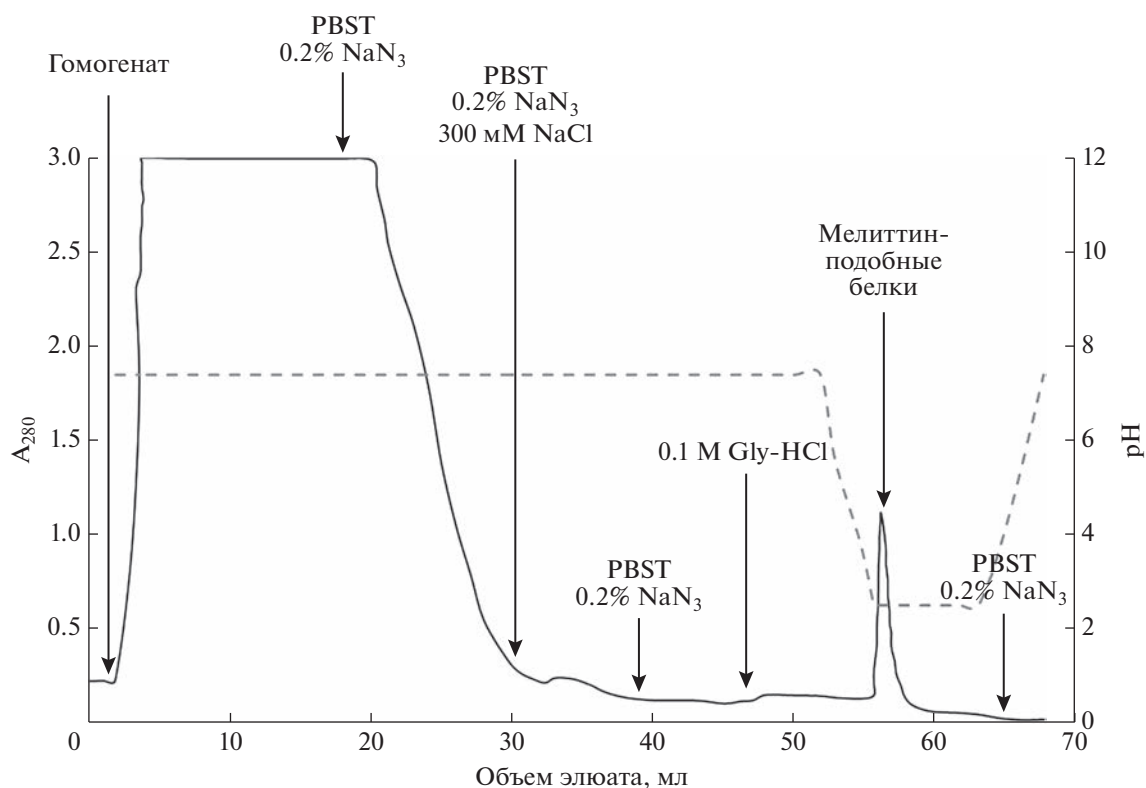


Рис. 3. Профиль элюции белков супернатанта, полученного из гомогената почек мыши, с носителя Affi-gel 10, на котором иммобилизованы антитела против мелиттина.

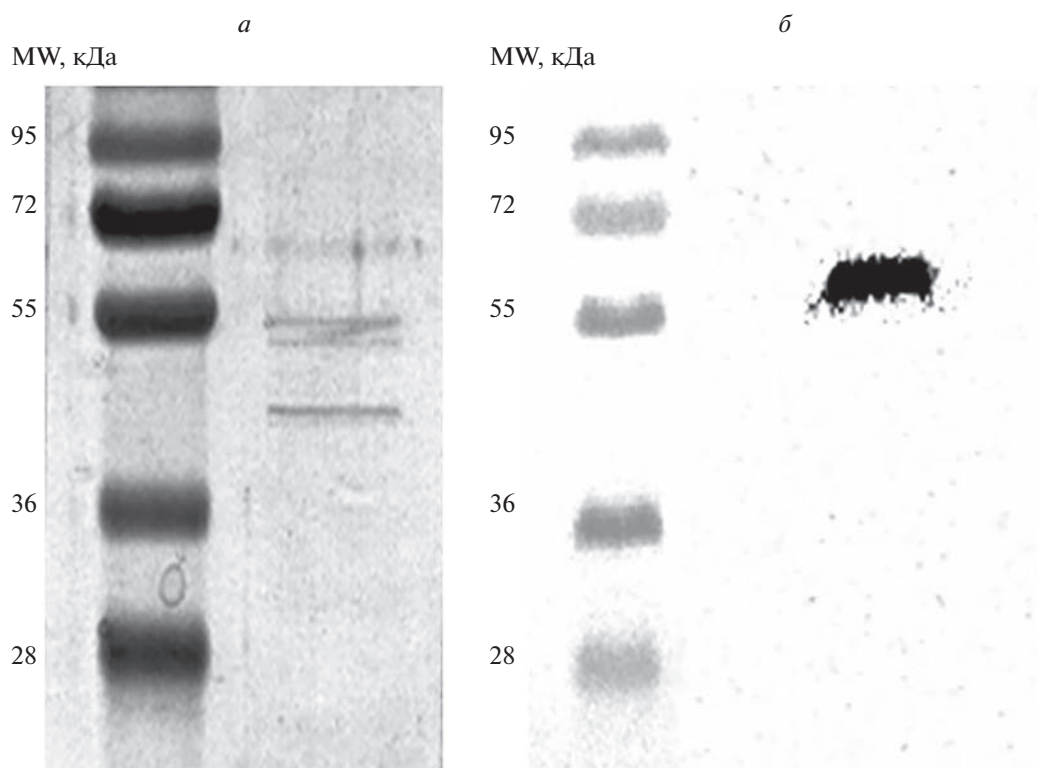


Рис. 4. Анализ фракции мелиттинподобных белков, полученной в результате аффинной хроматографии гомогената почек мыши (см. рис. 3). *а* – Электрофорез в 10%-ном SDS-ПААГ с окрашиванием Coomassie R-250; *б* – иммуноблоттинг с использованием антител против мелиттина, полученных из сыворотки кролика (см. рис. 2), и вторичных антител – HRP-конъюгированных мышиных антител против IgG кролика. Для маркировки молекулярной массы белков использован набор PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”).

MW, кДа

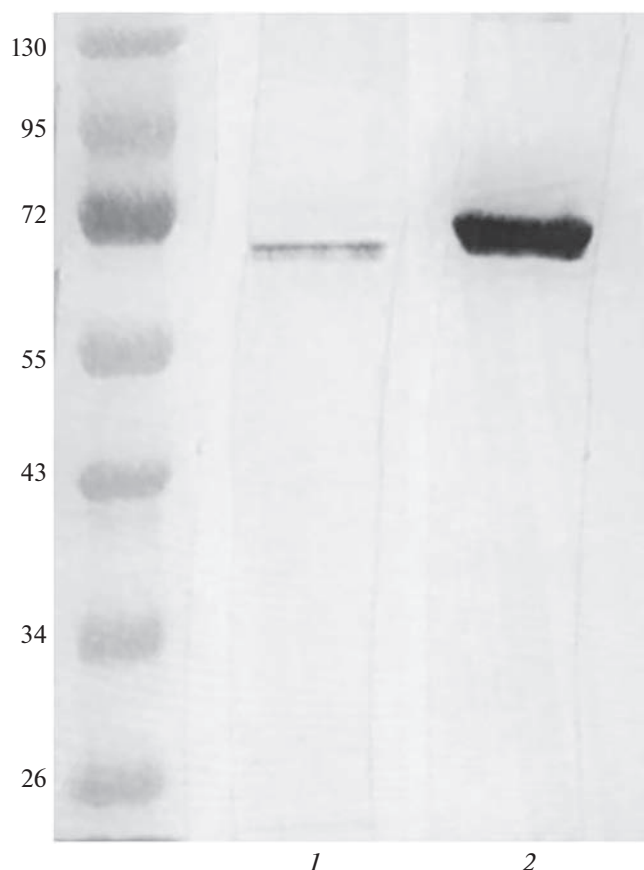


Рис. 5. Анализ мелиттинподобных белков с молекулярной массой ~70 кДа методом иммуноблоттинга с использованием антител против мелиттина (1) и Hsp70 (2). Для маркировки молекулярной массы белков использован набор Blue Plus® V Protein Marker ("TransGen Biotech Co.", Китай).

результатов, представленных на рис. 5, взаимодействующие с антителами против мелиттина белки связывались и с антителами против Hsp70.

Ранее мы обнаружили, что при иммунопреципитации Na^+/K^+ -АТРАЗы из гомогената почек мыши с использованием антител против $\alpha 1$ -субъединицы совместно с ней осаждаются белки с молекулярной массой около 70 кДа, которые окрашиваются антителами против мелиттина. При перекрестной иммунопреципитации — с использованием антител против мелиттина — в осадке обнаружили $\alpha 1$ -субъединицу Na^+/K^+ -АТРАЗы. Более того, предварительная обработка гомогената специфическим ингибитором Na^+/K^+ -АТРАЗы убаином в концентрации 0.5 мМ приводила к увеличению количества мелиттинподобного белка с молекулярной массой ~70 кДа в иммунопреципитате [8]. На основании этих данных мы предположили, что Na^+/K^+ -АТРаза взаимодействует с этим белком, а связывание Na^+/K^+ -АТРАЗы с убаином усиливает это взаимодействие.

В проведенном теперь исследовании получены белки, взаимодействующие с антителами против мелиттина, а методом масс-спектрометрии в этой фракции идентифицировано три белка-шаперона из суперсемейства Hsp70. Пока у нас нет информации о том, какой из них взаимодействует с Na^+/K^+ -АТРазой. Попробуем гипотетически объяснить факт увеличения количества мелиттинподобного белка, связывающегося с Na^+/K^+ -АТРазой в присутствии убаина. Скорее всего, убаин переводит Na^+/K^+ -АТРАЗу в конформацию, которая лучше взаимодействует с шапероном, что приводит удалению комплекса Na^+/K^+ -АТРаза—убаин из мембраны. Логично предположить, что это происходит под действием шаперона Hsp70,

Таблица 1. Мелиттинподобные белки из почек мыши с молекулярной массой ~70 кДа

Название белка; M_r	Локализация
mtHsp70 (морталин); 73 кДа	Митохондрии, эндоплазматический ретикулум, цитоплазматическая мембрана, цитоплазматические везикулы
Ацил-КоА-дегидрогеназа длинноцепочечных жирных кислот; 71 кДа	Внутренняя мембрана митохондрий
Субъединица А протонной АТРАЗы V-типа; 68 кДа	Цитоплазма, лизосомы, митохондрии, цитоплазматическая мембрана
Изоформа-2 комплекса MICOS, субъединица Mic60; 84 кДа	Внутренняя мембрана митохондрий
Grp78; 72 кДа	Эндоплазматический ретикулум
Hsp70; 71 кДа	Цитозоль, эндосомы, лизосомы, ядро, цитоплазматическая мембрана
Регуляторный кофактор Na^+/H^+ -обменника Nherf3; 57 кДа	Цитоплазматическая мембрана

который функционирует при фолдинге белков, а также при солюбилизации агрегированных белков [10].

Два других шаперона, обнаруженных во фракции мелиттинподобных белков (морталин и Grp78), также могут иметь отношение к удалению Na^+/K^+ -АТРАЗЫ из плазматической мембраны. Однако они относятся к шаперонам эндоплазматического ретикула и скорее имеют отношение к фолдингу и доставке Na^+/K^+ -АТРАЗЫ к плазматической мембране. Нами показано, что шаперон, взаимодействующий с Na^+/K^+ -АТРАЗой, содержит мелиттинподобный мотив, но ответ на вопрос о его функциональной значимости остается пока открытым. Предстоит выяснить и другие вопросы, поставленные результатами проведенного исследования: какой именно шаперон взаимодействует с Na^+/K^+ -АТРАЗой; приводит ли это взаимодействие к удалению фермента из мембраны и необходим ли для этого мелиттинподобный мотив.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raghuraman H., Chattopadhyay A. (2007) Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci. Rep.* **27**, 189–223.
2. Dempsey C.E. (1990) The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1031**, 143–161.
3. Kaetzel M.A., Dedman J.R. (1987) Identification of a 55-kDa high-affinity calmodulin-binding protein from *Electrophorus electricus*. *J. Biol. Chem.* **262**, 1818–1822.
4. Cuppoletti J., Abbott A.J. (1990) Interaction of melittin with the $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$: evidence for a melittin-induced conformational change. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 249–257.
5. Каманина Ю.В., Климанова Е.А., Дергоусова Е.А., Петрушанко И.Ю., Лопина О.Д. (2016) Идентификация участка полипептидной цепи α -субъединицы Na^+/K^+ -АТРАЗЫ, взаимодействующего с мелиттинподобным белком с молекулярной массой 67 кДа. *Биохимия.* **81**, 369–375.
6. Cuppoletti J. (1990) [^{125}I]azidosalicylyl melittin binding domains: evidence for a polypeptide receptor on the gastric $(\text{H}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 409–415.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
8. Долгова Н.В., Каманина Ю.В., Акимов О.А., Орлов С.Н., Рубцов А.М., Лопина О.Д. (2007) Белок, связывание которого с Na^+/K^+ -АТРАЗой регулируется убаином. *Биохимия.* **72**, 1061–1071.
9. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
10. Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 665–680.

Identification of the 67-kDa Melittin-Like Proteins Interacting with Na^+/K^+ -ATPase

L. A. Varfolomeeva¹, E. A. Klimanova^{2, *}, S. V. Sidorenko², D. A. Fedorov², and O. D. Lopina²

¹*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

*e-mail: klimanova.ea@yandex.ru

Melittin, a peptide from bee venom, was found to interact with many proteins, including calmodulin target proteins and ion-transporting P-type ATPases. It is assumed that melittin mimics a protein module involved in protein-protein interactions within cells. Previously, a Na^+/K^+ -ATPase containing the $\alpha 1$ isoform of the catalytic subunit was found to co-precipitate with a protein with a molecular weight of about 70 kDa that interacts with antibodies against melittin by cross immunoprecipitation. In the presence of a specific Na^+/K^+ -ATPase inhibitor (ouabain), the amount of protein with a molecular weight of 70 kDa was increased in the precipitate. In order to identify melittin-like protein from murine kidney homogenate, a fraction of proteins (with a molecular mass of approximately 70 kDa) was obtained using affinity chromatography with immobilized antibodies specific to melittin. By mass spectrometry analysis, the obtained protein fraction was found to contain three molecular chaperones of Hsp70 superfamily: mtHsp70 (mortalin), Hsp73 and Grp78. These data suggest that chaperones from the Hsp70 superfamily contain a melittin-like module.

Keywords: melittin, Na^+/K^+ -ATPase, Hsp70, melittin-like proteins

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 577.151.63

ЦИТОХРОМ *bd* КАК АНТИОКСИДАНТНЫЙ РЕДОКС-ФЕРМЕНТ¹

© 2023 г. В. Б. Борисов^{a, *}, М. R. Nastasi^b, E. Forte^b

^a Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^b Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, I-00185 Rome, Italy

*e-mail: bor@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 21.03.2023 г.

После доработки 01.06.2023 г.

Принята к публикации 01.06.2023 г.

Одна из основных функций ферментных комплексов, составляющих электрон-транспортные (дыхательные) цепи организмов, — поддержание клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза за счет окисления восстановительных эквивалентов: NADH и хинола. Цитохром *bd* — уникальная терминальная оксидаза цепей многих бактерий, в том числе патогенных. Этот редокс-фермент сопрягает окисление убинола или менахинола молекулярным кислородом с образованием протон-движущей силы — универсальной энергетической валюты. Последняя используется организмом для производства АТФ, еще одной энергетической валюты клетки, посредством окислительного фосфорилирования. *Escherichia coli* содержит две оксидазы типа *bd* — *bd*-I и *bd*-II, кодируемые оперонами *cydAB* и *appCB* соответственно. Удивительно, но оба фермента *bd* также вносят вклад в молекулярные механизмы поддержания соответствующего окислительно-восстановительного баланса в бактериальной клетке путем нейтрализации активных форм кислорода, таких как пероксид водорода. В представленном обзоре обобщены полученные за последнее время экспериментальные данные о редокс-модулируемых активностях цитохромов *bd*-I и *bd*-II *E. coli* в удалении H₂O₂. Также обсуждается возможность наличия таких антиоксидантных свойств у цитохромов *bd* других бактерий.

Ключевые слова: редокс-фермент, дыхательная цепь, цитохром *bd*, гем, пероксид водорода, *Escherichia coli*, терминальная оксидаза, активные формы кислорода, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0026898423060034, EDN: QOYAOW

Cytochrome *bd* as Antioxidant Redox Enzyme

V. B. Borisov^{1, *}, M. R. Nastasi², and E. Forte²

¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

²Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, I-00185 Rome, Italy

*e-mail: bor@belozersky.msu.ru

One of the main functions of enzyme complexes that constitute electron transport (respiratory) chains of organisms is to maintain cellular redox homeostasis by oxidizing reducing equivalents, NADH and quinol. Cytochrome *bd* is a unique terminal oxidase of the chains of many bacteria including pathogenic species. This redox enzyme couples the oxidation of ubiquinol or menaquinol by molecular oxygen to the generation of proton motive force, a universal energy currency. The latter is used by the organism to produce ATP, another cellular energy currency, via oxidative phosphorylation. *Escherichia coli* contains two *bd*-type oxidases, *bd*-I and *bd*-II, encoded by the *cydAB* and *appCB* operons, respectively. Surprisingly, both *bd* enzymes make a further contribution to molecular mechanisms of maintaining the appropriate redox balance in the bacterial cell by means of elimination of reactive oxygen species, such as hydrogen peroxide. This review summarizes recent data on the redox-modulated H₂O₂-scavenging activities of cytochromes *bd*-I and *bd*-II from *E. coli*. The possibility of such antioxidant properties in cytochromes *bd* from other bacteria is also discussed.

Keywords: redox enzyme, respiratory chain, cytochrome *bd*, heme, hydrogen peroxide, *Escherichia coli*, terminal oxidase, reactive oxygen species, oxidative stress

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 577.127.3

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕГИДРАТАЗЫ δ -АМИНОЛЕВУЛЕНОВОЙ КИСЛОТЫ ХОЛОДНОВОДНОЙ ГУБКИ *Halisarca dujardinii*

© 2023 г. О. И. Кравчук^{a, *}, А. Д. Фиошин^a, К. В. Михайлов^{b, c}, Р. Х. Зиганшин^d,
К. И. Адамейко^a, Н. Г. Горностаев^a, А. И. Жураковская^a, В. С. Михайлов^a,
Е. И. Шагимарданова^e, Ю. В. Люпина^a

^aИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^bНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

^cИнститут проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, 127051 Россия

^dИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва, 117997 Россия

^eНаучный центр “Регуляторная геномика”, Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420012 Россия

*e-mail: kravchuk444@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 02.06.2023 г.

Принята к публикации 20.06.2023 г.

Дегидратаза δ -аминолевуленовой кислоты (ALAD) — ключевой фермент цитоплазматического пути биосинтеза гема. В работе представлены структура гена *ALAD* холодноводной морской губки *Halisarca dujardinii*, мультимерная организация ALAD/hemB, а также особенности экспрессии *ALAD* губки в разные периоды ее репродуктивного годового цикла. В регуляции экспрессии гена *ALAD* губок может участвовать транскрипционный фактор GATA-1 и метилирование ДНК. Реагрегация клеток губок сопровождается снижением экспрессии *ALAD* и изменением содержания активной формы ALAD/hemB в клетках. Изучение процессов биосинтеза гема и роли ALAD/hemB в морфогенетических процессах у базальных животных позволит открыть новые возможности для коррекции патологий у высших животных.

Ключевые слова: биосинтез гема, дегидратаза δ -аминолевуленовой кислоты, базальные животные, пластичность

DOI: 10.31857/S0026898423060113, EDN: QFTCTO

Тетрапирролы, в том числе и железокоординированный протопорфирин IX и гем, необходимы для жизнедеятельности всех организмов на Земле. Метаболический путь биосинтеза различных тетрапирролов (порфирин, хлорофилл, витамин B12, билины и гем цитохромов) у всех организмов — от бактерий до млекопитающих — включает образование фотореактивных промежуточных продуктов из 5- δ -аминолевуленовой кислоты (delta-aminolevulinic acid, 5-ALA). Этот эволюционно древний путь обеспечивает метаногенез, фотосинтез и дыхание [1]. Белки, участвующие в биосинтезе гема, вовлечены в морфогенетический процесс — реагрегацию клеток губок [2]. Избыток свободного гема токсичен из-за его способности индуцировать окислительный стресс и перекисное окисление липидов, что приводит к повреждению мембран и гибели клеток по механизму ферроптоза [3]. Концентрация внутриклеточ-

ного гема контролируется на этапах его синтеза, связывания гемопroteинами, внутриклеточного и межклеточного транспорта и деградации. Фермент дегидратаза δ -аминолевуленовой кислоты (delta-aminolevulinic acid dehydratase, ALAD/hemB) катализирует конденсацию двух молекул 5-ALA с образованием порфобилиногена. У животных ALAD/hemB находится в цитозоле, у растений, водорослей и простейших из группы *Apicomplexa* белки ALAD/hemB имеют пластидное происхождение и локализуются в пластидах. Контроль биосинтеза тетрапирролов обеспечивается регуляторными механизмами, чувствительными к изменению концентрации кислорода и железа в клетках, а также аллостерическим механизмом регуляции активности ALAD/hemB. ALAD/hemB существует в виде функционально различных мультимеров (активная форма — октамер, неактивная форма — гексамер). У животных октамерная

форма стабилизируется нейтральным значением pH и наличием 5-ALA, а у растений — ионами магния. Активация ALAD/hemB в хлоропластах растений происходит при воздействии света, сопровождающимся резким изменением концентрации ионов магния [1]. Стабилизаторы гексамерной формы — аллостерические регуляторы класса малых молекул, получившие название морфлоки, или “морфологические замки” (morphlock), приводят к метаболическим нарушениям в клетках [4]. Предполагают, что филогенетически изменчивая аллостерическая регуляция ALAD/hemB возникла из-за значительной разницы в условиях среды, в которой обитают организмы, и филогенетических особенностей внутриклеточной локализации.

Структура, мутации, а также особенности экспрессии гена *ALAD* изучают у высших животных в связи с важной ролью эритроидной изоформы ALAD/hemB, нарушения в функционировании которой у человека приводят к проявлениям порфирии. Кроме того, ALAD/hemB рассматривают в качестве мишени для таргетной терапии разных форм рака, поскольку установлено, что снижение экспрессии ALAD в опухолевых клетках, активирующее фактор роста опухоли (TGF- β), индуцирует эпителиально-мезенхимальную трансформацию и рост опухоли [5, 6].

Фермент ALAD/hemB человека кодируется одним геном, а мультимер ALAD/hemB состоит из нескольких копий этого белка. Каждая субъединица ALAD/hemB состоит из 300 остатков $\alpha\beta$ -бочкообразного домена, в центре которого находится активный сайт фермента, и бокового плеча домена, содержащего более 25 а.о. Ген *ALAD* человека содержит два некодирующих (1A и 1B) и 11 кодирующих экзонов. Первым экзоном может быть или 1A, или 1B. Транскрипт основной (housekeeping) формы включает экзон 1A, тогда как эритроидный транскрипт — экзон 1B [7]. Альтернативный сплайсинг приводит к множеству вариантов транскриптов, кодирующих разные изоформы. Слияние экзонов 1A и 1B со вторым, в котором находится старт трансляции, приводит к тому, что все ткани содержат идентичный фермент ALAD/hemB, но мРНК существует в двух формах: основной (1A) и эритроидной (1B). Аналогично устроен ген *ALAD* мыши [8]. Экспрессия 1A- и 1B-мРНК идет с разных промоторов с разными регуляторными элементами. Оба промотора содержат CG-богатые последовательности и сайты связывания для транскрипционного фактора GATA-1, но только эритроидный промотор связывает транскрипционный фактор KLF-1 [9]. Метилирование гена *ALAD* приводит к снижению его экспрессии [10]. Структура гена *ALAD* и мультимерная организация ALAD/hemB у базальных животных не изучены.

Губки (Porifera) традиционно считаются древнейшим типом животных [11]. Как и другие животные, морские губки развиваются только в присутствии ионов железа [12] и устойчивы к гипоксии. Это обусловило их использование в качестве модели для исследования ранней эволюции метаболизма железа у животных, которая происходила на фоне глобальной оксигенизации. Клетки губок способны к трансдифференцировкам и дедифференцировкам (то есть, трансформации одного клеточного типа в другой и в плюрипотентную клетку), обеспечивающим непрерывную реорганизацию их водоносной системы. Клеточная пластичность губок проявляется в процессе регенерации их тела и реагрегации диссоциированных клеток, при которой происходит восстановление исходной структуры губки [13, 14]. Трансформации клеток губки в этих процессах могут быть аналогичны процессам, происходящим в стволовых клетках высших животных [15]. Симбионты морских губок (бактерии, водоросли и грибы), реализуя сходные метаболические пути, производят вторичные метаболиты, а также мощные токсины, отпугивающие хищников и конкурентов, и создают губкам оптимальные условия для существования. Ранее нами показано, что в процессе реагрегации клеток губок происходит повышение уровня экспрессии нейроглобина, белков, ответственных за обмен железа, а также транскрипционного фактора HIF [2, 16].

Нами исследована структура гена *ALAD* холодноводной морской губки *Halisarca dujardini*, описана мультимерная организация белка ALAD/hemB, а также особенности экспрессии *ALAD* губки в разные периоды ее годового репродуктивного цикла, который сопровождается изменениями разных параметров: температуры, степени оксигенации морской воды и интенсивности ультрафиолетового излучения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материал исследования. Образцы губок *Halisarca dujardini* были собраны в сублиторальной зоне (0–2 м) в районе Беломорской биологической станции МГУ (66°34' N 33°08' E). Сбор губок проводили в разные периоды их репродуктивного годового цикла: январе, марте, июле и ноябре [17]. Образцы губок собирали с субстратом (водорослями) для сохранения микроокружения и 7–8 особей помещали в 5-литровый аквариум с природной морской водой. Аквариум размещали в термобоксе с контролем температуры: 1–4°C зимой, 8–10°C летом и 5–8°C весной/осенью — и транспортировали в ИБР РАН. Перед экспериментом у губок выявляли функциональную целостность водоносной системы — по наличию фильтрации воды через оскулы — и очищали от сопутствующих беспозвоночных [2].

Подготовка препаратов диссоциированных клеток и клеточных агрегатов. Препараты диссоциированных клеток и клеточных агрегатов губки *H. dujardinii* получали по методике, описанной нами ранее [2, 16]. Клеточную суспензию центрифугировали 5 мин при 300 g. Количество и процент живых клеток (обычно более 96–98%) определяли в 10 мкл суспензии, смешанной с 10 мкл 0.1%-ного трипанового синего, с помощью стандартного гемоцитометра. Время от диссоциации губки до фиксации образцов и выделения РНК составляло 20 мин. Из клеточной суспензии и интактной губки (тело губки) выделяли РНК. Часть клеточной суспензии в концентрации 1×10^7 клеток/мл вносили в лунки 6-луночного планшета (2 мл/лунка) и инкубировали 24 ч при соответствующей температуре для получения агрегатов, после чего их собирали в пробирки и выделяли РНК [2].

Выделение РНК, конструирование библиотек кДНК и секвенирование. РНК выделяли с использованием TRI Reagent (“Molecular Research Center, Inc.”, США), обрабатывали ДНКазой I (“Ambion”, США) и очищали с помощью Ribo-zero rRNA Removal Kit (Human/Mouse/Rat) (“Illumina”, США). Фрагменты кДНК для библиотек получали с использованием NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina® (“New England Biolabs”, США), проверяли, используя Agilent 2100 DNA High Sensitivity Kit, и секвенировали на Illumina HiSeq2500 с парноконцевыми чтениями длиной 125 п.н. мРНК. Для одноконцевых прочтений длиной 50 п.н. выделение из суммарной РНК проводили с помощью NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (“New England Biolabs”). Далее проводили конструирование библиотек кДНК и их секвенирование на приборе Illumina HiSeq 2500.

Транскриптомная сборка и анализ дифференциальной экспрессии. На основе транскриптомной сборки [2] произведено предсказание белковых продуктов с помощью TransDecoder v.5.5 [18]. Предсказанные продукты были проверены с помощью черновой сборки генома. Одноконцевые прочтения интактных губок (тело губки), диссоциированных клеток и агрегатов губок, собранных в разные сезоны, были картированы на транскриптомную сборку с помощью bowtie 2 v.2.4.1 [19]. Уровни экспрессии транскриптов были рассчитаны с помощью RSEM v1.3.3 [20], как описано ранее [16, 21].

Структура гена и транскриптов ALAD. На основании черновой геномной сборки и последовательности транскрипта ALAD (QEH04756, NCBI) определена экзон-интронная структура. Поиск CpG-островков проводили с помощью программы CpGplot на сайте EMBOS (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/). Поиск ми-

норной изоформы ALAD проводили путем картирования транскриптомов (NCBI, проект PRJNA594150) на участке размером 10 т.п.н. с геном ALAD. Использовали следующие шаблоны последовательностей сайтов связывания транскрипционных факторов: (A/T)(A/G)GATA для GATA1; CCAAT для PCBP1; (T/G)GGGCGG(G/A)(G/T) для SP1; CCCACCC для KLF1.

Филогенетическое древо белка ALAD губок. Аминокислотные последовательности ALAD искали при помощи NCBI BLAST 2.2.29+ [22]. Для неаннотированных геномов губок последовательности ALAD предсказывали при помощи exonerate 2.2.0 [23], используя данные по белку ALAD других губок в качестве запроса. Выравнивание аминокислотных последовательностей выполняли в программе MEGA X с помощью ClustalW. Выравнивание для построения дерева выполняли с использованием инструмента MAFFT v7.130b [24] при помощи алгоритма L-INS-i. Перед построением дерева из выравнивания удаляли столбцы, состоящие более чем на 90% из пробелов. Реконструкцию филогенетического дерева выполняли методом максимального правдоподобия с IQ-TREE 1.6.12 [25]; выбор модели эволюции проводили автоматически с ModelFinder [26]; поддержка узлов дерева оценена при помощи сверхбыстрого бутстрэпа UFBoot [27] с 1000 репликами. Для визуализации реконструированного дерева использовали инструмент MEGA 7.0.21 [28].

Анализ аминокислотных последовательностей ALAD. Пространственное моделирование по гомологии проводили с использованием веб-сервера SWISS-MODEL, как описано ранее [16]. В качестве основного шаблона для модели ALAD *H. dujardinii* использовали структуру ALAD *Homo sapiens* (PDB: 5HMS). На основе результатов SWISS-MODEL подготовили молекулярные графики с использованием программного обеспечения PyMOL версии 2.5.2 (http://citebay.com/how-to-cite/pymol/).

Электрофорез в нативных условиях. Для выявления нативных форм фермента ALAD фрагменты тела, суспензию клеток и агрегаты губки *H. dujardinii* измельчали в буфере для гомогенизации (20 mM ЭДТА, 50 mM HEPES, pH 7.0, 200 mM NaCl) в соотношении 1 : 3, добавляли 5 мкл 0.2 M PMSF и 1 мкл коктейля ингибиторов протеаз (“Sigma”, США) и центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при 4°C. Осветленный гомогенат (супернатант) отбирали и смешивали с буфером для нанесения образцов (50% сахараоза, 0.01% бромфенолового синего) в соотношении 5 : 1. Электрофорез проводили в нативном 12.5%-ном ПААГ [29] в буферной системе TBE (7.6 мл H₂O, 1 мл 10× TBE-буфера, 1.2 мл 30% акриламид/бис-акриламид), 40 мкл 0.5 M АТФ, 50 мкл 1 M MgCl₂, 100 мкл 10% PSA, 10 мкл TEMED) при 6–8°C в

камере для электрофореза (“Bio-Rad”, США). В лунки вносили по 25–40 мкг осветленного гомогената.

SDS-ПААГ-электрофорез. Аликвоты осветленного гомогената, содержащие 80 мкг белка, разводили в буфере для нанесения образцов, выдерживали в течение 4 мин на водяной бане при 95°C и затем проводили денатурирующий электрофорез в 12%-ном SDS-ПААГ (160 V).

Иммуноблоттинг для идентификации белка ALAD. Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”) проводили в буфере для “мокрого” переноса с SDS (25 mM Трис, 92 mM глицин, 0.05% SDS с метанолом, pH 8.3) в течение 12 ч при постоянном токе 30 V и 4°C. После переноса белков из геля мембрану помещали в чашку Петри и заливали красителем Понсо на 30 с, затем отмывали дистиллированной водой 2–3 раза и помещали в TNT-буфер (20 mM Трис-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.01% Tween-20). Мембрану в течение 2 ч инкубировали с поликлональными антителами кролика (#ARP41657_P050; “Aviva Systems Biology”, Канада; разведение 1 : 1000) к структурному домену белка ALAD, отмывали TNT-буфером и блокировали 5%-ным молоком (“GE Healthcare”, США) на TNT-буфере. В качестве вторичных использовали антитела козы против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (goat anti-rabbit IgG (H + L) cross-adsorbed secondary antibody, HRP; “Invitrogen”, США). Для детекции хемилюминесценции использовали набор ECL Luminol Enhancer Solution (“GE Healthcare”). Результаты обрабатывали в программе ImageJ. Содержание белка ALAD оценивали по отношению к общему белку в пробе.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Зоны, соответствующие подвижности белка ALAD, вырезали из геля, окрашенного Coomassie R250. Для протеолиза использовали трипсин. Образцы загружали на преколонку размером 50 × 0.1 мм (Inertsil ODS-3 HPLC Column 3 μm; “GL Sciences”, Япония) в растворе, содержащем 2% ацетонитрила, 98% H₂O, 0.1% трифторуксусной кислоты, при скорости потока 4 мкл/мин. Хроматографию проводили при комнатной температуре на колонке из плавленного кварца (300 × 0.1 мм), изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (“Sutter Instrument”, США), с сорбентом ReproSil-Pur C18-AQ 1.9 μm (“Dr. Maisch”, Германия). Обращеннофазовую хроматографию проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System (“Thermo Fisher Scientific”, США), соединенном с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (“Thermo Fisher Scientific”) посредством наноэлектроспрейного источника (“Thermo Fisher Scientific”). Для хроматографического разделения пептидов использовали систему растворителей А (99.9% вода, 0.1% муравьи-

ная кислота) и Б (19.9% вода, 0.1% муравьиная кислота, 80% ацетонитрил). Пептиды элюировали с колонки линейным градиентом: 3 → 35% Б в течение 55 мин; 35 → 60% Б в течение 5 мин, 60 → 99% Б в течение 0.1 мин, 99% Б в течение 10 мин, 99 → 3% Б в течение 0.1 мин – при скорости потока 500 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме DDA (TopN = 10) со следующими настройками прибора: MS1 сканирование – разрешение 70000, диапазон сканирования – 200–1600 m/z, максимальное время инъекции ионов – 35 мс, уровень AGC – 3×10^6 , MS2 сканирование – разрешение 17 500, HCD фрагментация с энергией 30%, максимальное время инъекции ионов – 80 мс, уровень AGC – 1×10^5 .

Анализ данных масс-спектрометрии. Полученные данные анализировали при помощи компьютерной программы Peaks studio 10.0 (“Bioinformatics Solutions Inc.”) [30]. Идентификацию белков проводили посредством корреляции tandemных масс-спектров с базой данных аминокислотных последовательностей *Halisarca dujardinii* (NCBI, PRJNA594150), полученной нами ранее, со следующими параметрами: постоянная модификация – Cys-карбамидометилирование, переменные модификации – дезамидирование Asn/Gln и окисление Met, допустимый уровень ложноположительных identifications пептидов – 0.01 (определялся по реверсной базе данных аминокислотных последовательностей), специфичность протеазы – C-концевые остатки Arg и Lys (при поиске в базе данных допускалось до двух пропущенных сайтов гидролиза). При идентификации пептидов допускалось отклонение экспериментально полученной массы пептида от его теоретической массы до 10 мДа, а отклонение массы фрагментов – до 0.05 Да.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У губки *H. dujardinii* найден один ген *ALAD*. В его состав входит 9 экзонов, а промоторная область обладает сходством с housekeeping-промотором гена человека: по CG-богатой последовательности и сайту связывания с транскрипционным фактором GATA-1 (рис. 1). На основе транскриптомных сборок для *H. dujardinii*, описанных нами ранее (NCBI: PRJNA594150), идентифицирована мажорная изоформа *ALAD*, включающая 9 экзонов, и укороченные транскрипты. Найденные элементы позволяют предположить, что в регуляцию экспрессии гена *ALAD H. dujardinii*, как и у млекопитающих, вовлечены транскрипционный фактор GATA-1 и метилирование ДНК. Наличие нескольких транскриптов *ALAD* описано ранее у моллюсков [31]. Укороченные формы *ALAD* обнаружены также при некоторых мутациях гена *ALAD* у человека [32].

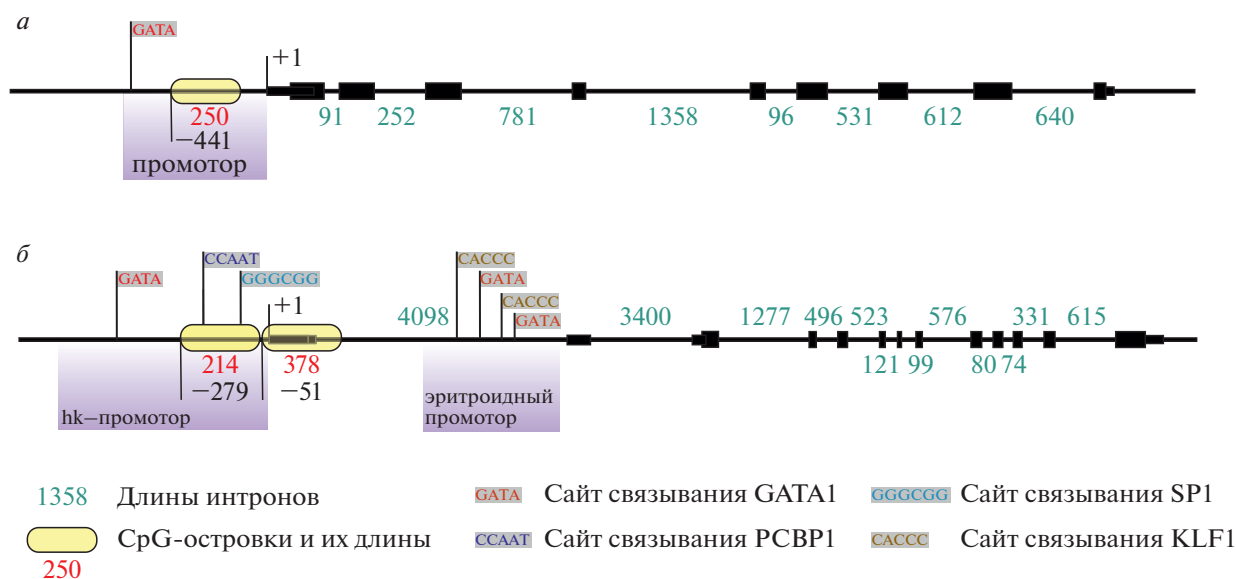


Рис. 1. Структура генов *ALAD H. dujardinii* (а) и человека (б). Черными прямоугольниками обозначены экзоны, узкие прямоугольники соответствуют нетранслируемым областям. Синими цифрами указаны размеры интронов, красными — размеры CpG-островков, буквами на сером фоне — последовательности сайтов связывания. Длина 5'-нетранслируемой области (5'UTR) мРНК *ALAD H. dujardinii* подтверждена экспериментально. hk — housekeeping промотор; транскрипционные факторы: GATA1 — эритроидный фактор транскрипции, PCBP1 — поли(гC)-связывающий белок 1, SP1 — белок специфичности 1, KLF1 — Krüppel-подобный фактор 1.

Ранее установлено, что *ALAD/hemB* относится к наиболее эволюционно консервативным среди белков биосинтеза гема, в отличие от глобинов *ADGB* и *NGB*, которые накапливают аминокислотные замены быстрее [16]. С целью сравнить функциональные домены *ALAD/hemB* губок с таковыми у других видов (табл. 1) мы построили множественные выравнивания аминокислотных последовательностей *ALAD/hemB* губок, беспозвоночных, растений, грибов, бактерий и человека (рис. 2а). В отношении аминокислотной последовательности *ALAD/hemB* найдено высокое сходство губок с другими беспозвоночными. Эти белки содержат консервативные функциональные домены каталитического сайта, домены связывания ионов Zn^{2+} и «крышки» активного центра. Белки *ALAD* губок класса *Demospongia* кластеризуются вместе и удалены от белков губок класса *Calcarea* (рис. 2б). *ALAD* морских губок *Amphimedon queenslandica* и *Petrosia ficiformis* являются наиболее дивергентными среди класса *Demospongia*. Представители подкласса *Heteroscleromorpha* образуют единую группу на дереве, но *ALAD* морских губок *H. dujardinii* и *Chondrosia reniformis* не входят в нее (рис. 2в).

Для предсказания трехмерной структуры *ALAD* губки *H. dujardinii* использовали данные для *ALAD* человека. Идентичность аминокислотных последовательностей *ALAD* губки и человека (PDB: 5HMS) составляет 65.9%, а покрытие использованных для моделирования оснований

(2–325) — 98%. N-концевой участок *ALAD/hemB* губок короткий, наименее консервативен и имеет замены в ключевых остатках функционального домена: S5M и F12H (N-концевой участок плеча) (рис. 2а, б). Кроме этих замен *ALAD H. dujardinii* несет замену T127A в металлсвязывающем центре и V275M. Короткий участок (до S5) N-концевого плеча одной субъединицы затрудняет взаимодействие с R240 C-доменов двух других субъединиц *ALAD* и формирование мультимеров *ALAD/hemB* (рис. 2б). Показано, что такие замены в N-концевом плече и в металлсвязывающем центре приводят к снижению активности фермента [4, 33, 34].

С целью охарактеризовать экспрессию генов белков биосинтеза гема: *ALAS*, *ALAD*, *NGB*, *ADGB*, ферритинов *Ft1a/b* и *Ft2*, — а также факторов *NF- κ B1*, *BCL2*, *NOS1* в процессах диссоциации и агрегации клеток губки *H. dujardinii* в разные периоды годового цикла мы сравнили методом RNA-seq уровень их экспрессии в интактном теле, диссоциированных клетках и клеточных агрегатах губок, собранных в разные сезоны и, следовательно, в разные периоды жизненного цикла губок. В интактном теле губок наибольший уровень экспрессии характерен для генов ферритинов *Ft1a/b* [16] во все исследованные периоды жизни (рис. 3). Экспрессия генов белков биосинтеза гема: *ALAD* и *ADGB* — в теле губок, собранных летом, была ниже, а *NGB* выше, чем в другие исследованные периоды (рис. 3). Экспрессия *ALAD* в клеточных агрегатах губок, собранных во все ис-

Таблица 1. Последовательности ALAD, которые использованы в выравнивании (рис. 2)

Организм	Аббревиатура	ID в Genbank ^a
<i>Homo sapiens</i>	H.sap	NP_000022.3
<i>Halisarca dujardinii</i>	H.duj	QEH04756.1
<i>Halichondria panicea</i>	H.pan	QIA61829.1
<i>Amphimedon queenslandica</i>	A.que	XP_019852250.1
<i>Suberites domuncula</i>	S.dom	CAE02648.1
<i>Ephydatia muelleri</i>	E.mue	Em0016g656a ^b
<i>Lubomirskia baicalensis</i>	L.bai	A8_TRINITY_DN16294_c0_g1_i1 ^c
<i>Chondrosia reniform</i>	—	OX359193.1
<i>Spongilla lacustris</i>	—	OX442424.1
<i>Agelas oroides</i>	—	OX422197.1
<i>Oscarella pearsei</i>	—	m.7375 ^d
<i>Oscarella lobularis</i>	—	OX382157.1
<i>Petrosia ficiformis</i>	—	OX345639.1
<i>Leucosolenia complicata</i>	—	Gene.107319
<i>Sycon ciliatum</i>	—	scpid88365 ^d
<i>Trichoplax</i> sp.	T sp.	RDD46522.1
<i>Mnemiopsis leidyi</i>	M.lei	см. примечание ^e
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S.cer	AJR94895.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	A.tha	OAP13053.1
<i>Paramecium octaurelia</i>	P.oct	CAD8165915.1
<i>Kiritimatiellae bacterium</i>	K.bac	MBP7274600.1

^a Все последовательности присутствуют в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), кроме ALAD *Ephydatia muelleri*, *Lubomirskia baicalensis*, *Oscarella pearsei*, *Sycon ciliatum* и *Mnemiopsis leidyi*.

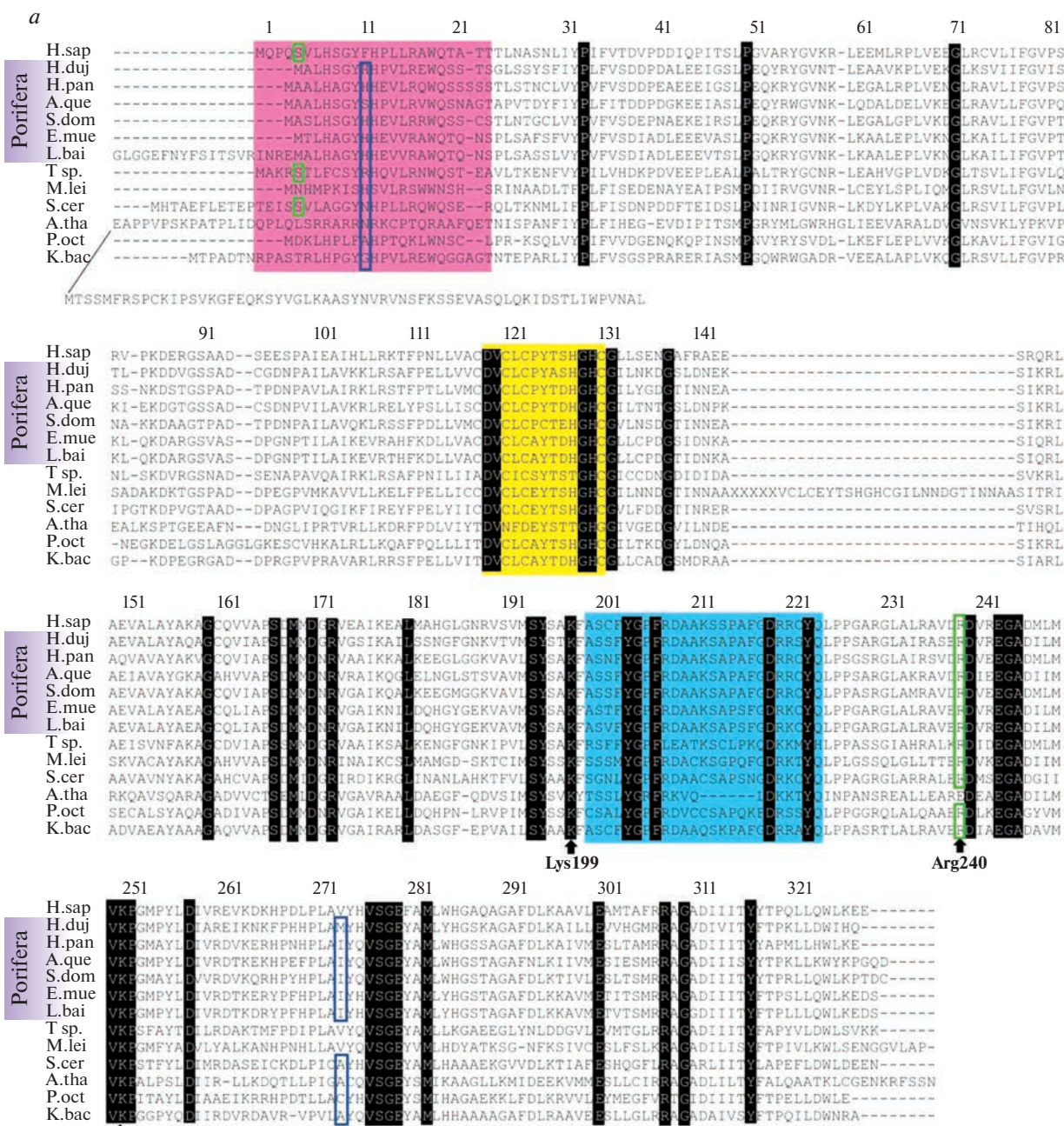
^b <https://spaces.facsci.ualberta.ca/ephybase/>

^c https://figshare.com/articles/Transcriptomic_and_genomic_assemblies_Lake_Baikal_Sponge_Data/6819812

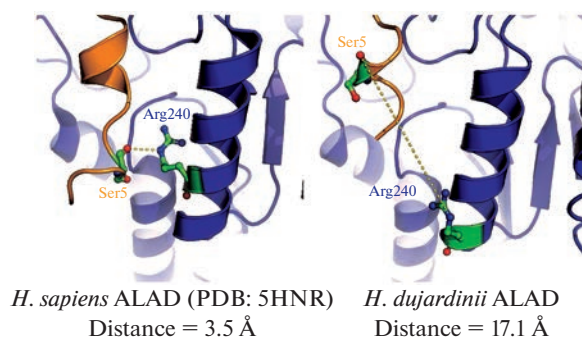
^d <http://www.compagen.org/datasets.html>

^e <https://kona.nhgri.nih.gov/mnemiopsis/>

Рис. 2. Домены и вторичная структура белка ALAD губок. *a* — Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ALAD: человека, базальных животных, грибов, растений, одноклеточных и бактерий (см. табл. 1). Нумерация аминокислот соответствует нумерации b-изоформы ALAD человека (ALAD-b). Аминокислоты, идентичные у разных видов, обозначены черным цветом. Стрелками показаны консервативные остатки Lys и Arg. Зеленым цветом выделены аминокислоты, играющие ключевую роль в формировании четвертичной структуры ALAD человека. Розовым цветом обозначено N-концевое плечо; желтым — металлсвязывающий сайт; голубым — “крышка” активного центра. *б* — 3D-структуры областей, соответствующих N-концевому плечу ALAD-b человека и ALAD губки *H. dujardinii*. Выбранная структура ALAD *Homo sapiens* (PDB: 5HMS) представляет собой октамер. Значения GMQE (Global Model Quality Estimate) = 0.90, QSQE (Quaternary Structure Quality Estimate) = 0.94 для 5HMS; например, для мыши (PDB: 2Z1B) они составляли 0.83 и 0.55 соответственно. RMSD (Root-Mean-Square Deviation of atomic positions) составляет 0.59 Å. Эта структура выбрана как обладающая наиболее высокими оценками качества предполагаемых моделей GMQE и QSQE по сравнению с другими доступными структурами-шаблонами эукариот (мышь, дрожжи) на использованном сервере Swiss Model. *в* — Филогенетическое дерево ALAD губок. Максимально правдоподобное дерево ALAD губок, реконструированное с IQ-TREE; цифры на узлах дерева соответствуют оценкам поддержки узла (в процентах) методом сверхбыстрого бутстрэпа с 1000 реплик.



6



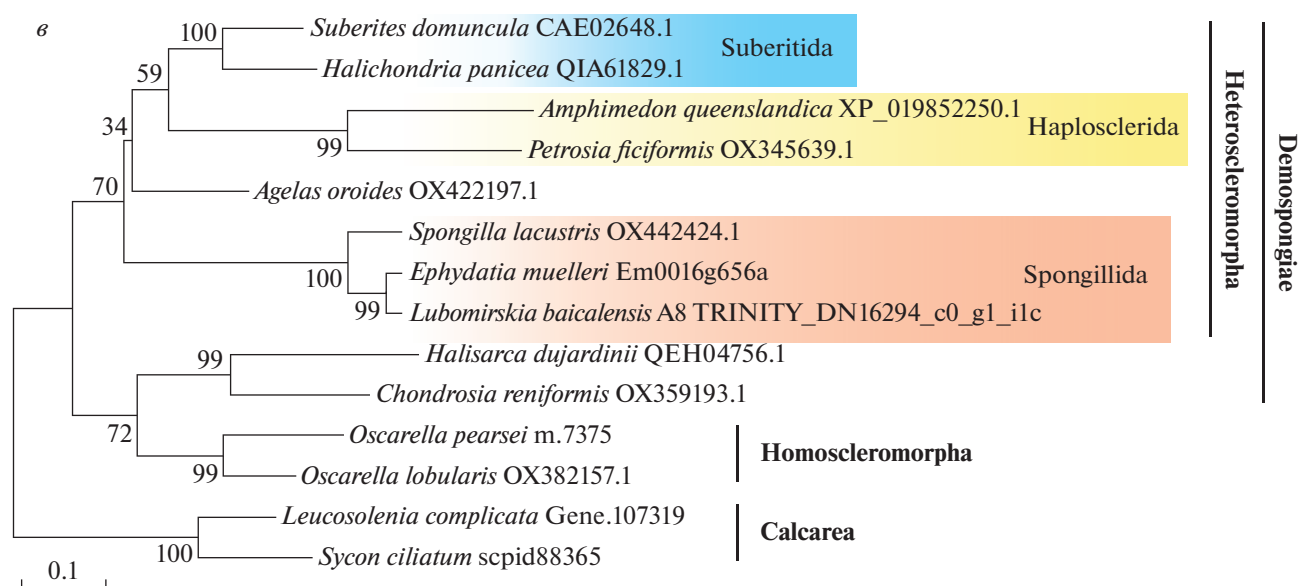


Рис. 2. Окончание.

следованные сезоны, снижалась, а экспрессия *NGB* снижалась только в клеточных агрегатах губок, собранных летом, но увеличивалась в собранных зимой, весной и осенью (рис. 3). Также увеличивалась экспрессия генов *Ft2* [16], транскрипционного фактора NF-κB и антиапоптотического белка BCL2 в клеточных агрегатах губок, собранных во все исследованные сезоны (рис. 3). Таким образом, в летний период, характеризующийся повышенной температурой и пониженной степенью оксигенации морской воды, а также усилением интенсивности ультрафиолетового излучения, в теле губки повышена экспрессия гена глобинового белка NGB, но экспрессия гена ключевого белка цитозольного пути биосинтеза гема ALAD снижена. Несмотря на различия в среднем уровне экспрессии в интактном теле губок, собранных в разные сезоны, для ALAD, NF-κB и BCL2 наблюдались сходные изменения при реагрегации, что свидетельствует о возможном их участии в регуляции этого процесса. Экспрессия *ALAD* снижалась в агрегатах по сравнению с экспрессией в тканях. Понижение экспрессии было стабильным и не зависело от периода репродуктивного цикла. Известно, что снижение экспрессии *ALAD* ассоциировано с развитием злокачественных опухолей у человека: гепатоцеллюлярной карциномы [6] и рака молочной железы [5]. С. Neslund-Dudas и соавт. [35] сообщали, что *ALAD* вовлечен в прогрессирование рака предстательной железы. Можно предположить, что при развитии опухоли и образовании агрегатов у губки могут быть задействованы сходные механизмы трансдифференцировки клеток в клеточные типы со сниженной экспрессией *ALAD*.

В транскриптомах губки *H. dujardinii* также были идентифицированы ALAD симбиотических микроорганизмов, в основном бактерий рода *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*. Лучшие совпадения, полученные с помощью инструмента BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) путем запроса последовательностей бактериального ортолога ALAD в базе данных белков NCBI, имеют хорошее покрытие последовательностей (80–100%) и значения идентичности (выше 70%) для *Rhodobacteraceae*. Бактериальные симбионты *H. dujardinii* могут регулировать биосинтез гема губки. Известно, что симбиотические граммотрицательные бактерии легче утилизируют железо из гема хозяина [36].

Белок ALAD/hemB губки *H. dujardinii* имеет мажорную изоформу с молекулярной массой 35 414.46 Да, состоящую из 325 а.о. и имеющую изоэлектрическую точку (pI), равную 7.82. Прогнозируемая изоэлектрическая точка pI ALAD/hemB губки *H. dujardinii* значительно выше рабочего диапазона ALAD/hemB других животных. Исходя из этого, мы предположили, что активность ALAD губки ниже, чем у человека. Методом масс-спектрометрии идентифицирован белок ALAD/hemB клеток губки *H. dujardinii* и обнаружено 4 посттрансляционные модификации: ацетилирование (A6), карбамидометилирование (C96), дезамидирование (N185) и окисление (M193) (рис. 4, табл. 2).

В результате проведенного исследования, состоящего из следующих этапов: фракционирование экстрактов белков клеток интактного тела губки, диссоциированных клеток и клеточных агрегатов в 12%-ном нативном геле или SDS-ПААГ,

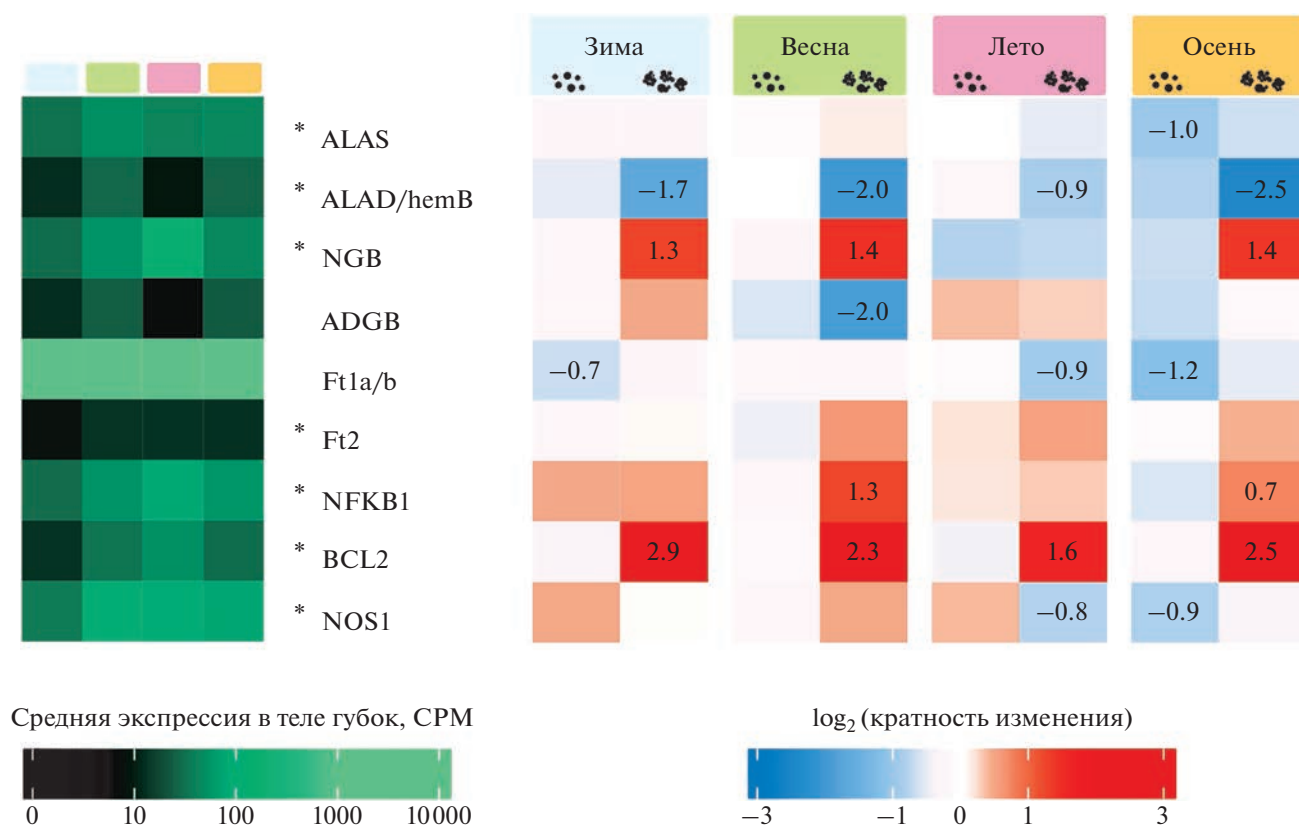


Рис. 3. Экспрессия отдельных дифференциально экспрессирующихся генов белков биосинтеза гема, ферритинов и белков, связанных с обменом железа, в процессах диссоциации/реагрегации у губки *H. dujardinii* в разные периоды годового цикла. Большими и маленькими точками обозначены диссоциированные клетки и агрегаты. Экспрессия транскриптов (мРНК) белков в CPM (counts per million, число прочтений, отнесенных к данному транскрипту, на миллион прочтений) после нормализации методом TMM (trimmed mean of M-values – усеченное среднее M-значений) рассчитана с использованием программного обеспечения edgeR (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>). *Статистически значимые различия экспрессии в интактной ткани между разными сезонными периодами для скорректированных по методу Бенджамини–Хохберга значений $p < 0.001$ t -критерия Стьюдента, проведенного для повторов каждого периода относительно зимнего периода. На тепловой карте справа изображены логарифмированные уровни изменения экспрессии в диссоциированных клетках и агрегатах по отношению к образцам интактной губки (тело губки) соответствующих сезонных периодов; при этом численные значения указаны только в тех ячейках, где изменения на данном контрасте статистически значимы согласно модели дифференциальной экспрессии пакета edgeR (FDR < 0.001). В связи с тем, что последовательности мРНК минорной и мажорной изоформ ALAD практически идентичны, их экспрессия рассчитана как сумма.

последующего иммуноблотинга с окрашиванием специфическими антителами к ALAD, – выявлено увеличение содержания ALAD в диссоциированных клетках по сравнению с таковым в теле (рис. 5). Доля активной (октамерной) формы

ALAD увеличивалась в 3.5 раза, тогда как неактивной (гексамерной) увеличивалась незначительно по сравнению с таковой в интактном теле. В клеточных агрегатах содержание октамерной и гексамерной форм ALAD снижалось относитель-

Таблица 2. Данные масс-спектрометрии для белка ALAD

Белок	NCBI ID	$-10 \lg P^a$	Покрывтие, %	N_t^b	N_u^c	Посттрансляционные модификации	M_r , Да
ALAD	QEN04756.1	140.68	30	10	10	Окисление; дезаминирование; карба-мидометилирование; ацетилирование	35 415

^a Показатель PEAKS DB score, отражающий статистическую значимость совпадения спектра пептида с каким-либо из базы (форма записи p -значения, определяемого программой PEAKS как вероятность того, что ложная идентификация при поиске в базе данных даст такой же или лучший результат соответствия). Значения $-10 \lg P > 30$ (эквивалентно p -значениям < 0.001) представляют собой совпадения высокого качества.

^b Общее число пептидов.

^c Число уникальных пептидов.

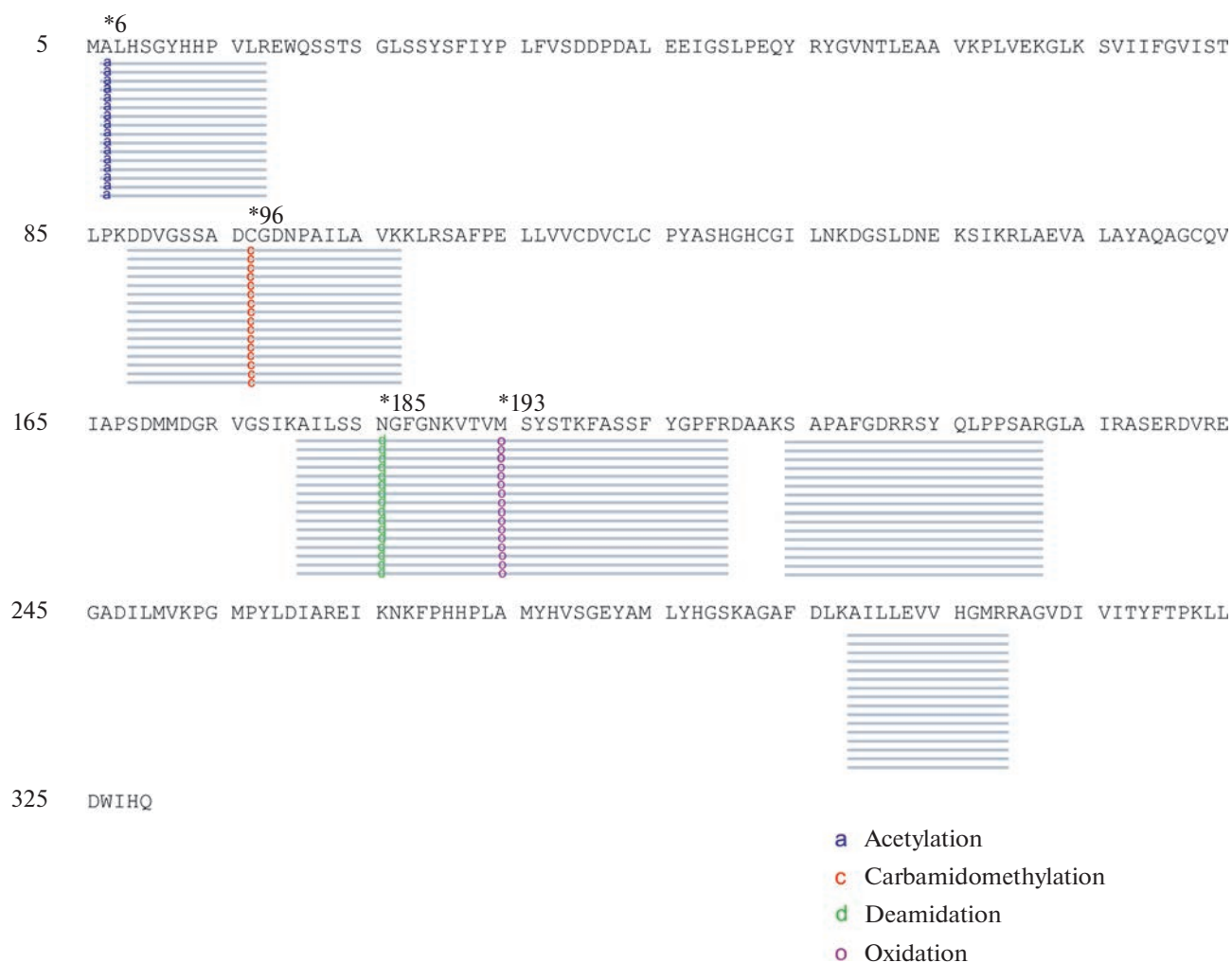


Рис. 4. Аминокислотная последовательность ALAD/hemB и пептиды, определенные с помощью масс-спектрометрии (серые линии). Указана нумерация, соответствующая ALAD человека (NP_000022.3). Модификации аминокислот обозначены соответствующими буквами.

но показателей диссоциированных клеток, но сохранялось на высоком уровне по сравнению с содержанием в интактном теле. Интересно, что в интактном теле соотношение неактивной формы ALAD/hemB к активной выше по сравнению с таковыми показателями в клетках и агрегатах. Высокое содержание неактивной (гексамерной) формы ALAD/hemB в интактном теле по сравнению с содержанием его активной формы, а также изменение этого соотношения при диссоциации и реагрегации можно интерпретировать как тонкий механизм регуляции этих процессов. Известно, что в клетках живых организмов существует динамическое равновесие различных форм ALAD: октамера, гексамера, димеров и тетрамера. Время сборки мультимеров и разборки до мономера зависит от организма, типа и состояния клеток [37], а соотношение различных форм может меняться при изменении pH, концентрации одно- и двухвалентных ионов металлов [38] и в присутствии морфологов [4].

Возможно, повышение содержания активной формы ALAD/hemB при диссоциации вызывает активацию цитоплазматического пути биосинтеза гема в определенных клеточных типах, инициируя процесс реагрегации.

Таким образом, впервые показана аллостерическая модификация ALAD/hemB в процессе диссоциации губки и реагрегации ее клеток. В регуляции экспрессии гена *ALAD* губки может участвовать транскрипционный фактор GATA-1 и метилирование ДНК [9]. Реагрегация клеток губки *H. dujardinii* сопровождается снижением экспрессии ALAD и изменением содержания активной и неактивной форм белка. Дальнейшее изучение процессов биосинтеза гема и роли ALAD/hemB в морфогенетических процессах у базальных животных позволит идентифициро-

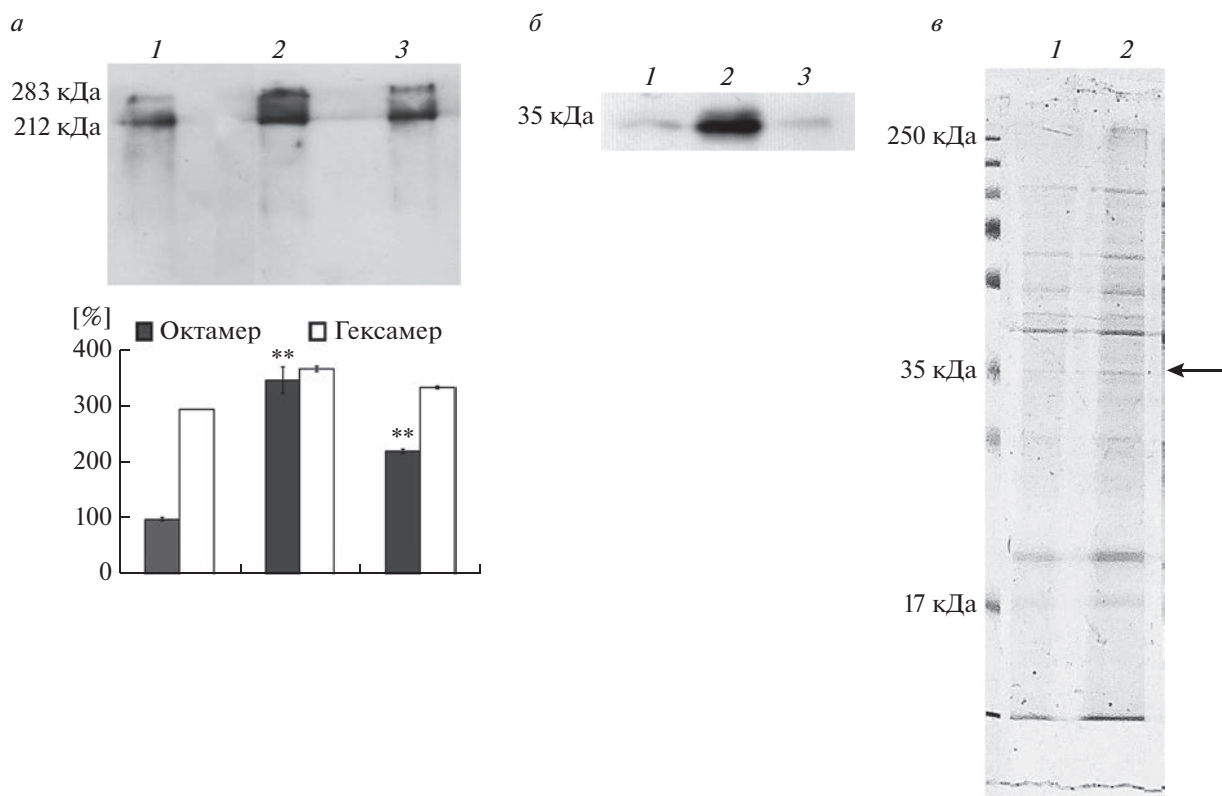


Рис. 5. Анализ содержания белка ALAD/hemB в клетках губки *H. dujardinii*. *a* – Содержание октамерной и гексамерной форм ALAD в клетках губки при диссоциации и реагрегации: 1 – тело губки, 2 – диссоциированные клетки, 3 – агрегаты клеток. Представлены результаты иммуноблотинга, проведенного после электрофореза в 12%-ном ПААГ. *б* – Содержание белка ALAD в тех же образцах. Представлены результаты иммуноблотинга, проведенного после электрофореза в 12%-ном SDS-ПААГ. *в* – Электрофоретический анализ образцов 1 и 2 в 12%-ном SDS-ПААГ, окрашивание Coomassie G250. Стрелкой показана полоска в геле, использованная для идентификации ALAD/hemB методом масс-спектрометрии.

вать мишени, которые могут быть использованы для коррекции нарушений этих процессов у высших животных.

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе материала туристическому центру “Полярный Круг” (Россия).

Исследования проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института биологии развития им. Н.К. Колцова Российской академии наук (ИБР РАН).

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН (№ ГЗ 0088-2021-0008).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jaffe E.K. (2020) Porphobilinogen synthase: an equilibrium of different assemblies in human health. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **169**, 85–104. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.11.003>
- Finoshin A.D., Adameyko K.I., Mikhailov K.V., Kravchuk O.I., Georgiev A.A., Gornostaev N.G., Kosevich I.A., Mikhailov V.S., Gazizova G.R., Shagimardanova E.I., Gusev O.A., Lyupina Y.V. (2020) Iron metabolic pathways in the processes of sponge plasticity. *PLoS One*. **15**, e0228722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228722>
- Chiabrando D., Bertino F., Tolosano E. (2020) Hereditary ataxia: a focus on heme metabolism and Fe–S cluster biogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3760. <https://doi.org/10.3390/ijms21113760>
- Jaffe E.K., Lawrence S.H. (2012) Allosteric and the dynamic oligomerization of porphobilinogen synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **519**, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.10.010>
- Ge J., Yu Y., Xin F., Yang Z.J., Zhao H.M., Wang X., Tong Z.S., Cao X.C. (2017) Downregulation of delta-aminolevulinic acid dehydratase is associated with poor prognosis in patients with breast cancer. *Cancer Sci.* **108**, 604–611. <https://doi.org/10.1111/cas.13180>
- Ye Q., Yang X., Zheng S., Mao X., Shao Y., Xuan Z., Huang P. (2022) Low expression of moonlight gene

- ALAD is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Gene*. **825**, 146437.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146437>
7. Kaya A.H., Plewinska M., Wong D.M., Desnick R.J., Wetmur J.G. (1994) Human delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD) gene: structure and alternative splicing of the erythroid and housekeeping mRNAs. *Genomics*. **19**, 242–248.
<https://doi.org/10.1006/geno.1994.1054>
 8. Bishop T.R., Miller M.W., Beall J., Zon L.I., Dierks P. (1996) Genetic regulation of delta-aminolevulinate dehydratase during erythropoiesis. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2511–2518.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.13.2511>
 9. Desgardin A.D., Abramova T., Rosanwo T.O., Kartha S., Shim E.H., Jane S.M., Cunningham J.M. (2012) Regulation of delta-aminolevulinic acid dehydratase by Krüppel-like factor 1. *PLoS One*. **7**, e46482.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046482>
 10. Li C., Xu M., Wang S., Yang X., Zhou S., Zhang J., Liu Q., Sun Y. (2011) Lead exposure suppressed ALAD transcription by increasing methylation level of the promoter CpG islands. *Toxicol. Lett.* **203**, 48–53.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.03.002>
 11. Simion P., Philippe H., Baurain D., Jager M., Richter D.J., Di Franco A., Roure B., Satoh N., Quéinnec É., Ereskovsky A., Lapébie P., Corre E., Delsuc F., King N., Wörheide G., Manuel M.A. (2017) Large and consistent phylogenomic dataset supports sponges as the sister group to all other animals. *Curr. Biol.* **27**, 958–967.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.031>
 12. Wade J., Byrne D.J., Ballentine C.J., Drakesmith H. (2021) Temporal variation of planetary iron as a driver of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **118**, e2109865118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2109865118>
 13. Лавров А.И., Косевич И.А. (2014) Реагрегация клеток губок: механизмы и динамика процесса. *Онтогенез*. **45**, 250–271.
<https://doi.org/10.7868/S0475145014040077>
 14. Ereskovsky A., Borisenko I.E., Bolshakov F.V., Lavrov A.I. (2021) Whole-body regeneration in sponges: diversity, fine mechanisms, and future prospects. *Genes (Basel)*. **12**, 506.
<https://doi.org/10.3390/genes12040506>
 15. Sogabe S., Hatleberg W.L., Kocot K.M., Say T.E., Stoupin D., Roper K.E., Fernandez-Valverde S.L., Degnan S.M., Degnan B.M. (2019) Pluripotency and the origin of animal multicellularity. *Nature*. **570**, 519–522.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1290-4>
 16. Adameyko K.I., Burakov A.V., Finoshin A.D., Mikhailov K.V., Kravchuk O.I., Kozlova O.S., Gornostaev N.G., Cherkasov A.V., Erokhov P.A., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Moiseenko A.V., Sokolova O.S., Bonchuk A.N., Zhegalova I.V., Georgiev A.A., Mikhailov V.S., Gogoleva N.E., Gazizova G.R., Shagimardanova E.I., Gusev O.A., Lyupina Y.V. (2021) Conservative and atypical ferritins of sponges. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8635.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168635>
 17. Ereskovsky A.V. (2000) Reproduction cycles and strategies of the cold-water sponges *Halisarca dujardini* (Demospongiae, Halisarcida), *Myxilla incrustans* and *Iophon piceus* (Demospongiae, Poecilosclerida) from the White Sea. *Biol. Bull.* **198**, 77–87.
<https://doi.org/10.2307/1542805>
 18. Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M., MacManes M.D., Ott M., Orvis J., Pochet N., Strozzi F., Weeks N., Westerman R., William T., Dewey C.N., Henschel R., LeDuc R.D., Friedman N., Regev A. (2013) *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* **8**, 1494–1512.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
 19. Langmead B., Salzberg S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*. **9**, 357–359.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
 20. Li B., Dewey C.N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. **12**, 323.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
 21. Адамейко К.И., Кравчук О.И., Финошин А.Д., Бончук А.Н., Георгиев А.А., Михайлов В.С., Горностаев Н.Г., Михайлов К.В., Бачева А.В., Индейкина М.И., Бугрова А.Е., Газизова Г.Р., Козлова О.С., Гусев О.А., Шагимарданова Е.И., Люпина Ю.В. (2020) Структура нейроглобина холодноводной губки *Halisarca dujardini*. *Молекуляр. биология*. **54**, 474–479.
<https://doi.org/10.31857/S0026898420030039>
 22. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
 23. Slater G.S., Birney E. (2005) Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics*. **6**, 31.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-31>
 24. Katoh K., Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 772–780.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
 25. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 268–274.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu030>
 26. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermiin L.S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*. **14**, 587–589.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
 27. Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. (2018) UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 518–522.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
 28. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

29. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
30. Ma B., Zhang K., Hendrie C., Liang C., Li M., Doherty-Kirby A., Lajoie G. (2003) PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2337–2342.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1196>
31. Williams S.T., Lockyer A.E., Dyal P., Nakano T., Churchill C.K.C., Speiser D.I. (2017) Colorful seashells: identification of haem pathway genes associated with the synthesis of porphyrin shell color in marine snails. *Ecol. Evol.* **7**, 10379–10397.
<https://doi.org/10.1002/ece3.3552>
32. Akagi R., Kato N., Inoue R., Anderson K.E., Jaffe E.K., Sassa S. (2006) delta-Aminolevulinate dehydratase (ALAD) porphyria: the first case in North America with two novel ALAD mutations. *Mol. Genet. Metab.* **87**, 329–336.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.10.011>
33. Inoue R., Akagi R. (2008) Co-synthesis of human delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD) mutants with the wild-type enzyme in cell-free system-critical importance of conformation on enzyme activity. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **43**, 143–153.
<https://doi.org/10.3164/jcnn.2008035>
34. Maruno M., Furuyama K., Akagi R., Horie Y., Meguro K., Garbaczewski L., Chiorazzi N., Doss M.O., Hassoun A., Mercelis R., Verstraeten L., Harper P., Floderus Y., Thunell S., Sassa S. (2001) Highly heterogeneous nature of delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD) deficiencies in ALAD porphyria. *Blood*. **97**, 2972–2978.
<https://doi.org/10.1182/blood.v97.10.2972>
35. Neslund-Dudas C., Levin A.M., Rundle A., Beebe-Dimmer J., Bock C.H., Nock N.L., Jankowski M., Datta I., Krajenta R., Dou Q.P., Mitra B., Tang D., Rybicki B.A. (2014) Case-only gene-environment interaction between *ALAD* tagSNPs and occupational lead exposure in prostate cancer. *Prostate*. **74**, 637–646.
<https://doi.org/10.1002/pros.22781>
36. Richard K.L., Kelley B.R., Johnson J.G. (2019) Heme uptake and utilization by Gram-negative bacterial pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 81.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00081>
37. Jaffe E.K. (2016) The remarkable character of porphobilinogen synthase. *Acc. Chem. Res.* **49**, 2509–2517.
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00414>
38. Selwood T., Tang L., Lawrence S.H., Anokhina Y., Jaffe E.K. (2008) Kinetics and thermodynamics of the interchange of the morphein forms of human porphobilinogen synthase. *Biochemistry*. **47**, 3245–3257.
<https://doi.org/10.1021/bi702113z>

Characteristics of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase of the Cold-Water Sponge *Halisarca dujardinii*

O. I. Kravchuk^{1, *}, A. D. Finoshin¹, K. V. Mikhailov^{2, 3}, R. H. Ziganshin⁴, K. I. Adameyko¹, N. G. Gornostaev¹, A. I. Zhurakovskaya¹, V. S. Mikhailov¹, E. I. Shagimardanova⁵, and Yu. V. Lyupina¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

³Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127051 Russia

⁴Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

⁵Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420012 Russia

*e-mail: kravchuk444@mail.ru

Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) is a key enzyme in the cytoplasmic pathway of heme biosynthesis. Here, a primary structure of the *ALAD* gene of the marine cold-water sponge *Halisarca dujardinii*, a multimeric structure of the ALAD/hemB protein, and the *ALAD* gene expression during the sponge annual reproductive cycle were analyzed. On the base of results obtained one can suppose that the sponge *ALAD* gene expression is regulated by the transcription factor GATA-1 and DNA methylation. Re-aggregation of the sponge cells was accompanied by a decrease in *ALAD* expression and a change in the cellular content of the active ALAD/hemB form. Further study of heme biosynthesis and the role of ALAD/hemB in morphogenesis of basal animals may provide new opportunities for correcting pathologies in higher animals.

Keywords: heme biosynthesis, δ -aminolevulinic acid dehydratase, basal animals, plasticity

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 577.24

НЕЙРОНАЛЬНЫЙ КАЛЬЦИЕВЫЙ СЕНСОР-1: ЦИНК/РЕДОКСЗАВИСИМЫЙ БЕЛОК СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. В. Е. Бакшеева^а, А. А. Замятин мл.^{а, b, c, d}, Е. Ю. Зерний^{а, *}

^аНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

^бФакультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119992 Россия

^сНаучный центр трансляционной медицины, Автономная некоммерческая образовательная организация
высшего образования “Научно-технологический университет “Сириус”, федеральная территория “Сириус”,
пгт. Сириус, Краснодарский край, 354340 Россия

^дИнститут молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*e-mail: zerni@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 08.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Ключевые аспекты функционирования нервной системы управляются с участием сигналов внутриклеточного кальция. Контроль возбудимости и пластичности нейронов при участии ионов кальция лежит в основе механизмов высшей нервной деятельности, а механизмы этого контроля представляют особый интерес для исследователей. В настоящее время описано семейство высокоспециализированных нейрональных белков, которые способны трансформировать информацию, содержащуюся в сигналах кальция, в регуляцию каналов, ферментов, рецепторов и факторов транскрипции. К наиболее ярким представителям этого семейства относится нейрональный кальциевый сенсор-1 (neuronal calcium sensor-1, NCS-1), который интенсивно экспрессируется в клетках центральной нервной системы (ЦНС) и контролирует такие жизненно важные процессы, как рост и выживаемость нейронов, рецепцию, нейротрансмиссию и синаптическую пластичность. Недавно обнаружено, что помимо ионов кальция NCS-1 может связывать так называемый “мобильный”, или сигнальный, внутриклеточный цинк, рост концентрации которого – характерная особенность клеток в состоянии окислительного стресса. Координация цинка в этих условиях стимулирует окисление NCS-1 с образованием дисульфидного димера (dNCS-1), обладающего измененными функциональными свойствами. Совокупное действие мобильного цинка и повышенного редокс-потенциала среды может таким образом индуцировать aberrantную активность NCS-1, включающую сигналы на выживание нервных клеток или индукцию их гибели и, как следствие, развитие нейродегенеративных процессов. В обзоре подробно рассмотрены вопросы локализации, регуляции экспрессии, структуры и молекулярных свойств NCS-1, а также современные данные по его сигнальной активности в норме и при патологии, в том числе в рамках каскадов цинкзависимой редокс-регуляции.

Ключевые слова: нейроны, сигналы кальция, нейрональные кальциевые сенсоры, нейрональный кальциевый сенсор-1, цинк, окислительный стресс, редокс-регуляция, нейродегенеративные заболевания

DOI: 10.31857/S0026898423060022, **EDN:** SLBNIV

Сокращения. НКС – нейрональные кальциевые сенсоры; ЦНС – центральная нервная система; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – нейротрофический фактор мозга; CA (cornu ammonis) neurons – пирамидальные нейроны Аммонова рога (гиппокампа); CAPS (Calcium-dependent secretion activator 1) – Ca^{2+} -зависимый активатор секреции; D2R (dopamine receptor 2) – рецептор-2 дофамина; EF(1–4) – EF-hand мотив 1–4; GCAP (guanylate cyclase-activating proteins) – белки-активаторы гуанилатциклаза; GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) – глиальный нейротрофический фактор; GPCR (G-protein-coupled receptor) – рецептор, сопряженный с G-белком; GRK (G-protein-coupled receptor kinase) – протеинкиназа рецепторов, сопряженных с G-белками; IL1RAPL1 (interleukin-1 receptor accessory protein-like 1) – гомолог-1 ко-рецептора интерлейкина-1; InsP₃R (inositol triphosphate receptor) – рецепторы инозитолтрифосфата; IP₃ (inositol triphosphate) – инозитолтрифосфат; KChIP (K^{+} -channel interacting proteins) – белки, взаимодействующие с K^{+} -каналами; LTD (long-term depression) – долговременная депрессия; LTP (long-term potentiation) – долговременная потенцияция; NCS-1 (neuronal calcium sensor-1) – нейрональный кальциевый сенсор-1; PI(4,5)P₂ (phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate) – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; PI3P (phosphatidyl inositol-3-phosphate) – фосфатидилинозитол-3-фосфат; PI4P (phosphatidyl inositol-4-phosphate) – фосфатидилинозитол-4-фосфат; PI5P – (phosphatidyl inositol-5-phosphate) фосфатидилинозитол-5-фосфат; PI4Kβ (phosphatidyl inositol-4-kinase β) – фосфатидилинозитол-4-киназа-β; Pik1 (phosphatidyl inositol-4-kinase-1) – дрожжевая фосфатидилинозитол-4-киназа-1; PLC (phospholipase C) – фосфолипаза C; STD (short-term depression) – кратковременная депрессия; STP (short-term potentiation) – кратковременная потенцияция; VILIP (visinin-like proteins) – визининподобные белки.

ВВЕДЕНИЕ

Ключевые аспекты развития, функционирования и гибели клеток нервной системы регулируются за счет сигнальной активности ионов кальция. Особый интерес для исследования представляет контроль возбудимости и пластичности нейронов при участии ионов кальция, лежащий в основе механизмов высшей нервной деятельности. После открытия роли циклических нуклеотидов и связанных с ними сигнальных путей было высказано предположение, что Ca^{2+} может также функционировать как вторичный мессенджер в нейронах. Некоторое время спустя были идентифицированы первичные Ca^{2+} -сенсоры в цепи стимул $\rightarrow$ ответ, которые трансформируют информацию, содержащуюся в изменениях уровня ионов кальция, в регуляцию каналов, ферментов, рецепторов и факторов транскрипции. За последние 30 лет было открыто большое семейство таких Ca^{2+} -сенсоров, ярким представителем которых является нейрональный кальциевый сенсор-1 (neuronal calcium sensor-1, NCS-1). Впервые NCS-1 был охарактеризован как белок *Drosophila melanogaster*, кодируемый геном, локализующимся в так называемом *Shaker*-локусе X-хромосомы [1]. Ранее показано, что мутации в этом локусе у мух фенотипа V7 связаны с дисфункцией потенциалзависимых K^{+} -каналов, которая выражается в чрезмерной возбудимости мотонейронов и приводит к судорогам. Поскольку активность K^{+} -каналов у V7 подавлялась лишь частично, было высказано предположение, что в этом фенотипе затронут не сам ионный канал, а связанный с ним ранее неизвестный регуляторный белок. В результате секвенирования соответствующего участка хромосомы была получена последовательность нового гена. При анализе продукта его трансляции длиной 187 а.о. выявили наличие четырех Ca^{2+} -связывающих мотивов типа EF-hand, гомологичных таковым у кальмодулина [2]. Методом гибридизации *in situ* проанализирован паттерн экспрессии нового белка в нервной системе дрозофилы и выявлена его локализация в синаптических окончаниях. Выяснилось также, что у фенотипа V7 разрыв хромосомы вблизи сигнала полиаденилирования обнаруженного гена способствует 4-кратному увеличению его экспрессии [3]. Примечательно, что характерный для V7 “взрывной” выброс нейромедиатора запускается стимуляцией моторных нейронов в определенном диапазоне частот (>5 Гц). Такой же эффект наблюдали у генетически модифицированных животных с избыточной экспрессией нового белка. В связи с этим свойством последнему было присвоено название “фреквенин” (от англ. “frequency”).

Не осталось незамеченным сходство фреквенина с универсальным Ca^{2+} -сенсором — кальмодулином — и открытыми на тот момент реверси-

ном и визининподобным белком (visinin-like protein-1, VILIP-1). Фреквенин, реверсин и VILIP-1 специфичны для нервной ткани, содержат четыре Ca^{2+} -связывающих мотива EF-hand и N-концевой сигнал миристоилирования — ацилирования остатком 14-звенной насыщенной жирной (миристиновой) кислоты. На основании этого сходства указанные белки были отнесены к новому семейству примембранных белков, отвечающих за регуляцию чувствительности различных типов нейронов к внешним стимулам в ответ на сигналы Ca^{2+} . Это семейство получило название “нейрональные кальциевые сенсоры” (НКС) [4]. Открытый впоследствии ортолог фреквенина (72% идентичности) из нервной системы курицы (*Gallus gallus*) получил название NCS-1. Кроме того, были охарактеризованы гомологи NCS-1 лягушки (*Xenopus laevis*), крысы (*Rattus norvegicus*), мыши (*Mus musculus*), человека (*Homo sapiens*), рыбы данио-рерио (*Danio rerio*), речного рака (*Procambarus clarkii*), морского зайца (*Aplysia californica*), нематоды (*Caenorhabditis elegans*), пекарских (*Saccharomyces cerevisiae*) и делящихся (*Schizosaccharomyces pombe*) дрожжей и т.д. [5–14]. Ca^{2+} -связывающие белки, обладающие сходной структурной организацией, были открыты в растениях и получили название SCaBP (SOS3-like calcium-binding protein, Ca^{2+} -связывающие белки из группы SOS3, где SOS3 — первый открытый белок этого семейства) [15, 16]. Примечательно, что близкородственные фреквенину/NCS-1 белки встречаются и у одноклеточных организмов. В целом, наблюдаемая степень консервативности NCS-1 (60% идентичности для белков человека и дрожжей) может указывать, во-первых, на близкое родство этого белка с общим предком семейства НКС, а во-вторых, на фундаментальность его функции. Действительно, при экспрессии в дрожжевых клетках NCS-1 млекопитающих может частично заменять собой фреквенин [17]. Ортологи NCS-1 известны под множеством разных названий: для дрозофилы, лягушки, ракообразных используется название “фреквенин”, для дрожжей — Frq1, для человека, курицы и нематоды — NCS-1, для моллюска морского зайца — апликальцин и т.д.

В представленном обзоре основной фокус сделан на белке позвоночных животных, в связи с чем здесь и далее будет использован термин “NCS-1” (даже если оригинальное наименование в литературе отличается — как в случае фреквенина лягушки).

СТРУКТУРА ГЕНА И ИЗОФОРМНЫЙ СОСТАВ NCS-1

Ген NCS-1 человека (*NCS1*) расположен на хромосоме-9 в локусе 9q34.1, имеет длину около

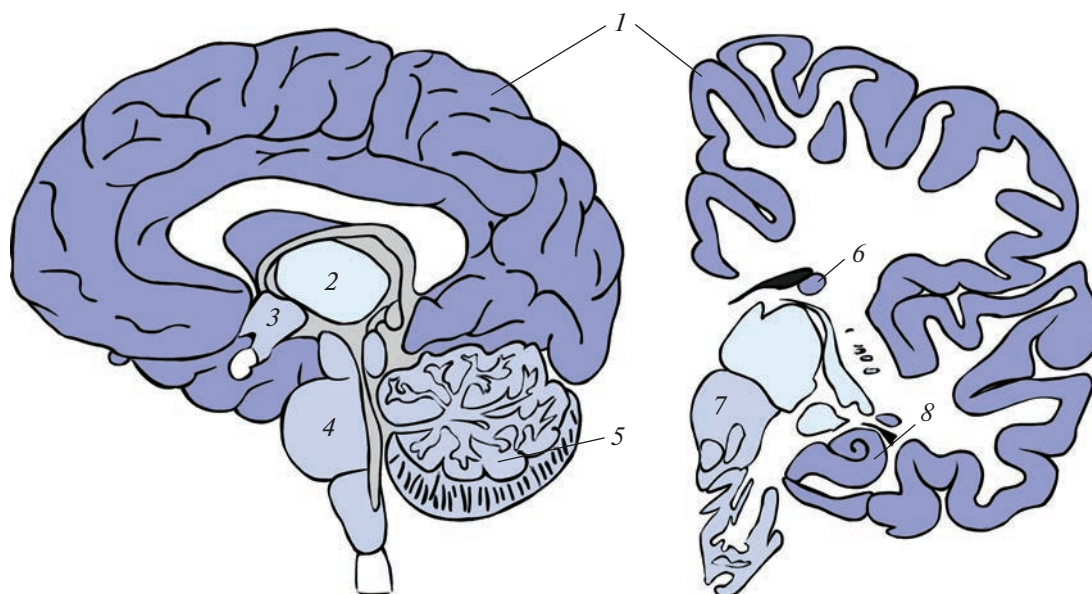


Рис. 1. Экспрессия NCS-1 в мозге человека (по данным Human Protein Atlas). 1 — кора головного мозга, 2 — таламус, 3 — гипоталамус, 4 — мост, 5 — мозжечок, 6 — базальные ядра, 7 — средний мозг, 8 — гиппокамп. Области с более высоким содержанием NCS-1 выделены более темным цветом.

64 т.п.н. и содержит 8 экзонов и 7 интронов [18]. Кодированные последовательности составляют менее 1% его длины. Некодирующие области гена *NCS1* обладают крайне низкой консервативностью, за исключением нескольких участков двух первых интронов. Механизмы регуляции транскрипции *NCS1* млекопитающих остаются невыясненными. Показано, что у человека промоторная область гена *NCS1* расположена на отрезке длиной 2 т.п.н. перед старт-кодоном и что ингибирование фосфорилирования неизвестного фактора транскрипции протеинкиназой GSK3B повышает экспрессию *NCS1* [19]. В промоторной области *NCS1* также обнаружен сайт связывания субъединицы RelA-p65 комплекса NF-κB [20]. Противоопухолевые микроРНК: miR-144-5p и miR-144-3p — связываются в некодировющей 3'-концевой области мРНК NCS-1 и подавляют синтез белка [21]. В мозге крысы экспрессия NCS-1 регулируется микроРНК, ассоциированными с ангиогенезом и синаптогенезом [22].

Анализ транскриптома человека выявил наличие двух альтернативных мРНК NCS-1: первая соответствует белку (190 а.о.), идентичному другим NCS-1 млекопитающих, в то время как вторая кодирует вариант NCS-1, у которого первые 22 остатка полипептидной цепи, включающие в себя сигнал миристилирования и первую α-спираль белка, заменены на последовательность из 4 аминокислот — MATI [23]. Эта укороченная изоформа NCS-1 (172 а.о.) представляет собой продукт альтернативного сплайсинга: последовательность ДНК, соответствующая 5'-концевому

участку укороченной мРНК, расположена внутри интрона-1 гена *NCS1*. Соответствующая мРНК NCS-1 действительно была обнаружена в клеточных линиях человека, но ее содержание на 3 порядка ниже, чем полноразмерной мРНК, а экспрессию соответствующего ей белкового продукта детектировать не удалось [24]. Изоформа NCS-1^{MATI} отличается от основной изоформы белка по Ca^{2+} -связывающим свойствам: она связывает на один Ca^{2+} меньше и обладает примерно на 2 порядка более низким сродством к ионам кальция. Несмотря на это, при экспрессии рекомбинантного NCS-1 в клетках SHSY5Y различия в жизнеспособности клеток, преимущественно экспрессирующих первую или вторую изоформы белка, не наблюдается. Таким образом, скорее всего, в живых клетках преобладает классический миристилированный вариант белка NCS-1 длиной 190 а.о.

КЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ NCS-1

По сравнению с другими белками семейства НКС, многие из которых встречаются исключительно или преимущественно в сетчатке или гиппокампе, NCS-1 достаточно широко распространен в нейронах центральной нервной системы (ЦНС) [25]. Больше всего NCS-1 содержится в отделах мозга, отвечающих за процессы обработки информации, обучения, памяти и контроля эмоций: коре больших полушарий, таламусе, миндалевидном теле, гиппокампе и мозжечке (рис. 1). У человека содержание NCS-1 в нейронах коры в несколько раз превышает его экспрессию в дру-

гих отделах мозга, что отражает важность белка для когнитивной функции [7]. Внутриклеточная концентрация NCS-1 в нейронах при этом составляет от 0.5 до 5 мкМ и может сильно варьировать даже внутри одной популяции нейронов [26].

Наиболее подробно локализация NCS-1 в нервной системе изучена у грызунов. Изначально было обнаружено выраженное окрашивание антителами против NCS-1 пирамидальных нейронов гиппокампа и аксональных кисточек корзинчатых нейронов мозжечка, а также узелки таламуса [26, 27]. Дальнейшие исследования выявили высокое содержание белка в миелинизированных аксонах мозолистого тела, внутренней капсулы, передней спайки, пирамидной системы, а также белого вещества мозжечка [28]. Окрашивание также наблюдали в телах и дендритах нейронов коры мозга, базальных ядер (ганглиев) переднего мозга, обонятельных луковиц, зубчатой извилины гиппокампа, среднего мозга, варолиева моста, продолговатого мозга, коры и глубоких ядер мозжечка, ствола мозга [28]. На уровне мРНК экспрессия *NCS1* зарегистрирована в гранулярных и митральных клетках обонятельных луковиц, передних обонятельных ядрах, пирамидном слое обонятельной коры, во всех слоях коры кроме слоя I (самого наружного), в перегородке между боковыми желудочками мозга, базальных ядрах, хвостатом ядре и прилежащем ядре, отделах CA1–CA3 (пирамидальные нейроны) и зубчатой извилине (гранулярные нейроны) гиппокампа, узелке и ядрах таламуса, ядрах гипоталамуса, верхнем и нижнем двухолмиях среднего мозга, глубинных ядрах мозжечка, а также стволе мозга [6, 29]. Во внутреннем ухе NCS-1 локализуется в пре- и постсинаптических нервных окончаниях вестибулярного аппарата и кортиева органа [30]. В обонятельных нейронах NCS-1 ассоциирован с цитоскелетом в отростках (нейритах) и синапсах [31]. Экспрессия NCS-1 также наблюдается в клетках глии: незрелых астроцитах гиппокампа и бергмановских глиальных клетках мозжечка [6]. NCS-1 содержится в радиально ориентированных астроцитах, которые отвечают за передачу сигналов между разными структурами спинного мозга в процессе его развития [32]. За пределами ЦНС NCS-1 преимущественно локализуется в нервно-мышечных окончаниях и мышечных веретенах — рецепторах, которые направляют в нервную систему информацию о скорости сокращения и длине мышц, а также в энтеральной нервной системе кишечника [33–35]. В коже NCS-1 сконцентрирован в нервных окончаниях вблизи кровеносных сосудов [36]. В целом, на нервную ткань приходится более 60% от общей экспрессии NCS-1 [25]. Остальная часть белка экспрессируется в сердце и в небольших количествах в почках, кишечнике и предстательной железе [7].

Внутри клеток основная доля NCS-1 содержится в мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и аппарата Гольджи и небольшая часть — в растворимой фракции цитоплазмы [37]. В телах нейронов коры, гиппокампа и мозжечка NCS-1 сосредоточен в приядерной области, на поверхности мембранных цистерн комплекса Гольджи, наиболее удаленных от ядра (так называемых транс-Гольджи) [28]. В клетках мозга NCS-1 преобладает в постсинаптических окончаниях по сравнению с пресинаптическими окончаниями — исключение составляют богатые NCS-1 окончания аксонов мшистых ядер мозжечка. В аксонах NCS-1 колокализуется с нейрофиламен-тами, микротрубочками и ЭПР. Особенно много NCS-1 вблизи перехватов Ранвье [36]. NCS-1 не входит в состав синапсом, хотя колокализуется с белками SV2 и синаптофизин — маркерами синаптических пузырьков [28]. NCS-1, как правило, отсутствует в ядре, однако небольшое количество этого белка присутствует в ядрах кардиомиоцитов [38].

ФУНКЦИЯ NCS-1 В НОРМЕ

Фенотипы, делеционные по *NCS1*, характеризуются многочисленными дефектами развития, что отражает широкое разнообразие функций кодируемого этим геном белка. Примерно треть мышей с фенотипом *Ncs1*^{-/-} погибает вскоре после рождения, а особи, доживающие до взрослого возраста, склонны к ожирению и диабету II типа [39, 40]. У животных с делецией *Ncs1* также нарушена когнитивная функция: у таких мышей отмечают тревожное поведение и намного менее охотное исследование новой среды [41–43]. Действительно, NCS-1 обладает набором из более чем 20 различных регуляторных мишеней: рецепторов, ионных каналов, ферментов и не только — и задействован во множестве внутриклеточных сигнальных путей. Он принимает участие в регуляции нейротрансмиссии, рецепции, роста и развития нейрональных отростков, а также секреции, синтеза фосфоинозитидов, гомеостаза Ca²⁺, клеточной мобильности и выживания в условиях стресса. Один из важнейших аспектов функциональной активности NCS-1 — регуляция процессов синаптической пластичности, лежащих в основе механизмов высшей нервной деятельности.

Регуляция синаптической пластичности

Синаптическая пластичность представляет собой изменение силы и чувствительности синапса в ответ на определенную последовательность стимулов и обеспечивается его морфологической и функциональной перестройкой. Эти явления играют ключевую роль при формировании нейрон-

ных связей в ходе роста и развития организма, а также в рамках механизмов обучения и памяти. К основным типам синаптической пластичности относятся следующие: кратковременная потенция (short-term potentiation, STP), кратковременная депрессия (short-term depression, STD), долговременная потенция (long-term potentiation, LTP) и долговременная депрессия (long-term depression, LTD) (для обзора см. [44]). NCS-1 вовлечен сразу в несколько этих процессов. Хотя этот белок присутствует в головном мозге повсеместно, наиболее богаты им нейроны различных отделов гиппокампа. Особенно много NCS-1 в мшистых волокнах — пучках немиелинизированных аксонов, которые передают информацию из зубчатой извилины в отдел гиппокампа CA3 [45]. Зубчатая извилина гиппокампа — одна из немногих структур мозга, где возможен нейрогенез во взрослом организме. Благодаря этому свойству, зубчатая извилина является основной зоной пластичности во взрослом мозге [46]. При LTP, индуцированной *N*-метил-*D*-аспаратом (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA), в гиппокампе крысы экспрессия NCS-1 в нейронах зубчатой извилины заметно повышается [47]. В свою очередь, избыток NCS-1 снижает пороговое значение стимуляции, необходимое для запуска LTP, которое лежит в основе механизмов обработки информации в гиппокампе, позволяющих мозгу распознавать элементы окружения и отличать “новое” от “знакомое” [48, 49]. В гиппокампальных нейронах CA1–CA3, отвечающих в том числе за пространственную память, NCS-1 индуцирует STP [50]. За счет этой регуляции NCS-1 может способствовать “пробуждению” синапсов, которые прежде находились в неактивном состоянии [51]. Кроме того, NCS-1 непосредственно задействован в регуляции глутаматзависимой LTD, которая развивается в ответ на активацию метаболитных рецепторов глутамата, регулирующих в этом числе экспрессию NCS-1 [52, 53]. Показано, что для развития глутаматзависимой LTD в нейронах гиппокампа необходимо взаимодействие NCS-1 с Ca^{2+} -связывающим белком PICK1 (protein interacting with C kinase-1). Предполагается, что активация глутаматных рецепторов приводит к локальному высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо, что позволяет NCS-1 Ca^{2+} -зависимым образом связывать PICK1. В свою очередь, PICK1 индуцирует фосфорилирование и интернализацию ионотропных рецепторов глутаматного типа, AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid), и таким образом способствует развитию LTD [54]. Примечательно, что альтернативный, или NMDA-зависимый, путь развития LTD не требует наличия NCS-1 [52]. Наконец, NCS-1 может принимать участие в регуляции LTD и в нейронах мозжечка. Кора мозжечка разделена на продольные компартменты (кластеры),

и механизмы двигательного обучения связаны в том числе с Ca^{2+} -зависимой индукцией LTD между нейронами, принадлежащими к разным кластерам [55]. NCS-1 входит в число белков, уровень экспрессии которых значительно отличается между соседними кластерами, и, таким образом, рассматривается как возможный участник этих механизмов [56].

Благодаря способности выступать в роли регулятора синаптической пластичности, NCS-1 принимает непосредственное участие в механизмах обучения и памяти. Так, у мышей селективное увеличение экспрессии NCS-1 в зубчатой извилине гиппокампа повышает склонность к исследованию и способствует улучшению краткосрочной и долгосрочной пространственной памяти [48]. У животных дикого типа исследование новой среды и регулярная физическая активность стимулируют увеличение уровня NCS-1 в гиппокампе [42, 57]. Недостаток NCS-1, напротив, подавляет интерес к исследованию, мотивированность, ухудшает пространственную память, провоцирует тревожность и депрессивное состояние [41–43, 58].

Регуляция нейрогенеза

В связи с тем, что экспрессия NCS-1 значительно выше в развивающемся мозге, чем в зрелом, было сделано предположение о его особой роли в процессах роста и дифференцировки нейронов [59]. Действительно, у млекопитающих NCS-1 считается одним из самых ранних маркеров нервных клеток [30]. Паттерн экспрессии NCS-1 в нервно-мышечных окончаниях, спинном мозге, сердце, а также слуховой, обонятельной и зрительной системах значительно меняется в ходе их развития и часто коррелирует с такими процессами, как рост аксонов и синаптогенез [30–33, 59–61]. Примечательно, что в зрелом организме NCS-1, напротив, подавляет рост и ветвление нейритов [62]. Вероятно, это связано с тем, что после созревания нейронов запускаются механизмы, ограничивающие их рост и регенерацию, и NCS-1 может быть в них задействован. В нейроэндокринных клетках, которые способны приобретать черты нейронов под действием фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF), подавление активности NCS-1 повышает эффективность роста нейритов [63]. Однако при полной инактивации NCS-1 в нервных окончаниях спинальных ганглиев рост нейритов полностью прекращается [63]. По-видимому, NCS-1 оказывает комплексное воздействие на морфологию нейронных отростков за счет регуляции гомеостаза Ca^{2+} , в результате чего и избыток, и критический недостаток этого белка приводят к серьезным нарушениям структуры и функции нейронов.

Регуляция секреции

Одним из первых открытых свойств NCS-1 была его способность заметно ускорять время отклика моторных нейронов на стимул [12]. Было высказано предположение, что NCS-1 является регулятором экзоцитоза и, таким образом, напрямую воздействует на скорость выброса нейромедиатора. Действительно, в нейроэндокринных клетках надпочечников, где механизмы секреции во многом аналогичны нейрональным, NCS-1 колокализуется с секреторными гранулами и стимулирует выброс их содержимого в ответ на возбуждение пуринергических и гистаминовых рецепторов [64–66]. NCS-1 также стимулирует секрецию адренотропного гормона клетками таламуса, повышая число образуемых клеткой секреторных пузырьков [67]. В спинном мозге NCS-1 преимущественно локализуется в клетках, секретирующих нейропептид CGRP, и, возможно, участвует в регуляции этого процесса [36].

Примечательно, что в интактных нейроэндокринных клетках избыточная экспрессия NCS-1 влияет только на агонистзависимую секрецию [68]. По-видимому, воздействие NCS-1 на механизм секреции происходит не напрямую, а при участии белков-посредников. Непосредственно запуск экзоцитоза под действием NCS-1 может происходить за счет высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров [65]; при этом сам белок может выступать в роли активатора секреции за счет Ca^{2+} -зависимой регуляции фосфатидилинозитол-4-киназы- β (PI4K β), катализирующей синтез фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate, PI(4,5)P $_2$) [13, 65, 69, 70]. Действительно, NCS-1 колокализуется и взаимодействует с PI4K β в ряде клеточных линий [65, 69–73]. Более того, наличие функционально активной формы PI4K β необходимо для формирования гранулярных структур в приядерной области, на поверхности которых накапливается NCS-1 [72]. В нейроэндокринных клетках Ca^{2+} -связанный NCS-1 способствует мембранной ассоциации PI4K β в ответ на возбуждение пуринергических рецепторов клетки [37, 74]. Именно на примере нейроэндокринных клеток наиболее подробно изучена регуляция экзоцитоза под действием NCS-1/PI4K β и предложена модель (рис. 2), которая подтверждена многочисленными экспериментальными данными [37, 64, 74–76]. Согласно этой модели, NCS-1 способствует более эффективному высвобождению внутриклеточного Ca^{2+} при стимуляции клеток молекулами агониста (например, АТФ или брадикинина). Это происходит за счет активации PI4K β и повышения уровня фосфоинозитидов PI4P (phosphatidyl inositol-4-phosphate) и PI(4,5)P $_2$. Последний относится к субстратам фосфолипазы C (PLC) и основным источникам сигнальной молекулы инози-

толтрифосфата (IP $_3$). Связываясь с рецепторами на поверхности ЭПР, IP $_3$ запускает высвобождение внутриклеточных запасов Ca^{2+} , что, в свою очередь, стимулирует секрецию. В клетках с избыточной экспрессией NCS-1 увеличен запас субстрата для PLC и, следовательно, повышен уровень сигнала при воздействии агониста.

Взаимодействие NCS-1 с PI4K β в нервных клетках менее изучено, хотя качественно образование комплекса между этими белками показано методом коиммунопреципитации [37]. У крыс NCS-1 и PI4K β совместно локализируются в дендритах нейронов спинального ганглия, а также в телах и дендритах нейронов гиппокампа [37, 77]. Кроме того, NCS-1 при посредничестве PI4K β стимулирует синтез PI4P и регулирует выброс нейромедиаторов норэпинефрина и глутамата из нервных окончаний [78]. В отсутствие NCS-1 в нейронах гиппокампа мышей снижается уровень фактора роста BDNF и число секреторных гранул, содержащих BDNF и дофамин [58]. Добавим, что регуляция секреции под действием NCS-1 может опосредоваться не только PI4K β . В синаптических окончаниях нейронов воздействие антител против NCS-1 нарушает Ca^{2+} -зависимую секрецию норэпинефрина, но не глутамата [78]. Это может быть связано с различным строением и белковым составом регулируемых NCS-1 секреторных комплексов, содержащих эти нейромедиаторы. Например, в состав норэпинефриновых секреторных гранул входит еще один Ca^{2+} -чувствительный белок – CAPS, который также может быть задействован в NCS-1-зависимой сигнализации. Так, в β -клетках поджелудочной железы антитела против CAPS полностью блокируют эффект NCS-1 на секрецию инсулина [69]. Помимо CAPS выявлен ряд других потенциальных участников NCS-1/PI4K β -зависимой регуляции секреции: кальневрон-1, белки-адаптеры клатрина AP1 и AP2, синаптобrevин-2, белки группы ARF и APOL3 [79–83]. Кальневрон-1 конкурирует с NCS-1 за связывание с PI4K β при снижении уровня кальция до <400 нМ и ингибирует активность фермента, тем самым предотвращая спонтанную активацию комплекса NCS-1/PI4K β [80]. Аполипопротеин APOL3 связывается с Ca^{2+} -наполненным NCS-1 и способствует образованию комплекса NCS-1/PI4K β [79]. NCS-1 колокализуется со всеми белками ARF и Ca^{2+} -зависимым образом связывает ARF1 – доказанный сигнальный партнер PI4K β [84]. По отдельности и NCS-1, и ARF1 стимулируют активность PI4K β , однако в присутствии NCS-1 эффективность ARF1 как активатора фермента значительно снижается. Более того, при совместной экспрессии в нейроэндокринных клетках ARF1 препятствует активации секреции под действием NCS-1. По-видимому, NCS-1 и PI4K β могут конкурировать за связыва-

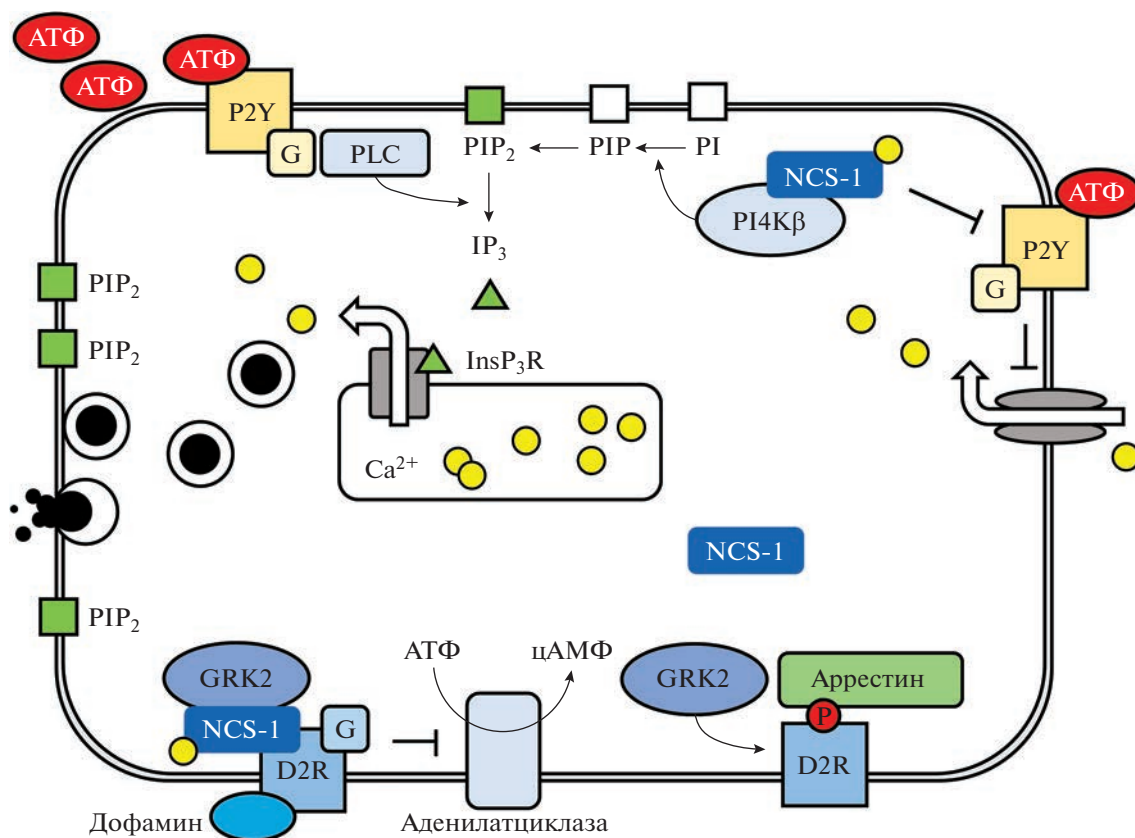


Рис. 2. Примеры внутриклеточной регуляторной активности NCS-1. NCS-1 выполняет регуляцию секреции, Ca^{2+} -зависимым образом стимулируя фосфорилирование фосфатидилинозитола (PI) и накопление в мембранах фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP_2). При связывании АТФ с пуриnergическими рецепторами (P2Y) происходит активация фосфолипазы C (PLC), которая способствует образованию из PIP_2 сигнальной молекулы инозитолтрифосфата (IP_3). Связываясь с рецепторами (inositol triphosphate receptors, InsP_3R) на поверхности ЭПР, IP_3 запускает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров. При повышении внутриклеточного Ca^{2+} возрастает подвижность секреторных везикул и их склонность к слиянию с плазматической мембраной и выбросу содержимого. Одновременно NCS-1 выступает в роли регулятора сигнальных каскадов GPCR (G-protein-coupled receptor). В присутствии Ca^{2+} NCS-1 образует тройной комплекс с рецептором дофамина (D2R) и сопряженной с ним протеинкиназой GRK2, предотвращая фосфорилирование рецептора, его связывание с аррестином, инактивацию и впоследствии интернализацию. В свою очередь, D2R ингибирует аденилатциклазу и тем самым блокирует ряд цАМФ-зависимых сигнальных путей в нейронах.

ние с ARF1. Таким образом, становится невозможной одновременная активация фермента обоими регуляторными белками и может достигаться дифференцировка сигнальных путей, запускаемых различными стимулами.

Регуляция рецепторов, сопряженных с G-белками

Белок NCS-1 был идентифицирован в качестве регулятора дофаминовой сигнализации [85]. Дофаминовый путь играет ключевую роль в управлении памятью, вниманием и системой вознаграждения, а его нарушения связаны с рядом психоневрологических расстройств, таких как шизофрения, биполярное расстройство и болезнь Паркинсона. Семейство дофаминовых рецепторов относится к сопряженным с G-белками (G-protein coupled receptor, GPCR) и включает пять трансмембранных рецепторов (D1–D5). В сигнальные

комплексы с этими рецепторами входят белки из группы DRIP (dopamine receptor-interacting proteins), среди которых идентифицировано несколько регуляторных Ca^{2+} -связывающих белков [86]. В ранних работах методом дрожжевого скрининга было выявлено взаимодействие NCS1-1 с C-концевым участком рецепторов D2, D3 и D5 [85]. Способность NCS-1 связываться с рецептором D2 (D2R) подтвердили и методом аффинного соосаждения. Затем на клеточной модели было продемонстрировано, что избыток NCS-1 препятствует агонистзависимой интернализации D2R. NCS-1 также нивелирует эффект избыточной экспрессии протеинкиназ GRK2 и GRK3, которые фосфорилируют D2R и D3R, на интернализацию этих рецепторов (рис. 2). В присутствии ионов Ca^{2+} NCS-1 коиммунопреципитирует с D2R и GRK2 из клеточных лизатов, что предполагает образование этими белками тройного

комплекса. Замечено, что NCS-1 взаимодействует с киназой GRK2 и в отсутствие рецептора и теоретически может регулировать ее активность в отношении как D2R, так и других рецепторов — субстратов этого фермента [87]. В некоторых отделах мозга D2R образует гетеродимеры с аденозиновыми рецепторами A_{2A}R [88]. Такой гетеродимер может функционировать как агонистзависимый активатор или ингибитор аденилатциклазы — в зависимости от сочетания доступных агонистов или присутствия дополнительных регуляторных белков. Показано, что в нейронах полосатого тела NCS-1 и еще один Ca²⁺-связывающий белок — кальневрон-1 — конкурируют за связывание с гетеродимером D2R/A_{2A}R при разных концентрациях внутриклеточного Ca²⁺. В этом случае Ca²⁺-NCS-1 предотвращает аллостерическое ингибирование D2R на фоне активации A_{2A}R и способствует снижению уровня цАМФ, в то время как кальневрон-1 связывается с гетеродимером при большом избытке Ca²⁺ и блокирует оба рецептора [89].

Белок NCS-1 также колокализуется с D2R в синаптических окончаниях нейронов префронтальной коры головного мозга — области высокой пластичности, тесно связанной с когнитивной функцией, — поэтому их взаимодействие может играть важнейшую роль в процессах высшей нервной деятельности [90]. Действительно, влияние NCS-1 на механизмы обучения и памяти связано с его участием в дофаминергической сигнализации [48]. Ингибирование взаимодействия между NCS-1 и D2R в нейронах зубчатой извилины гиппокампа при помощи минимального пептида D2R, способного связываться с NCS-1, приводит к снижению уровня экспрессии дофаминового рецептора в мембранах гиппокампальных нейронов, подавлению NCS-1-индуцированной синаптической пластичности и снижению когнитивной функции у экспериментальных животных. В отсутствие NCS-1 также снижен уровень дофаминергической активности в нейронах прилежащего ядра головного мозга, участвующих в системе вознаграждения и мотивации [41].

Семейство белков GPCR характеризуется сходством структуры и некоторыми общими механизмами активации/десенситизации. В связи с этим логично ожидать, что, помимо дофаминовых рецепторов фреквенин/NCS-1 может связывать и другие мишени среди белков этого семейства. Например, в нейроэндокринных клетках, содержащих избыток NCS-1, усилен ответ на стимуляцию мускариновых рецепторов [91]. NCS-1 и кальневрон-1 конкурируют за связывание с рецептором каннабионидов CB₁R в нейронах полосатого тела [92]. Кроме гетеродимеров с D2R NCS-1 связывает гомодимеры A_{2A}R и участвует в Ca²⁺-зависимой регуляции связанных с ним процес-

сов: фосфорилировании протеинкиназ ERK1/ERK2 и АКТ [93].

Как уже упоминалось, NCS-1 обладает способностью регулировать протеинкиназы из семейства GRK [87]. Известно, что на 7 генов, кодирующих белки семейства GRK в геноме человека, приходится более 800 генов GPCR, поэтому каждый белок GRK участвует во множестве сигнальных путей, причем не только за счет ферментативной активности [94]. Следовательно, через регуляцию протеинкиназ GRK NCS-1 может не только регулировать десенситизацию самых разных GPCR, но и участвовать в других сигнальных процессах. Необходимо добавить, что NCS-1 стимулирует синтез PI(4,5)P₂ — фактора мембранной ассоциации и непосредственного активатора ряда GRK [75, 95]. Таким образом, образование комплекса NCS-1 с указанными ферментами совсем не обязательное условие для их регуляции под действием этого Ca²⁺-сенсорного белка, которая может осуществляться им опосредовано [95].

Регуляция ионных каналов

В мозге позвоночных NCS-1 колокализуется с калиевыми каналами А-типа, которыми богаты тела и дендриты нейронов гиппокампа и гранулярных клеток мозжечка [96]. В присутствии Ca²⁺ NCS-1 способствует активации K⁺-каналов, содержащих субъединицы Kv4.2 и Kv4.3, усиливая ток ионов и замедляя их инактивацию [97]. В клеточной модели NCS-1 активирует K⁺-каналы несколько менее эффективно, чем их доказанный регулятор KChIP2 — гомологичный белок из подсемейства НКС, члены которого взаимодействуют с K⁺-каналами (K⁺-channel interacting proteins, KChIPs) [98]. Предполагается, что NCS-1 регулирует внутриклеточный транспорт K⁺-каналов из приадресной области на плазматическую мембрану нейронов. В нейронах симпатической нервной системы NCS-1 снижает эффективность брадикининзависимого закрытия K⁺-каналов М-типа [99, 100]. Вероятно, это происходит за счет активации синтеза PI(4,5)P₂, который необходим для поддержания этих каналов в открытой конформации. NCS-1 участвует в регуляции K⁺-каналов не только в нейронах, но и в клетках в сердечной мышце. В эмбриональных кардиомиоцитах обнаружена колокализация NCS-1 с Kv4.2, в то время как экспрессия белков KChIP достигает максимума только после рождения [59]. NCS-1 также коиммунопреципитирует с Kv4.3 из лизата миокарда мыши [98]. Хотя в кардиомиоцитах Kv4.3 регулируется KChIP2, последний практически отсутствует в волокнах Пуркинье, которые образуют в сердце специализированную проводящую систему и значительно отличаются по субъединичному составу K⁺-каналов и механизмам регуля-

ции K^+ -тока от других клеток сердечной мышцы. Заметим, что при этом экспрессия NCS-1 в волокнах Пуркинье значительно превышает экспрессию KChIP2 [101]. В условиях *in vitro* NCS-1 и белок волокон Пуркинье DPP6 проявляют синергический эффект в отношении Kv4.3 и активируют его не менее эффективно, чем KChIP2. Таким образом, NCS-1 и белки KChIP обладают общими мишенями в сердце, но регулируют их в разных типах клеток либо на разных этапах развития сердечной мышцы.

Установлено, что NCS-1 может выступать в роли регулятора потенциалзависимых кальциевых каналов. Например, в хромаффинных клетках он активирует Ca^{2+} -каналы N- и P/Q-типов, функция которых в норме регулируется под действием АТФ и опиоидов. Так, введение мутации, препятствующей связыванию Ca^{2+} и, как следствие, активации NCS-1, способствует значительному усилению тока Ca^{2+} , что предполагает конститутивную стимуляцию указанных каналов [102]. Этот процесс управляется тирозинкиназами из семейства Src, которые фосфорилируют одну из субъединиц Ca^{2+} -канала P/Q-типа [103]. Примечательно, что в другой клеточной модели, на основе нейроэндокринных клеток, рекомбинантный NCS-1 наоборот подавлял ток Ca^{2+} через потенциалзависимые каналы L-, P/Q- и N-типа: Ca^{2+} -связанный NCS-1 одновременно снижал чувствительность Ca^{2+} -каналов к деполяризации мембраны и способствовал их инактивации после прохождения сигнала [104]. Оказалось, что восприимчивость каналов типа P/Q к действию NCS-1 определяется изоформой регуляторной β -субъединицы, входящей в их состав. Так, каналы, содержащие изоформу β_2 , в наибольшей степени подвержены NCS-1-зависимой регуляции. Предполагается, что белок может связывать β -субъединицу и мешать ее включению в состав канала, таким образом препятствуя активации последнего [104]. В нейронах NCS-1, как правило, выступает в роли активатора Ca^{2+} -каналов. Это может быть связано с тем, что в нервных клетках, в отличие от нейроэндокринных клеток, преобладают Ca^{2+} -каналы, содержащие субъединицу β_3 , устойчивую к ингибиторному действию NCS-1 [105]. Так, в чашечках Хельда NCS-1 стимулирует ток Ca^{2+} через каналы P/Q-типа, а в моторных нейронах NCS-1 активирует Ca^{2+} -каналы N-типа совместно с фактором роста GDNF [106, 107]. В нейронах верхнего шейного ганглия NCS-1 связывает C-концевой домен α -субъединицы каналов P/Q-типа и замедляет Ca^{2+} -зависимую инактивацию этих каналов, опосредуя развитие STP [108, 109]. Таким образом, регуляторная активность NCS-1 в отношении потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов определяется их субъединичным составом,

который, в свою очередь, может зависеть от типа клетки или даже от внутриклеточной локализации канала.

Кроме потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов NCS-1 взаимодействует и с другими типами каналов для этого катиона. В синаптических окончаниях NCS-1 образует прочный комплекс с Ca^{2+}/Na^+ -каналами TRPC5, которые участвуют в регуляции роста нейритов, и Ca^{2+} -зависимым образом стимулирует активность этих каналов [63]. NCS-1 также коиммунопреципитирует с рецептором-1 IP_3 ($InsP_3R1$), который функционирует как Ca^{2+} -канал на поверхности ЭПР, и активирует этот рецептор, тем самым запуская всплеск концентрации внутриклеточного Ca^{2+} [110]. Показано, что уровень $InsP_3R1$ в цитоплазме нейроэндокринных клеток повышается в присутствии избытка NCS-1 и $InsP_3R1$ обеспечивает локализацию NCS-1 в конусах роста нейронов [91, 111]. NCS-1 также регулирует активность другого IP_3 -рецептора — $InsP_3R2$ — в сердце эмбриона [39].

Регуляция рецепции

На основании некоторых данных NCS-1 отводится роль Ca^{2+} -зависимого модулятора рецепторных систем организма. Например, более 10% от суммарной экспрессии белка приходится на сетчатку глаза [25], где NCS-1 экспрессируется в том числе в фоторецепторных клетках — палочках и колбочках, отвечающих за прием и передачу светового сигнала. Методами иммуногистохимии установлено, что основная часть NCS-1 локализуется во внутренних сегментах и синаптических окончаниях фоторецепторов [112], а по результатам биохимических исследований он присутствует и в наружных сегментах этих клеток, содержащих родопсин и другие компоненты зрительного каскада [113, 114]. Снижение концентрации кальция в этом компартменте после прохождения светового сигнала запускает фосфорилирование (десенситизацию) фотовозбужденного родопсина родопсинкиназой (GRK1), контролируемое при участии НКК рековерина, и активацию фоторецепторных гуанилатциклаз под действием белков GCAP (guanylate cyclase activating proteins), также относящихся к семейству НКК. Все эти события способствуют восстановлению уровня цГМФ и Ca^{2+} и возвращению фоторецепторов к темновому состоянию [115]. В ранних работах показано, что в присутствии Ca^{2+} NCS-1 ингибирует фосфорилирование родопсина под действием GRK1 *in vitro* [5], хотя физиологическая релевантность этого эффекта до сих пор остается недоказанной. Впоследствии была установлена колокализация NCS1 и GRK1 в наружных сегментах палочек сетчатки, а также продемонстрирована способность этих белков образовывать комплекс и даже разре-

шена кристаллическая структура последнего [113, 114, 116]. Показано также, что при добавлении к препаратам наружных сегментов палочек быка рекомбинантный ортолог NCS-1 — фреквенин — при низких концентрациях кальция (<150 нМ) стимулировал гуанилатциклазную активность [3]. В другом эксперименте NCS-1 также связывал и активировал фоторецепторную гуанилатциклазу ONE-GC, правда, уже при высоких концентрациях Ca^{2+} [117]. В целом, несмотря на имеющиеся данные, регуляторная активность NCS-1 в отношении компонентов зрительного каскада в наружных сегментах фоторецепторов все же требует дальнейших исследований. Добавим, что некоторые сигнальные партнеры NCS-1: $\text{InsP}_3\text{R1}$ и GRK2 — присутствуют и во внутренних сегментах фоторецепторов [118, 119]. Так, Ca^{2+} -зависимая регуляция IP_3 -рецепторов поверхности ЭПР (к ним относится $\text{InsP}_3\text{R1}$), в которой NCS-1 задействован в других типах клеток, обеспечивает выживание фоторецепторов в условиях стресса [120]. Функция GRK2 в фоторецепторах точно не выяснена, так как в них отсутствуют ее основные субстраты. Тем не менее недавно показано, что GRK2 может обладать широким интерактомом, который не ограничивается GPCR [87]. Кроме того, потенциальной мишенью NCS-1 могут быть Ca^{2+} -каналы L-типа и аденозиновые рецепторы A_{2A}R , экспрессирующиеся в ленточных синапсах фоторецепторов [121, 122].

Нейропротекторная активность NCS-1

Белок NCS-1 не только вовлечен в процессы роста и созревания нейронов, но и принимает участие в механизмах, обеспечивающих их выживание и восстановление после повреждений. Так, экспрессия NCS-1 в спинальных мотонейронах значительно возрастает после механических или химических повреждений [123]. NCS-1 проявляет нейропротекторную функцию в модели ишемии мозга, уменьшая область повреждения [22]. Нейропротекторные свойства NCS-1, по-видимому, объясняются его участием в $\text{PI3K}/\text{Akt}$ сигнальном пути. Так, показано, что NCS-1 способствует увеличению содержания фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата ($\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$) в плазматической мембране. С этим фосфоинозитидом связывается протеинкиназа Akt, что увеличивает ее локальную концентрацию на мембране и тем самым стимулирует ее фосфорилирование и активацию. Активированная Akt перемещается в ядро, где фосфорилирует ряд факторов транскрипции, обеспечивающих выживание нейронов [124]. Действительно, экспрессия рекомбинантного NCS-1 в нейронах способствует повышению уровня фосфо-Akt, ускоренному аксональному росту и восстановлению двигательной функции после травмы

пирамидного тракта у экспериментальных животных [125].

В ряде исследований выявлена способность NCS-1 нивелировать цитотоксические эффекты ионов кальция. Например, избыточная экспрессия NCS-1 способствует восстановлению нормальной митохондриальной функции и гомеостаза Ca^{2+} в клетках, делеционных по WFS1 — трансмембранному белку, который играет важную роль в транспорте ионов кальция между ЭПР и митохондриями [126]. WFS1 связывает NCS-1 и в комплексе с ним принимает участие в регуляции IP_3 -рецепторов на поверхности ЭПР [127]. Таким образом, NCS-1 можно рассматривать в качестве перспективной мишени для терапии синдрома Вольфрама — нейродегенеративного заболевания, ассоциированного с мутациями в гене *WFS1*. В клетках слуховых ядер ствола мозга в ответ на стресс (абляцию афферентных слуховых нейронов) не только значительно повышается экспрессия NCS-1, но и происходит перераспределение этого белка между синаптическими окончаниями и телом клетки [128]. В связи с тем, что слуховые нейроны отличаются очень высокой активностью, они нуждаются в эффективной регуляции присущей им Ca^{2+} -буферной системы [129]. NCS-1 может быстро детектировать локальные повышения концентрации Ca^{2+} и защищать эти нейроны от гибели, ассоциированной с избытком этого катиона. В целом, NCS-1 присутствует во множестве сенсорных систем и может защищать от Ca^{2+} -токсичности высокоактивные нейроны, к которым относятся также фоторецепторные клетки [30, 31, 130–132]. Как уже говорилось, NCS-1 задействован в $\text{PI3K}/\text{Akt}$ -зависимом сигнальном пути, который запускает механизмы выживания и роста клеток в стрессовых условиях [93, 125, 133]. Именно активация этого пути необходима для сохранения фоторецепторов при светоиндуцированных повреждениях сетчатки и других дегенеративных заболеваниях, таких как пигментный ретинит [134, 135].

Наконец, появляется все больше данных, из которых можно сделать вывод о том, что NCS-1 вовлечен в процессы внутриклеточной антиоксидантной защиты. Например, действуя совместно с фактором роста GDNF, NCS-1 защищает клетки PC12 от апоптоза при воздействии высоких (до 300 мкМ) концентраций H_2O_2 [123]. В кардиомиоцитах в отсутствие NCS-1 развивается уязвимость к окислительному стрессу на фоне присутствия 100 мкМ H_2O_2 : повышается доля гибнущих клеток, падает выработка АТФ, снижается уровень митохондриального дыхания и концентрация компонентов дыхательной цепи, происходит деполаризация митохондриальной мембраны [133].

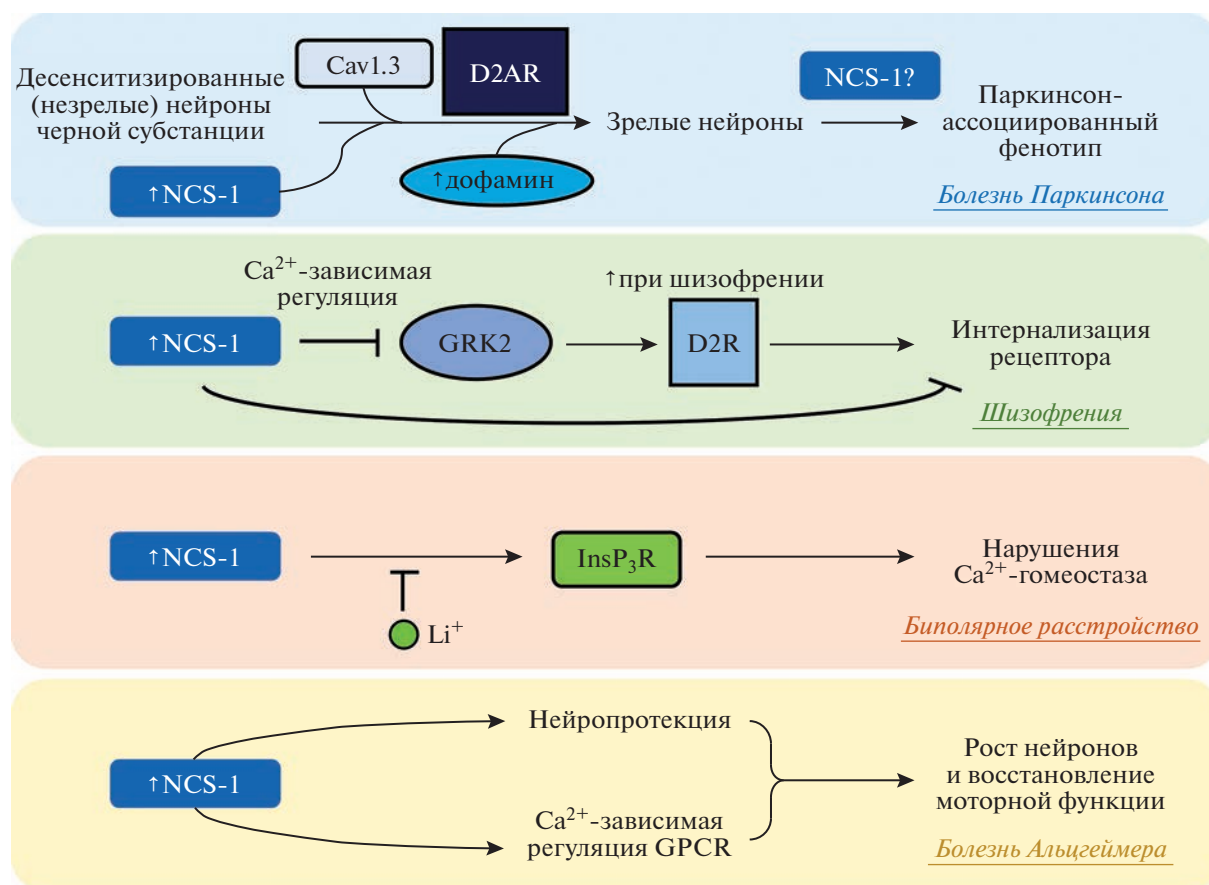


Рис. 3. Участие NCS-1 в патогенезе заболеваний нервной системы. Повышение экспрессии NCS-1 в пейсмекерных нейронах черной субстанции среднего мозга и NCS-1-опосредованная регуляция Ca^{2+} -каналов Cav1.3 и дофаминовых ауторецепторов D2A приводят к адаптации нейронов к патологическим сигналам дофамина и формированию более жизнеспособного фенотипа. При шизофрении и биполярном расстройстве избыток NCS-1 препятствует нормальной интернализации рецептора D2R и приводит к его накоплению на мембране, что влечет повышение чувствительности нейронов к дофамину. Связываясь с рецептором инозитолтрифосфата (InsP_3R), избыточный NCS-1 способствует массовому высвобождению Ca^{2+} из ЭПР и нарушению Ca^{2+} -гомеостаза. Комплекс NCS-1 с InsP_3R разрушается в присутствии ионов лития, которые широко применяют для лечения психических расстройств. В случае болезни Альцгеймера повышение уровня NCS-1 может быть компенсаторным ответом на гибель нейронов, так как этот белок вовлечен в пути Ca^{2+} -зависимой регуляции роста и регенерации нейрональных отростков.

АБЕРРАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ NCS-1 ПРИ ПАТОЛОГИЯХ

Нарушения экспрессии и функции NCS-1 ассоциированы с рядом заболеваний [136]. В основном это психические расстройства (шизофрения и биполярное расстройство), нарушения развития нервной системы (аутизм) и нейродегенеративные заболевания (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера) (рис. 3). В последние годы появляется все больше данных о роли NCS-1 в канцерогенезе [137, 138]. Развитие патологий может быть ассоциировано как с повышенной, так и с пониженной экспрессией NCS-1, а также с мутациями в гене *NCS1* и окислением белка. Следовательно, NCS-1 рассматривают как потенциальную мишень для антипсихотической, нейрорегенеративной и противоопухолевой терапии: для

ряда препаратов, нацеленных на модификацию комплексов NCS-1 с его сигнальными партнерами, уже подтверждена эффективность в клеточных и животных моделях некоторых заболеваний [137, 138].

Психические расстройства

Участие NCS-1 в регуляции дофаминергической сигнализации привлекло внимание к этому белку в контексте изучения когнитивных расстройств. У пациентов с шизофренией и биполярным расстройством примерно вдвое повышена экспрессия NCS-1 в префронтальной коре головного мозга [139]. Повышение уровня NCS-1 также коррелирует с возрастной деменцией [140]. В клеточной модели NCS-1 подавляет синтез и

протеинкиназа А (protein kinase A, PKA)-зависимое фосфорилирование белка DARPP-32, низкий уровень которого в префронтальной коре ассоциирован с шизофренией [141, 142]. Результатом избыточной активности NCS-1 может быть нарушение регуляции “тормозящих” рецепторов D2 и, как следствие, снижение уровня вторичного мессенджера цАМФ в клетке либо снижение возбуждимость нейронов за счет увеличения K^+ -тока [86]. Перечисленные факторы могут способствовать снижению активности префронтальной коры, что характерно для этого заболевания.

Для биполярного расстройства характерны нарушения цикла сна и бодрствования, связанные с дисфункцией пейсмекерных нейронов в среднем мозге, вклад которых в общую электрическую активность мозга проявляется в виде γ -волновых колебаний [143]. Показано, что NCS-1 регулирует кальциевые токи, лежащие в основе γ -волн в нейронах педункулопонтинного ядра. Белок оказывает двухфазный эффект на активность γ -волн: при концентрации 1 мкМ значительно усиливает колебания, а при большом избытке (>10 мкМ), напротив, провоцирует их полное затухание [144]. Предполагается, что активность NCS-1 опосредована дисрегуляцией двух альтернативных сигнальных путей, в которых задействованы потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы P/Q-типа, запускающие пробуждение, либо каналы N-типа, поддерживающие фазу быстрого сна [145]. Связываясь с IP_3 -рецепторами в ЭПР, NCS-1 может индуцировать повышение внутриклеточного Ca^{2+} и активацию САМКП-киназ, непосредственно регулирующих активность Ca^{2+} -каналов [146]. Ионы лития, которые входят в препараты для лечения биполярного расстройства, препятствуют активации рецептора $InsP_3R1$ под действием NCS-1, а также нивелируют аномальную активность Ca^{2+} -каналов в педункулопонтинных нейронах [110, 147, 148].

Лечение антипсихотическими препаратами не оказывает воздействия на уровень NCS-1 [140, 149–151]. В то же время нейролептик хлорпромазин, который применяют для лечения шизофрении, связывается с NCS-1 в присутствии Ca^{2+} [152]. В свою очередь, противоэпилептическое средство вальпроат, применяемое для лечения биполярного расстройства, стимулирует экспрессию NCS-1 в передней доле мозга экспериментальных животных [19]. В связи с тем, что взаимодействие между D2R и NCS-1 рассматривается как мишень для антипсихотической терапии, был выполнен скрининг потенциальных ингибиторов этого связывания и выявлен ряд соединений, подавляющих взаимодействие NCS-1 с пептидом D2R. Такая активность выявлена в частности для алкалоидов метерголина, тетрандрина и резерпина [153].

Наркотическая зависимость

В ряде работ показано возможное участие NCS-1 в механизмах, обуславливающих наркотическую зависимость, развитие которой связано с нарушениями дофаминергической сигнализации и проницаемости K^+ -каналов в некоторых отделах мозга [154–156]. Так, повышенная экспрессия NCS-1 в префронтальной коре у лабораторных животных ассоциирована с большей склонностью к героиновой зависимости [157]. В модели зависимости от морфина экспрессия NCS-1 в миндалевидном теле мозга крысы значительно повышена при абстиненции [158]. Полиморфизм rs1054879 в некодирующей 3'-области гена *NCS1* значительно улучшал прогноз лечения от никотиновой зависимости у пациентов с определенным аллелем рецептора D2R [159]. Полиморфизмы rs1342043 и rs7849345 в интроне-1 гена *NCS1* ассоциированы с кокаиновой зависимостью [160]. Заметим, что вышеперечисленные мутации не ассоциированы с аминокислотными заменами в белке NCS-1 и не затрагивают известные сайты связывания транскрипционных факторов в регуляторных областях гена *NCS1* или в регуляторных микроРНК, так что механизм их действия пока остается неизвестным.

Умственная отсталость, ассоциированная с X-хромосомой

Белок NCS-1 связывается с внутриклеточным доменом белка IL1RAPL1, мутации в котором ассоциированы с наследственной формой умственной отсталости [161]. IL1RAPL1 представляет собой трансмембранный нейрональный белок, гомологичный рецептору интерлейкина-1 и Toll-подобным рецепторам. IL1RAPL1 локализуется в синаптических окончаниях нейронов, где он связывается с гуанилаткиназой PSD-95 и принимает участие в регуляции механизмов синаптогенеза и синаптической пластичности [162]. Мутации в гене *IL1RAPL1* ассоциированы с серьезными когнитивными нарушениями при отсутствии видимых дефектов развития мозга [163]. Показано, что IL1RAPL1 совместно с NCS-1 участвует в регуляции потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов N-типа [164], однако прямых указаний на участие NCS-1 в патологическом механизме, связанном с активностью мутантного IL1RAPL1, пока не выявлено.

Расстройства аутистического спектра

Расстройства аутистического спектра (РАС) — группа заболеваний, связанных с нарушениями развития нервной системы, которые выражаются в повторяющемся поведении и сниженной способности к коммуникации. Интересно, что у экспериментальных животных с фенотипом *Ncs1*^{-/-}

регистрируют нарушения социального поведения и когнитивной функции, сходные с теми, которые наблюдаются у пациентов с PAC [165]. NCS-1 также входит в число белков, мутации в генах которых ассоциированы с аутизмом [166]. Например, у одного из таких пациентов обнаружена замена R102Q в составе Ca^{2+} -связывающего центра белка [167]. Наличие этой мутации приводит к общей дестабилизации NCS-1 и значительным структурным перестройкам в его С-концевой области, а также к изменению динамики связывания белка с клеточными мембранами. Указанные факторы могут приводить к нарушению функции NCS-1 в клетке и лежать в основе дефектов Ca^{2+} -сигналикации при PAC [168].

Болезнь Паркинсона

Уровень экспрессии NCS-1 существенно снижен у пациентов с болезнью Паркинсона — нейродегенеративным заболеванием, связанным с нарушением функции дофаминовых рецепторов и утратой синаптической пластичности в черной субстанции, а также гибелью пейсмейкерных нейронов в этом отделе головного мозга [130]. Дофаминергические нейроны черной субстанции характеризуются интенсивным метаболизмом и высоким содержанием Ca^{2+} , что делает их особенно уязвимыми к окислительному стрессу и токсичности, вызванной избытком Ca^{2+} [169]. Показано, что в пресинаптических окончаниях нейронов черной субстанции NCS-1 Ca^{2+} -зависимым образом регулирует D2A-ауторецепторы дофамина, активность которых нарушена при болезни Паркинсона [170]. Эта регуляция контролируется током Ca^{2+} через потенциалзависимые каналы L-типа Cav1.3, которые рассматривают в качестве мишеней для лечения болезни Паркинсона [130, 171]. NCS-1 также связывается с митохондриальным белком PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1), мутации в гене которого у людей ассоциированы с наследственными формами болезни Паркинсона, однако физиологическая роль этого взаимодействия до сих пор не выяснена [81]. В выживших нейронах черной субстанции наблюдается, напротив, компенсаторное повышение экспрессии NCS-1, что, по-видимому, способствует их адаптации к избыточным уровням дофамина и/или ионов Ca^{2+} и выживанию при этом заболевании, то есть выполняет нейропротекторную функцию [172]. Действительно, в модели болезни Паркинсона подавление экспрессии NCS1 значительно снижает выживаемость клеток [130]. Фенотип *Ncs1*^{-/-} также характеризуется снижением экспрессии ряда белков: компонента комплекса I дыхательной цепи митохондрий ND1, митохондриальных белков-разобщителей UCP4 и UCP5, гликолитической енолазы ENO2, редоксчувствительного шаперона и

фактора транскрипции DJ-1 и Ca^{2+} -каналов Cav2.3 [173]. Эти изменения могут быть частью механизма адаптации, направленного на защиту нейронов от источников стресса, который выражается в снижении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и интенсивности митохондриальной функции.

Болезнь Альцгеймера

Экспрессия NCS-1 в мозге значительно повышена при болезни Альцгеймера — нейродегенеративном заболевании со сложной этиологией, связанной в том числе с утратой связей между нейронами в результате формирования в нервной ткани бляшек из неправильно свернутого β -амилоида [174]. На животной модели (дрозофила) показано, что восстановление моторной функции и числа синаптических окончаний, которые были утрачены в ходе патологических процессов, вызванных токсичным амилоидным пептидом A β 42, может быть достигнуто за счет стабилизация комплекса ортолога NCS-1 — фреквенина — с белком Ric8a [175]. Этот белок локализуется с фреквенином и связывается с ним при низком уровне Ca^{2+} . Будучи регулятором GPCR, Ric8a стимулирует нейротрансмиссию и регулирует развитие нейрональных отростков. Предполагается, что фреквенин может играть роль Ca^{2+} -зависимого регулятора Ric8a, ингибируя его активность в состоянии покоя и высвобождая его в ответ на сигнал Ca^{2+} [176]. Кроме регуляции нейротрансмиссии (через регуляцию аналогов Ric8a или другие пути), потенциальная роль NCS-1 при болезни Альцгеймера может быть связана с его нейропротекторной активностью. Таким образом, повышение экспрессии белка NCS-1 при этом заболевании может быть важным компенсаторным механизмом.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА И СВОЙСТВА NCS-1

Описанные выше особенности активности NCS-1 в норме и при патологии связаны с его мембранной локализацией и способностью распознавать и регулировать сигнальные мишени, что определяется конформационными свойствами этого белка. Последние модулируются за счет связывания внутриклеточных лигандов (в первую очередь, металлов и сигнальных фосфолипидов) и чувствительны к изменениям внешних условий, таких как редокс-потенциал внутриклеточной среды. Многообразие функций NCS-1 делает его уникальным среди белков НКК. Большинство представителей семейства модулирует активность строго определенной мишени или нескольких близких по структуре мишеней (K^+ -каналов, гуанилатциклаз и т.д.) в определенном

узком диапазоне концентрации Ca^{2+} . Однако, несмотря на выраженное сходство всех уровней структуры с другими НКС, NCS1 может регулировать активность множества партнеров (не сегодняшний момент идентифицировано более 20 белков [177]), что значительно расширяет спектр его сигнальной активности. При анализе структуры NCS-1 выявлены не только консервативные среди НКС участки, отвечающие за связывание ионов кальция, но и уникальные последовательности, которые сосредоточены в основном в N-концевой и C-концевой областях этих белков и, по-видимому, участвуют в образовании уникальных сетей внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий, определяющих сродство к металлам, положение миристоильной группы, а также чувствительность белка к фосфолипидному составу клеточных мембран и узнавание мишеней.

Молекулярные свойства NCS-1

Как и другие белки НКС, NCS-1 представляет собой α -спиральный белок, содержащий четыре Ca^{2+} -связывающих мотива типа EF-hand (EF1–EF4). EF1 и EF2 вместе составляют N-концевую, а EF3 и EF4 – C-концевую домены белка. Указанные домены соединены линкером, содержащим консервативный остаток глицина, что обуславливает их конформационное вращение друг относительно друга. Каждый мотив EF-hand состоит из двух α -спиралей и расположенной между ними петли. Ион кальция координируется атомами кислорода основной и боковой цепи остатков аспартата и/или глутамата в 1(x), 3(y), 5(z), и 12(–z) положениях петли, карбонильным кислородом пептидной связи в 7(–y) позиции петли, а также кислородом молекулы воды, ассоциированной с остатком в 9(–x) положении петли за счет водородных связей [178]. В центре петли находится короткий β -тяж из трех аминокислотных остатков (это единственная β -структура в белках НКС). При связывании иона кальция происходит смещение α -спиралей мотива EF-hand вокруг остатка глицина в позиции 6 петли, что переводит его в открытую конформацию. Во всех НКС, включая NCS-1, EF1 не способен связывать Ca^{2+} из-за присутствия не координирующих этот металл остатков лизина и цистеина в позициях 1 и 3 соответственно, а также Pro в позиции 4 [179]. Для NCS-1 позвоночных животных были получены кристаллические структуры Ca^{2+} -связанных форм немиристоилированного белка человека и крысы (PDB 1G8I и 5AEQ соответственно) [18, 116]. Кроме того, трехмерная структура немиристоилированного Ca^{2+} -заполненного NCS-1 человека разрешена методом ЯМР-спектроскопии (PDB 2LCP) [180]. Согласно последней, белок содержит 9 α -спиралей, 4 коротких β -тяжа (в составе Ca^{2+} -связывающих сайтов EF-hand) и 3 неструк-

турированные петли (между EF1 и EF2, между EF3 и EF4 и после EF4).

N-конец NCS-1 подвергается котрансляционному миристоилированию под действием N-миристоилтрансферазы-1, причем белок присутствует в клетке исключительно в такой форме, что подтверждено данными масс-спектрометрического анализа [181]. Как и в большинстве НКС, миристоильная группа NCS-1, во-первых, отвечает за его связывание с клеточными мембранами и, во-вторых, необходима для поддержания структуры конформеров белка. В отсутствие Ca^{2+} она погружена внутрь молекулы белка, образуя многочисленные контакты с гидрофобной сердцевинной глобулы [182–184]. В общем случае миристоильная группа играет роль своего рода шаперона для белков НКС: набор взаимодействующих с ней остатков и соответствующая структура апоформы белка уникальны для каждого представителя семейства. При связывании кальция у части НКС (GCAPs) миристоильная группа остается внутри структуры белка, в то время как у другой части (рековерин, VILIP-1, нейрокальцин- δ и гиппокальцин) участвует в механизме, называемом Ca^{2+} -миристоильным переключателем. В последнем случае конформационные перестройки в ответ на координацию кальция EF-hand-мотивами приводят к экспонированию в раствор как миристоильной группы (чтобы впоследствии обеспечить связывание белка с мембранами), так и остатков, исходно формирующих для нее гидрофобный карман в структуре белка. Экспонированные остатки гидрофобного кармана образуют контакты с мишенями белков НКС. NCS-1, по-видимому, не имеет функционального Ca^{2+} -миристоильного переключателя. Некоторые уникальные элементы структуры этого белка обеспечивают необычный, Ca^{2+} -независимый, характер его взаимодействия с мембранами, в котором однако принимает участие миристоильная группа (см. раздел “Связывание с мембранами”); при этом наличие последней в значительной степени определяет структуру не только бескальциевой, но и Ca^{2+} -связанной формы белка [185]. Играя ключевую роль в мембранной ассоциации NCS-1, миристоильная группа обеспечивает правильную внутриклеточную локализацию белка, а также его функциональную активность. Так, в отсутствие миристата NCS-1 утрачивает способность активировать $\text{PI4K}\beta$ и ингибировать потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы N-типа, хотя сохраняет некоторые другие функции: например, способность индуцировать STP в нейронах гиппокампа [50, 72, 104, 186].

Главное отличие структуры NCS-1 от других НКС заключается в наличии протяженного гидрофобного кармана, сформированного остатками как из N-концевого, так и из C-концевого доменов белка. Доступность этого кармана и, как

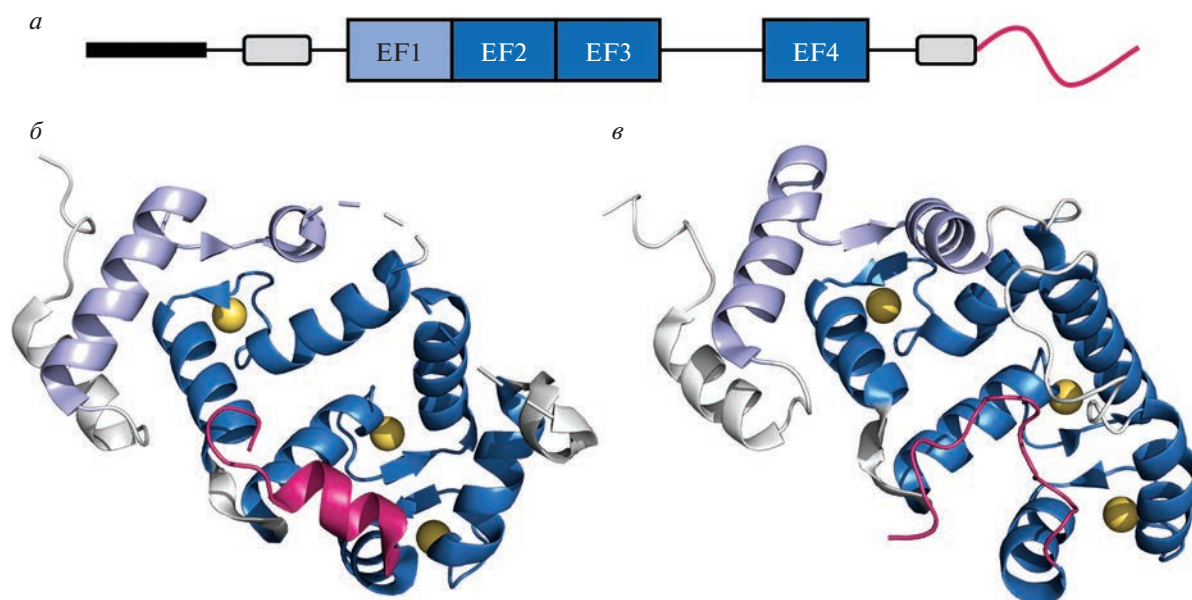


Рис. 4. Молекулярная структура NCS-1. *а* – Схема доменной структуры NCS-1. *б* – Кристаллическая структура Ca^{2+} -связанной формы NCS-1 (PDB 5AEQ). *в* – ЯМР-структура Ca^{2+} -связанного NCS-1 (PDB 2LCP). Цветом выделены нефункциональный (голубой) и функциональные (синий) EF-hand-мотивы и С-концевой сегмент (розовый). Ионы кальция представлены желтыми сферами.

следствие, уникальное строение мультифункционального сайта связывания мишеней NCS-1 в значительной степени обеспечивается структурой его так называемого “С-концевого сегмента” – участка P177–V190 полипептидной цепи (рис. 4а) [114, 187]. В кристалле это последняя, десятая, α -спираль белка (рис. 4б), в то время как в ЯМР-структуре эта область неструктурирована и образует множественные контакты с поверхностью открытого гидрофобного кармана на всем его протяжении (рис. 4в) [180]. За счет этого взаимодействия С-концевой сегмент значительно стабилизирует Ca^{2+} -связанную форму NCS-1: при его удалении белок приобретает менее компактную и более динамичную структуру, а также склонность к образованию димеров [116, 188]. Согласно молекулярно-динамическим моделям, удаление С-концевого сегмента модифицирует структуру белка примерно так же, как повышение температуры на 6°C [189]. Важно, что в отсутствие мишени С-концевой сегмент Ca^{2+} -заполненного NCS-1 прикрывает остатки гидрофобного кармана, одновременно поддерживая конформационную стабильность молекулы [180]. В присутствии мишени (например, D2R) С-концевой сегмент NCS-1 смещается, открывая доступ к соответствующему ей сайту [190] (см. раздел “Взаимодействие с белками-мишенями”).

Связывание кальция и магния

Белок NCS-1 характеризуется относительно высоким сродством к ионам кальция [191]. Ми-

ристоилирование NCS-1 приводит к повышению его Ca^{2+} -чувствительности, а также обуславливает кооперативность связывания ионов этого металла [68, 192, 193]. Миристоилированный NCS-1 последовательно связывает три иона Ca^{2+} с константами диссоциации, равными 60 мкМ, 53 нМ и 377 нМ, причем для первых двух сайтов характерна кооперативность связывания [193]. Установлен следующий порядок заполнения сайтов в миристоилированном NCS-1: EF2 $\rightarrow$ EF3 $\rightarrow$ EF4, где EF2 обладает наименьшим, а EF3 наибольшим сродством к Ca^{2+} [192]. Координация Ca^{2+} вызывает последовательные конформационные изменения в NCS-1, в результате которых возрастает α -спиральность и гидрофобность поверхности белка, что свидетельствует об экспонировании остатков гидрофобного кармана, по всей видимости, участвующих в связывании мишеней [191, 193, 194]. Помимо кальция NCS-1 обладает сравнительно высоким сродством к Mg^{2+} : миристоилированный белок некооперативно связывает два таких иона со средней константой 17 мкМ [191]. В присутствии физиологических концентраций Mg^{2+} (порядка 0.9 мМ) сродство белка к Ca^{2+} снижается: соответствующая усредненная константа диссоциации возрастает с 90 до 440 нМ [195]. Магний связывается в EF2 и EF3, из которых вытесняется кальцием, при этом EF4 остается исключительно Ca^{2+} -связывающим сайтом [191]. В то время как координация кальция значительно стабилизирует NCS-1, обеспечивает восстановление его структуры после воздействия денатурирующих агентов и

защищает белок от трипсинового протеолиза, связывание магния лишь частично стабилизирует апоформу и снижает ее поверхностную гидрофобность [185, 191, 194]. Величина сродства NCS-1 к кальцию в присутствии магния (300–400 нМ) согласуется с предполагаемой регуляторной функцией NCS-1 в синаптических окончаниях нейронов, для которых характерны изменения уровня внутриклеточного Ca^{2+} как раз в субмикромольном диапазоне. Таким образом, в синапсах NCS-1, по-видимому, быстро реагирует на небольшие локальные изменения концентрации кальция в условиях, когда другие Ca^{2+} -сенсоры (кальмодулин, рековерин, VILIP-1) еще неактивны.

Связывание с мембранами

Практически во всех типах тканей, где был обнаружен NCS-1, он локализуется в примембранном слое [27, 73]. Связывание с клеточными мембранами играет важнейшую роль в функциональной активности всех белков НКС, поскольку позволяет им компартментализоваться с белками-мишенями. NCS-1 отличается тем, что обладает высоким сродством к мембранам не только в присутствии, но и в отсутствие ионов Ca^{2+} . Так, при фракционировании мозгового вещества надпочечников в присутствии хелатора Ca^{2+} NCS-1 обнаружен как в цитоплазматической, так и в микросомальной фракциях [66]. Сведения о Ca^{2+} -чувствительности связывания NCS-1 с очищенными клеточными мембранами противоречивы: в одной работе [68] для него не обнаружено Ca^{2+} -зависимости при связывании с мембранами из мозга крысы, в другой [117] он Ca^{2+} -зависимо связывался с мембранами гиппокампа быка. Однако в условиях клетки мембранная локализация NCS-1 все же обладает слабой, но достоверной чувствительностью к изменениям концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Например, в нейроэндокринных клетках открытие Ca^{2+} -каналов в ответ на стимуляцию пуринергических рецепторов способствует повышению доли мембранной формы NCS-1 с 75 до 90% [37]. Наиболее вероятно, что в отсутствие Ca^{2+} мембранная и растворимая формы NCS-1 находятся в динамическом равновесии, а в присутствии Ca^{2+} это равновесие смещается в сторону мембранной формы, то есть связывание NCS-1 с мембранами все же Ca^{2+} -зависимый процесс [167]. Примечательно, что эта Ca^{2+} -зависимость нарушается при внесении замены R102Q, ассоциированной с аутизмом: наличие мутации приводит к “замораживанию” бескальциевой формы белка на мембране [167].

Отсутствие функционального Ca^{2+} -миристоильного переключателя у NCS-1 и, как следствие, лишь частичная обратимость его взаимодействия с клеточными мембранами, по всей видимости,

обеспечивается уникальными элементами его структуры, отсутствующими у других НКС. Например, такую роль может играть N-концевая α -спираль белка между сигналом миристоилирования и EF1-мотивом. Так, если внести эту последовательность в НКС с функционирующим Ca^{2+} -миристоильным переключателем — в гиппокальцин, — то он приобретает способность связываться с мембранами в отсутствие Ca^{2+} , подобно NCS-1. Высказано предположение, что жесткая структура этой α -спирали, стабилизированная водородными связями между боковыми группами остатков E14–R18 и E15–K19, фиксирует N-конец и миристоильную группу белка в экспонированном положении [196]. В связывании NCS-1 с мембранами могут быть задействованы и другие элементы его структуры, такие как C-концевой сегмент. Например, пересадка этого участка из рековерина (НКС с функционирующим Ca^{2+} -миристоильным переключателем) в NCS-1 придает последнему способность взаимодействовать с фоторецепторными мембранами с более низким сродством, однако полностью обратимым Ca^{2+} -зависимым образом. Эти данные позволяют предположить, что C-концевой сегмент регулирует обратный захват миристоильной группы бескальциевой формой NCS-1 [114].

Сродство белков НКС к различным клеточным мембранам существенно различается, что может определяться их чувствительностью к липидному составу, регулируемой с помощью специальных аминокислотных остатков, расположенных на N-конце этих белков вблизи миристоильной группы [197–199]. Например, NCS-1 проявляет повышенное Ca^{2+} -зависимое сродство к PI4P и фосфатидилсерину (PS) ($K_d = 12$ мкМ), однако связывается с различающимися по фосфолипидному составу гиппокампальными и фоторецепторными мембранами Ca^{2+} -независимым образом [193, 200, 201]. В последнем случае связывание в меньшей степени зависит от миристоилирования и более чувствительно к замене N-концевых остатков: K3, K7 и/или K9, — что отражает сродство белка к отрицательно заряженным фосфолипидам. Среди мажорных фосфолипидов мембраны NCS-1 действительно предпочитает PS и PI, причем взаимодействие с первым ингибируется в результате замен указанных N-концевых аминокислот. Интересно, что NCS-1 также связывается с фосфоинозотидами, преимущественно PI3P, причем для этого сигнального фосфолипида предусмотрен специальный сайт в N-концевом домене, что говорит о важности указанного взаимодействия для сигнальной функции белка [201].

Многие белки-участники синаптической передачи, включая белки комплекса SNARE и Ca^{2+} -каналы Cav2.1, входят в состав устойчивых к действию детергентов мембранных микродоменов

или “рафт-структур” (detergent-resistant membranes, DRM), обогащенных холестерином [202]. Подобная организация обеспечивает колокализацию регуляторных белков и их мишеней и быстрый ответ на локальные сигналы Ca^{2+} . Показано, что при стимуляции брадикинином нейроэндокринных клеток NCS-1 в них переходит в DRM, которые обогащены не только холестерином, но и $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ [203]. Интересно, что NCS-1 и белки SNARE присутствуют в разных микродоменах и NCS-1, судя по всему, не является прямым регулятором компонентов экзоцитоза, а управляет этим процессом опосредованно — за счет модуляции гомеостаза Ca^{2+} в синаптических окончаниях [68]. Основным белковый компонент DRM — кавеолин-1. Это трансмембранный каркасный белок, обладающий регуляторной активностью в отношении различных сигнальных белков. Оказалось, что в фоторецепторных клетках сетчатки NCS-1, как и некоторые другие НКС, может взаимодействовать с кавеолином-1 в составе мембран. Образование комплекса происходит за счет взаимодействия с каркасным доменом 1–101 белка. Примечательно, что с кавеолином-1 связывается только бескальциевая форма NCS-1. Таким образом, посредством связывания с кавеолином-1 NCS-1 может удерживаться на мембранах (в DRM) при низком уровне кальция, что, по-видимому, усиливает его активность или обеспечивает более быстрые ответы на Ca^{2+} -сигналы, в том числе в рамках каскада фототрансдукции [113].

Взаимодействие с белками-мишенями

На основании структурного анализа комплексов NCS-1 с большинством сигнальных партнеров можно заключить, что в этих взаимодействиях участвует протяженный сайт в молекуле Ca^{2+} -сенсора, который состоит из консервативных остатков гидрофобного кармана и доступ к которому регулируется при участии С-концевой области белка. Например, дрожжевой фреквенин Ca^{2+} -независимым образом связывает N-концевой участок Pik1 — ортолога PI4K позвоночных — в соотношении 1 : 1 с константой диссоциации порядка 140 нМ [181]. При этом взаимодействии С-концевой сегмент фреквенина смещается, высвобождая остатки гидрофобного кармана, которые, в свою очередь, образуют контакты с двумя гидрофобными α -спиралями Pik1 (125–136 и 156–169 а.о.), соединенными неупорядоченным U-подобным участком. Указанные спирали связываются в антипараллельной ориентации: N-концевой участок фрагмента Pik1 в С-концевом домене фреквенина, а С-концевой участок Pik1 в N-концевом. Подобный характер связывания может служить объяснением механизму активации Pik1 : при взаимодействии с фреквенином полипептид-

ная цепь киназы изгибается таким образом, чтобы регуляторный домен LKU на N-конце молекулы сближался с киназным доменом на ее С-конце и активировал последний [204]. NCS-1 взаимодействует с Pik1 по такому же механизму и с таким же сродством (150 нМ) [17].

Аналогичная конфигурация взаимодействия наблюдается и в случае D2R. В присутствии Ca^{2+} NCS-1 связывает С-концевой участок рецептора D2 (430–444 а.о.) в соотношении 1 : 2 с константой диссоциации, равной 14 мкМ (по другим данным 40 мкМ) [116, 190]. Оба участка образуют α -спирали, причем одна из них связывается в N-концевом домене NCS-1, а вторая — в С-концевом домене, ориентируясь С-концами навстречу друг другу (рис. 5а) [116, 190]. Наиболее выраженные перестройки в молекуле NCS-1 при связывании D2R происходят в области петли между EF3 и EF4, которая, как и С-концевой сегмент, отличается вариабельностью среди белков семейства и, таким образом, может отвечать за формирование уникальных сайтов связывания белков-партнеров. Однако С-концевой сегмент белка также участвует в общем структурировании комплекса, принимая конформацию, состоящую из двух коротких α -спиралей (177–180 и 184–188 а.о.), соединенных петлей. Одновременное связывание двух молекул D2R может иметь важное физиологическое значение с учетом того, что этот рецептор функционирует в виде димера.

В случае еще одной потенциальной мишени NCS-1 — GRK1 (родопсинкиназы) — в связывании с NCS-1 вовлекается тот же ее N-концевой участок (1–25 а.о.), что и при связывании с другим НКС — рековерином, доказанным модулятором активности фермента в сетчатке [205]. В то же время положение пептида GRK1 в молекуле NCS-1 заметно отличается от такового в рековерине: он располагается в глубине гидрофобного кармана белка между N- и С-концевыми доменами (рис. 5б). Подобное положение также регулируется С-концевым сегментом NCS-1, который в присутствии мишени смещается, утрачивая значительную часть контактов с остальной молекулой белка [114, 116, 206]. Роль С-концевого сегмента NCS-1 в организации GRK1-связывающего сайта подтверждается тем фактом, что замена этого участка на соответствующую последовательность рековерина существенно сказывается на эффективности ингибирования ферментативной активности GRK1 [114].

Структуры комплексов NCS-1 с другими мишенями пока не разрешены, однако и здесь косвенные данные указывают на гидрофобный карман и С-концевой сегмент как основные элементы структуры, опосредующие взаимодействие. Например, комплекс NCS-1/фреквенина с белком Ric8a эффективно разрушается при добавле-

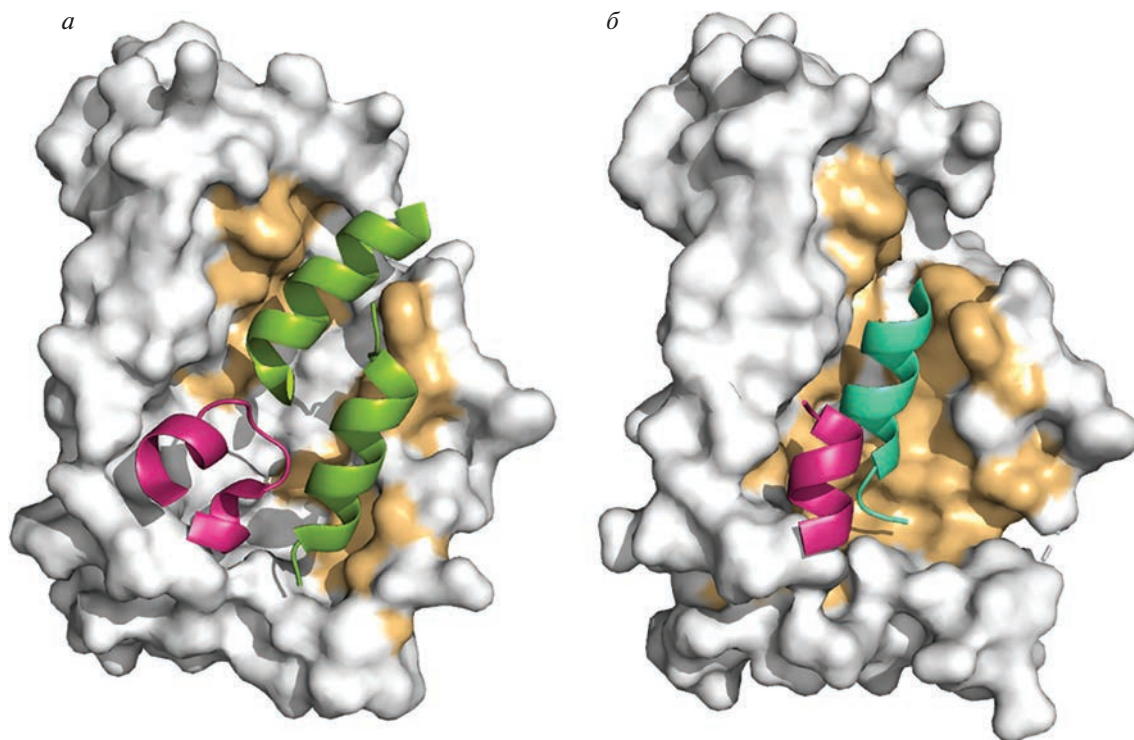


Рис. 5. Структуры комплексов NCS-1 с белками-мишенями. *а* – Комплекс NCS-1 с двумя фрагментами (430–444 а.о.) рецептора дофамина D2R (PDB 5AER). *б* – Комплекс NCS-1 с фрагментом (1–25 а.о.) GRK1 (PDB 5AFP). Цветом выделены остатки гидрофобного кармана, образующие интерфейс связывания мишени (оранжевый), С-концевой сегмент (розовый), фрагменты D2R (зеленый) и GRK1 (бирюзовый).

нии антипсихотических препаратов фенотиазинов, которые образуют контакты одновременно с остатками гидрофобного кармана и С-концевого сегмента NCS-1 и таким образом, вероятно, заякоривают последний в гидрофобном кармане, препятствуя связыванию мишени [207, 208]. Связывание Ric8a в гидрофобном кармане NCS-1 происходит даже в отсутствие кальция [176]. Это подтверждается тем фактом, что низкомолекулярные соединения, которые вытесняют С-концевой сегмент из гидрофобного кармана, стабилизируют соответствующий комплекс [175]. Ca^{2+} -зависимое связывание NCS-1 с супрессорным доменом рецептора $\text{InsP}_3\text{R1}$ (66–110 а.о.) также происходит с участием гидрофобного кармана, поскольку ключевую роль в нем играет остаток L89, входящий в состав этой структуры и принимающий участие в связывании других мишеней, включая D2R и GRK1 [206, 209]. В механизме Ca^{2+} -независимого взаимодействия NCS-1 с IL1RAPL1 остатки гидрофобного кармана не задействованы, однако внутриклеточный домен IL1RAPL1 (549–644 а.о.) связывается непосредственно с С-концевым сегментом NCS-1 [161]. Установлено, что мутация R102Q, ассоциированная с аутизмом, не сказывается на этом взаимодействии, однако затрудняет погружение С-кон-

цевого сегмента в гидрофобный карман и стабилизирует последний в открытом положении, потенциально снижая специфичность регуляторной активности NCS-1. Действительно, в структуре NCS-1 присутствует сеть ионных взаимодействий между остатками С-концевого сегмента и белковой глобулой, в то время как мутация R102Q приводит к перестройке этой сети и утрате С-концевым сегментом характерной для него гибкости [167, 210, 211]. Это приводит, например, к повышению эффективности связывания NCS-1 с D2R, что может также играть роль в патогенезе аутизма, ассоциированного с мутацией R102Q [190, 212].

В целом, гибкий и подвижный С-концевой сегмент NCS-1 регулирует доступ к гидрофобному карману белка, формируя специфический сайт связывания для каждой из его мишеней. В отличие от остатков гидрофобного кармана, С-концевой сегмент NCS-1 уникален среди белков НКК и вследствие этого представляет собой удобную мишень для перспективных лекарственных препаратов, направленных на селективное подавление aberrантной функции NCS-1 без воздействия на другие белки НКК. Роль С-концевого сегмента в качестве внутреннего ингибитора NCS-1 подтверждена в ряде исследований. В общем случае добавление к белку пептида, имитиру-

ющего С-концевой сегмент, в высокой концентрации блокирует функциональную активность NCS-1, конкурируя за взаимодействие с его мишенями. Например, введение избытка С-концевого пептида в синапсы экспериментальных животных полностью нейтрализует способность NCS-1 активировать синаптическую передачу [106]. Кроме того, как упоминалось выше, одним из вариантов таргетной терапии в отношении активности NCS-1 может быть использование низкомолекулярных соединений, регулирующих подвижность его С-концевого сегмента. Подобные подходы имеют терапевтический потенциал при таких патологиях как синдром хрупкой Х-хромосомы, болезнь Альцгеймера и др. [175, 208].

РЕГУЛЯЦИЯ НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ NCS-1

Связывание ионов цинка

Недавно продемонстрировано, что помимо кальция и магния NCS-1 связывает ионы цинка, причем апоформа белка связывает три Zn^{2+} в два высокоаффинных (106 нМ) и один низкоаффинный (4 мкМ) сайт, в то время как магниевая и кальциевая формы, доминирующие в физиологических условиях, связывают по два иона цинка с субмикромольным сродством. Цинксвязывающие сайты, по-видимому, перекрываются с EF-hand-мотивами: высокие концентрации цинка вытесняют магний из этих мотивов и снижают стехиометрию связывания кальция с белком. При насыщении цинком NCS-1 проявляет в 14 раз большее сродство к кальцию в одном из сайтов, что повышает общую чувствительность белка к ионам этого металла. Важно, что заполнение Zn^{2+} -связывающих сайтов оказывает выраженные, но разнонаправленные эффекты на вторичную структуру, конформационное состояние и, как следствие, функциональные свойства NCS-1. Так, высокоаффинное связывание цинка повышает термостабильность бескальциевой формы NCS-1 и способствует взаимодействию его Ca^{2+} -связанной формы с белками-мишенями, такими как D2R и GRK1. Напротив, низкоаффинное связывание цинка способствует агрегации NCS-1, сопровождающейся образованием патологических скрученных макроструктур белка. Таким образом, результатом сложных взаимозависимых взаимодействий NCS-1 с магнием, кальцием и цинком является появление разнообразных конформаций белка, что, в свою очередь, модулирует его функциональный статус [213].

В целом, способность воспринимать колебания концентраций внутриклеточного цинка, по-видимому, относится к общим свойствам белков НКС, которые могут быть условно разделены на три категории: устойчивые к цинку Ca^{2+} -сенсорные

белки; физиологические сенсоры Ca^{2+} и Zn^{2+} , способные координировать мобильный цинк; а также патологические сенсоры Ca^{2+} и Zn^{2+} , связывающие цинк в только аномально высоких концентрациях, что приводит к их денатурации и агрегации [214]. NCS-1 занимает промежуточное положение в этой классификации и в определенных условиях может выступать в роли как физиологического, так и патологического сенсора цинка. Содержание цинка в нервной ткани чрезвычайно высокое, однако его свободная концентрация строго регулируется за счет работы системы цинковых транспортеров и высокоаффинных Zn^{2+} -буферных белков, а также менее аффинных Zn^{2+} -регуляторных белков, обеспечивающих перенос и передачу мишеням мобильного цинка [215]. В этом случае aberrантное повышение концентрации полностью высвободившегося цинка вызывает мощный нейротоксический эффект, ассоциированный с рядом нейродегенеративных и нейроофтальмологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, возрастная макулярная дегенерация и глаукома [216–218]. Можно предположить, что NCS-1 не только осуществляет взаимосвязь между Ca^{2+} -зависимыми и Zn^{2+} -зависимыми сигнальными путями в здоровых нейронах, но и служит одним из триггеров, которые опосредуют инициацию патологических механизмов, ассоциированных с нейротоксичностью цинка.

Редокс-регуляция

Примечательно, что повышение концентрации как мобильного (находящегося в составе сравнительно лабильных комплексов с сигнальными белками), так и свободного цинка в клетке часто связано с окислительным стрессом [216]. В этих условиях цинк может высвобождаться из буферных белков (преимущественно металлотионеинов) в ответ на окисление остатков цистеина, входящих в состав высокоаффинных сайтов связывания этого металла (“цинковых пальцев”) [219]. Как уже говорилось, NCS-1 может обеспечивать выживаемость клеток в условиях окислительного стресса. Таким образом, помимо опосредованных эффектов можно предположить наличие у него собственной редоксчувствительности, то есть способности изменять конформацию и сигнальную активность в ответ на изменение окислительно-восстановительного (редокс) потенциала клеточной среды. Действительно, некоторые НКС, такие как VILIP-1 и рековерин, — это редоксзависимые белки [220–222]. В случае рековерина это свойство обеспечивается за счет единственного в его структуре, консервативного среди НКС, остатка цистеина (в структуре нефункционального EF1-мотива), окисление которого приводит к образованию дисульфидного димера

(dRec) и/или окисленного мономера (с образованием остатка сульфеновой или сулфиновой кислот) белка — с измененной функциональной активностью [223, 224]. Важно отметить, что накопление dRec удалось зафиксировать непосредственно в клетках сетчатки, которая среди всех тканей организма наиболее уязвима для окислительного стресса [220–224]. Так, фоторецепторы обладают высокой метаболической активностью, характеризуются высоким уровнем потребления кислорода и уровнем внутриклеточного Ca^{2+} , а также постоянно подвергаются световому облучению и содержат значительное количество фоточувствительных молекул, которые генерируют активные формы кислорода в ответ на облучение светом. Кроме того, фоторецепторные мембраны обогащены полиненасыщенными жирными кислотами, которые особенно восприимчивы к окислительным повреждениям [225–227]. NCS-1 находится в аналогичных условиях, поскольку интенсивно экспрессируется в нейронах сетчатки (включая фоторецепторы) и содержит единственный остаток цистеина в том же положении, что и реверин. Более того, в ранних работах, посвященных исследованию структурно-функциональных свойств рекомбинантного немиристоилированного NCS-1, показано, что поверхностная доступность сульфгидрильной группы этого остатка цистеина может изменяться при связывании физиологических катионов (Mg^{2+} или Ca^{2+}), а значит не исключено ее участие в механизмах редокс-регуляции [194].

Недавно с использованием клеточной модели показано, что NCS-1 действительно является редоксчувствительным белком, реагируя на окисляющие условия образованием дисульфидного димера (dNCS-1), который накапливается в клетке в виде точечных скоплений в перинуклеарной области [228]. Формирование dNCS-1 представляет собой структурно детерминированный процесс, который не зависит от уровня внутриклеточного кальция, однако стимулируется при повышении концентрации свободного цинка, то есть в условиях, свойственных окислительному стрессу. Важно отметить, что окисленный белок обладает измененной чувствительностью к кальцию и функциональной активностью: связывает только один Ca^{2+} на мономер и имеет характерную структуру со сниженной α -спиральностью и термостабильностью и увеличенной гидрофобностью поверхности. Также как усиление конформационной гибкости С-концевого сегмента в мутанте NCS-1 R102Q приводит к повышению эффективности его связывания с D2R [192, 213], повышенная конформационная гибкость субчастиц в dNCS-1 проявляется в 20-кратном росте его сродства к GRK1 и значительном усилении ингибиторной активности в отношении фермента [228].

В цитоплазме клеток dNCS-1 может восстанавливаться при участии тиоредоксиновой системы. Таким образом, окисление NCS-1 — обратимый процесс, что открывает возможность для участия белка в механизмах редокс-регуляции. В то же время накопление dNCS-1 приводит к возникновению агрегатов белка, что, по всей видимости, дополнительно стимулируется цинком [213]. До определенного предела агрегаты окисленного NCS-1 могут утилизироваться протеасомой [228], однако образование избытка подобных окисленных форм обычно запускает реакцию несвернутых белков и вызывает апоптоз клетки [229]. Интересно, что в клетках ретинобластомы Y79, которые имеют общих предшественников с фоторецепторами сетчатки и продуцируют все основные зрительные белки [230], подавление экспрессии NCS-1 снижает их восприимчивость к апоптозу, вызванному окислительным стрессом. Более того, величина редокс-потенциала среды, при котором окисление NCS-1 максимально, приближается к уровню, характерному для апоптоза [228]. Учитывая эти данные, мы суммировали опосредованные NCS-1 редоксзависимые пути, регулирующие выживание или гибель клеток в ответ на окисляющие условия (рис. 6). В результате NCS-1 может выступать и как антиоксидантный нейропротекторный белок [123, 133], и, будучи окисленным до dNCS-1, проявлять aberrантную активность, которая может привести к гибели клеток и развитию нейродегенеративных процессов, связанных с заболеваниями нервной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на уникальное среди НКС многообразие функций NCS-1 в клетках нервной системы, для большинства организмов этот белок не относится к незаменимым. Этот парадокс может быть связан с тем, что утрата NCS-1 частично компенсируется другими кальциевыми сенсорами: например, кальмодулином или белками семейства НКС. Действительно, NCS-1 регулирует множество мишеней, общих с кальмодулином, кальневроном-1, белками KChIP и некоторыми другими Ca^{2+} -сенсорами [231]. В то же время NCS-1 обладает и набором уникальных функций, которые реализуются за счет, во-первых, специфического диапазона его чувствительности к ионам кальция, во-вторых, его сигнально детерминированной клеточной и субклеточной локализации и, в-третьих, паттерна его экспрессии в тканях в процессе развития организма. Непосредственно регуляторная активность NCS-1 управляется за счет сложных механизмов мембранной ассоциации и узнавания сигнальных партнеров, которые основаны на конформационных свойствах белка. Последние регулируются за

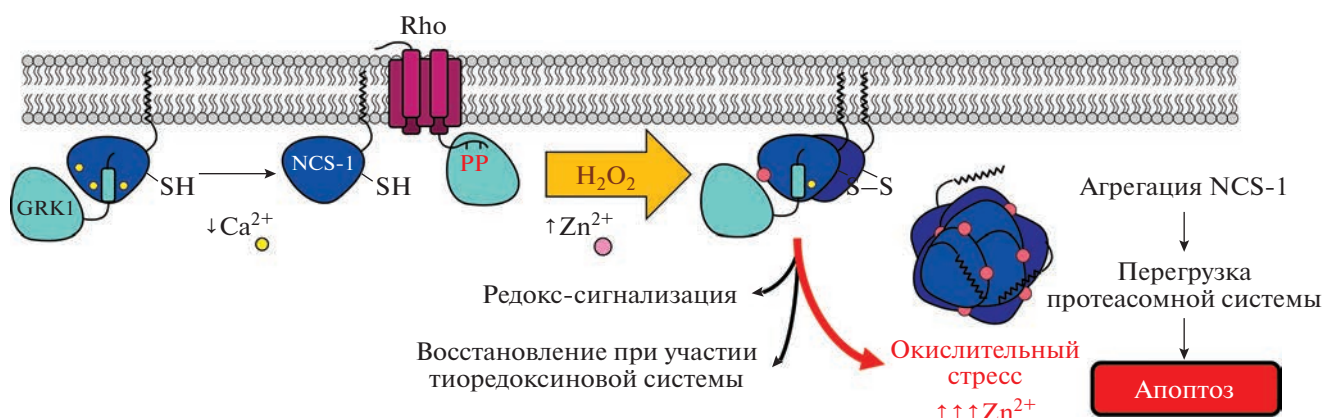


Рис. 6. Предполагаемый механизм редокс/ Zn^{2+} -зависимой регуляции NCS-1. При низких значениях редокс-потенциала среды NCS-1 (отмечен синим цветом), закрепленный на мембране за счет миристоильной группы, ингибирует протеинкиназу GRK (например, GRK1; отмечена голубым цветом) при высоком уровне кальция (отмечен желтым цветом) и высвобождает фермент при низком уровне кальция, тем самым инициируя фосфорилирование (десенситизацию) соответствующего GPCR (например, родопсина; отмечен сиреневым цветом). Умеренное повышение редокс-потенциала среды, сопровождаемое увеличением уровня мобильного цинка (отмечен розовым цветом), стимулирует дисульфидную димеризацию NCS-1 и индуцирует конститутивное ингибирование им протеинкиназы GRK. Этот процесс можно рассматривать как элемент редокс-регуляции, поскольку образование dNCS-1 обратимо за счет действия тиоредоксиновой системы. В условиях выраженного окислительного стресса и роста концентрации мобильного цинка происходит агрегация dNCS-1, что может вызывать апоптоз за счет перегрузки протеасомы и запуска ответа не-свернутых белков.

счет связывания внутриклеточных лигандов, в первую очередь ионов металлов (кальция, магния и цинка) и фосфолипидов мембраны, и чувствительны к изменениям внешних условий, таких как редокс-потенциал внутриклеточной среды. Многообразие факторов, оказывающих влияние на работу NCS-1, позволяет ему выступать в роли узлового компонента (“хаба”), на который завязано сразу несколько сигнальных путей и который может функционировать в условиях, когда другие механизмы регуляции недоступны. Заметим, что aberrantная экспрессия NCS-1, некоторые мутации, а также недавно обнаруженные внешние факторы, такие как избыток свободного цинка и повышение редокс-потенциала среды, могут выступать в роли триггеров, запускающих “аварийную” активность этого белка, которая в том числе обеспечивает переключение между сигналами на выживание и гибель нервных клеток. Выявление С-концевого сегмента — уникального среди белков НКС специфического элемента структуры NCS-1, регулирующего доступ к сайтам связывания его мишеней, — относится к важнейшим достижениям многолетних структурных исследований описанного здесь белка. Теперь селективное таргетирование С-концевой области можно рассматривать как перспективный подход к терапии нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с aberrantной активностью NCS-1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 21-15-00123).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pongs O., Krah-Jentgens I., Engelkamp D., Ferras A. (1991) Sequence and possible function of a novel Ca^{2+} -binding protein encoded in the *Shaker*-locus of *Drosophila*. In: *Novel Calcium-Binding Proteins: Fundamentals and Clinical Implications*. Ed. Heizmann C.W. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 497–503.
2. Persechini A., Moncrief N.D., Kretsinger R.H. (1989) The EF-hand family of calcium-modulated proteins. *Trends Neurosci.* **12**(11), 462–467.
3. Pongs O., Lindemeier J., Zhu X.R., Theil T., Engelkamp D., Krah-Jentgens I., Lambrecht H.G., Koch K.W., Schwemer J., Rivoecchi R., et al. (1993) Frequenin — a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron.* **11**(1), 15–28.
4. Kawamura S. (1994) Photoreceptor light-adaptation mediated by S-modulin, a member of a possible regulatory protein family of protein phosphorylation in signal transduction. *Neurosci. Res.* **20**(4), 293–298.
5. De Castro E., Nef S., Fiumelli H., Lenz S.E., Kawamura S., Nef P. (1995) Regulation of rhodopsin phosphorylation by a family of neuronal calcium sen-

- sors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**(1), 133–140.
6. Olafsson P., Soares H.D., Herzog K.H., Wang T., Morgan J.I., Lu B. (1997) The Ca^{2+} binding protein, frequenin is a nervous system-specific protein in mouse preferentially localized in neurites. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **44**(1), 73–82.
7. Chen C., Yu L., Zhang P., Jiang J., Zhang Y., Chen X., Wu Q., Zhao S. (2002) Human neuronal calcium sensor-1 shows the highest expression level in cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **319**(2), 67–70.
8. Blasiole B., Kabbani N., Boehmler W., Thisse B., Thisse C., Canfield V., Levenson R. (2005) Neuronal calcium sensor-1 gene *ncs-1a* is essential for semicircular canal formation in zebrafish inner ear. *J. Neurobiol.* **64**(3), 285–297.
9. Msghina M., Govind C.K., Atwood H.L. (1998) Synaptic structure and transmitter release in crustacean phasic and tonic motor neurons. *J. Neurosci.* **18**(4), 1374–1382.
10. Dyer J.R., Sossin W.S., Klein M. (1996) Cloning and characterization of aplycalcin and *Aplysia* neurocalcin, two new members of the calmodulin superfamily of small calcium-binding proteins. *J. Neurochem.* **67**(3), 932–942.
11. Nef S., Fiumelli H., de Castro E., Raes M.B., Nef P. (1995) Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **15**(1–4), 365–378.
12. Olafsson P., Wang T., Lu B. (1995) Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca^{2+} -binding protein frequenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**(17), 8001–8005.
13. Hendricks K.B., Wang B.Q., Schnieders E.A., Thorner J. (1999) Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nat. Cell Biol.* **1**(4), 234–241.
14. Hamasaki-Katagiri N., Molchanova T., Takeda K., Ames J.B. (2004) Fission yeast homolog of neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) regulates sporulation and confers calcium tolerance. *J. Biol. Chem.* **279**(13), 12744–12754.
15. Sanchez-Barrena M.J., Martinez-Ripoll M., Zhu J.K., Albert A. (2004) SOS3 (salt overly sensitive 3) from *Arabidopsis thaliana*: expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**(Pt. 7), 1272–1274.
16. Nagae M., Nozawa A., Koizumi N., Sano H., Hashimoto H., Sato M., Shimizu T. (2003) The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**(43), 42240–42246.
17. Strahl T., Grafelmann B., Dannenberg J., Thorner J., Pongs O. (2003) Conservation of regulatory function in calcium-binding proteins: human frequenin (neuronal calcium sensor-1) associates productively with yeast phosphatidylinositol 4-kinase isoform, Pik1. *J. Biol. Chem.* **278**(49), 49589–49599.
18. Bourne Y., Dannenberg J., Pollmann V., Marchot P., Pongs O. (2001) Immunocytochemical localization and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1). *J. Biol. Chem.* **276**(15), 11949–11955.
19. Magno L.A.V., Tenza-Ferrer H., Collodetti M., Nicolau E.S., Khlghatyan J., Del'Guidice T., Romano-Silva M.A., Beaulieu J.M. (2020) Contribution of neuronal calcium sensor 1 (Ncs-1) to anxiolytic-like and social behavior mediated by valproate and Gsk3 inhibition. *Sci. Rep.* **10**(1), 4566.
20. Grosshans H.K., Fischer T.T., Steinle J.A., Brill A.L., Ehrlich B.E. (2020) Neuronal calcium sensor 1 is up-regulated in response to stress to promote cell survival and motility in cancer cells. *Mol. Oncol.* **14**(6), 1134–1151.
21. Uchida A., Seki N., Mizuno K., Misono S., Yamada Y., Kikkawa N., Sanada H., Kumamoto T., Suetsugu T., Inoue H. (2019) Involvement of dual-strand of the miR-144 duplex and their targets in the pathogenesis of lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* **110**(1), 420–432.
22. Zhou H., Yang C., Bai F., Ma Z., Wang J., Wang F., Li F., Wang Q., Xiong L. (2017) Electroacupuncture alleviates brain damage through targeting of neuronal calcium sensor 1 by miR-191a-5p after ischemic stroke. *Rejuvenation Res.* **20**(6), 492–505.
23. Gerhard D.S., Wagner L., Feingold E.A., Shenmen C.M., Grouse L.H., Schuler G., Klein S.L., Old S., Rasooly R., Good P., Guyer M., Peck A.M., Derge J.G., Lipman D., Collins F.S., Jang W., Sherry S., Feolo M., Misquitta L., Lee E., Rotmistrovsky K., Greenhut S.F., Schaefer C.F., Buetow K., Bonner T.I., Haussler D., Kent J., Kiekhäus M., Furey T., Brent M., Prange C., Schreiber K., Shapiro N., Bhat N.K., Hopkins R.F., Hsie F., Driscoll T., Soares M.B., Casavant T.L., Scheetz T.E., Brownstein M.J., Usdin T.B., Toshiyuki S., Carninci P., Piao Y., Dudekula D.B., Ko M.S., Kawakami K., Suzuki Y., Sugano S., Gruber C.E., Smith M.R., Simmons B., Moore T., Waterman R., Johnson S.L., Ruan Y., Wei C.L., Mathavan S., Gunaratne P.H., Wu J., Garcia A.M., Hulyk S.W., Fuh E., Yuan Y., Sneed A., Kowis C., Hodgson A., Muzny D.M., McPherson J., Gibbs R.A., Fahey J., Helton E., Kettelman M., Madan A., Rodrigues S., Sanchez A., Whiting M., Madari A., Young A.C., Wetherby K.D., Granite S.J., Kwong P.N., Brinkley C.P., Pearson R.L., Bouffard G.G., Blakesly R.W., Green E.D., Dickson M.C., Rodriguez A.C., Grimwood J., Schmutz J., Myers R.M., Butterfield Y.S., Griffith M., Griffith O.L., Krzywinski M.I., Liao N., Morin R., Palmquist D., Petrescu A.S., Skalska U., Smailus D.E., Stott J.M., Schnerch A., Schein J.E., Jones S.J., Holt R.A., Baross A., Marra M.A., Clifton S., Makowski K.A., Bosak S., Malek J., Team M.G.C.P. (2004) The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Res.* **14**(10B), 2121–2127.
24. Wang B., Boeckel G.R., Huynh L., Nguyen L., Cao W., De La Cruz E.M., Kaftan E.J., Ehrlich B.E. (2016)

- Neuronal calcium sensor 1 has two variants with distinct calcium binding characteristics. *PLoS One*. **11**(8), e0161414.
25. Gierke P., Zhao C., Brackmann M., Linke B., Heine-mann U., Braune-well K.H. (2004) Expression analysis of members of the neuronal calcium sensor protein family: combining bioinformatics and western blot analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**(1), 38–43.
 26. Schaad N.C., De Castro E., Nef S., Hegi S., Hin-richsen R., Martone M.E., Ellisman M.H., Sikkink R., Rusnak F., Sygush J., Nef P. (1996) Direct modulation of calmodulin targets by the neuronal calcium sensor NCS-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**(17), 9253–9258.
 27. Pitt J.C., Lindemeier J., Habbes H.W., Veh R.W. (1998) Haptenylation of antibodies during affinity pu-rification: a novel and convenient procedure to obtain labeled antibodies for quantification and double label-ing. *Histochem. Cell Biol.* **110**(3), 311–322.
 28. Martone M.E., Edelmann V.M., Ellisman M.H., Nef P. (1999) Cellular and subcellular distribution of the cal-cium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell Tissue Res.* **295**(3), 395–407.
 29. Paterlini M., Revilla V., Grant A.L., Wisden W. (2000) Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. *Neuroscience*. **99**(2), 205–216.
 30. Sage C., Venteo S., Jeromin A., Roder J., Dechesne C.J. (2000) Distribution of frequenin in the mouse inner ear during development, comparison with other calci-um-binding proteins and synaptophysin. *Hear Res.* **150**(1–2), 70–82.
 31. Treloar H.B., Uboha U., Jeromin A., Greer C.A. (2005) Expression of the neuronal calcium sensor pro-tein NCS-1 in the developing mouse olfactory path-way. *J. Comp. Neurol.* **482**(2), 201–216.
 32. Kawasaki T., Nishio T., Kurosawa H., Roder J., Je-romin A. (2003) Spatiotemporal distribution of neuro-nal calcium sensor-1 in the developing rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **460**(4), 465–475.
 33. Garcia N., Lanuza M.A., Besalduch N., Santafe M.M., Jeromin A., Tomas J. (2005) Localization of neuronal calcium sensor-1 at the adult and developing rat neu-romuscular junction. *J. Neurosci. Res.* **82**(1), 1–9.
 34. Werle M.J., Roder J., Jeromin A. (2000) Expression of frequenin at the frog (*Rana*) neuromuscular junction, muscle spindle and nerve. *Neurosci. Lett.* **284**(1–2), 33–36.
 35. Lourenssen S., Jeromin A., Roder J., Blennerhas-sett M.G. (2002) Intestinal inflammation modulates expression of the synaptic vesicle protein neuronal cal-cium sensor-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **282**(6), G1097–G1104.
 36. Averill S., Robson L.G., Jeromin A., Priestley J.V. (2004) Neuronal calcium sensor-1 is expressed by dor-sal root ganglion cells, is axonally transported to cen-tral and peripheral terminals, and is concentrated at nodes. *Neuroscience*. **123**(2), 419–427.
 37. Taverna E., Francolini M., Jeromin A., Hilfiker S., Roder J., Rosa P. (2002) Neuronal calcium sensor 1 and phosphatidylinositol 4-OH kinase beta interact in neuronal cells and are translocated to membranes during nucleotide-evoked exocytosis. *J. Cell Sci.* **115**(Pt. 20), 3909–3922.
 38. Nakao S., Wakabayashi S., Nakamura T.Y. (2015) Stimulus-dependent regulation of nuclear Ca^{2+} sig-naling in cardiomyocytes: a role of neuronal calcium sensor-1. *PLoS One*. **10**(4), e0125050.
 39. Nakamura T.Y., Jeromin A., Mikoshiba K., Wakaba-yashi S. (2011) Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhanc-ing Ca^{2+} signals. *Circ. Res.* **109**(5), 512–523.
 40. Ratai O., Hermainski J., Ravichandran K., Pongs O. (2019) NCS-1 deficiency is associated with obesity and diabetes type 2 in mice. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 78.
 41. Ng E., Varaschin R.K., Su P., Browne C.J., Her-mainski J., Le Foll B., Pongs O., Liu F., Trudeau L.E., Roder J.C., Wong A.H. (2016) Neuronal calcium sen-sor-1 deletion in the mouse decreases motivation and dopamine release in the nucleus accumbens. *Behav. Brain Res.* **301**, 213–225.
 42. Mun H.S., Saab B.J., Ng E., McGirr A., Lipina T.V., Gondo Y., Georgiou J., Roder J.C. (2015) Self-direct-ed exploration provides a Ncs1-dependent learning bonus. *Sci. Rep.* **5**, 17697.
 43. de Rezende V.B., Rosa D.V., Comim C.M., Magno L.A., Rodrigues A.L., Vidigal P., Jeromin A., Queve-do J., Romano-Silva M.A. (2014) NCS-1 deficiency causes anxiety and depressive-like behavior with im-paired non-aversive memory in mice. *Physiol. Behav.* **130**, 91–98.
 44. Citri A., Malenka R.C. (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuro-psychopharmacology*. **33**(1), 18–41.
 45. Jinno S., Jeromin A., Roder J., Kosaka T. (2002) Im-munocytochemical localization of neuronal calcium sensor-1 in the hippocampus and cerebellum of the mouse, with special reference to presynaptic termi-nals. *Neuroscience*. **113**(2), 449–461.
 46. Goncalves J.T., Schafer S.T., Gage F.H. (2016) Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell*. **167**(4), 897–914.
 47. Genin A., Davis S., Meziane H., Doyere V., Jeromin A., Roder J., Mallet J., Laroche S. (2001) Regulated expres-sion of the neuronal calcium sensor-1 gene during long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo*. *Neurosci-ence*. **106**(3), 571–577.
 48. Saab B.J., Georgiou J., Nath A., Lee F.J., Wang M., Michalon A., Liu F., Mansuy I.M., Roder J.C. (2009) NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory. *Neuron*. **63**(5), 643–656.
 49. Kesner R.P., Lee I., Gilbert P. (2004) A behavioral as-sessment of hippocampal function based on a subre-gional analysis. *Rev. Neurosci.* **15**(5), 333–351.
 50. Sippy T., Cruz-Martin A., Jeromin A., Schweizer F.E. (2003) Acute changes in short-term plasticity at syn-apses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat. Neurosci.* **6**(10), 1031–1038.

51. Zucker R.S. (2003) NCS-1 stirs somnolent synapses. *Nat. Neurosci.* **6**(10), 1006–1008.
52. Jo J., Heon S., Kim M.J., Son G.H., Park Y., Henley J.M., Weiss J.L., Sheng M., Collingridge G.L., Cho K. (2008) Metabotropic glutamate receptor-mediated LTD involves two interacting Ca^{2+} sensors, NCS-1 and PICK1. *Neuron*. **60**(6), 1095–1111.
53. Brackmann M., Zhao C., Kuhl D., Manahan-Vaughan D., Braunewell K.H. (2004) MGluRs regulate the expression of neuronal calcium sensor proteins NCS-1 and VILIP-1 and the immediate early gene *arg3.1/arc* in the hippocampus *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**(3), 1073–1079.
54. Hanley J.G., Henley J.M. (2005) PICK1 is a calcium-sensor for NMDA-induced AMPA receptor trafficking. *EMBO J.* **24**(18), 3266–3278.
55. Hansel C., Linden D.J., D'Angelo E. (2001) Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum. *Nat. Neurosci.* **4**(5), 467–475.
56. Jinno S., Jeromin A., Roder J., Kosaka T. (2003) Compartmentation of the mouse cerebellar cortex by neuronal calcium sensor-1. *J. Comp. Neurol.* **458**(4), 412–424.
57. Drumond L.E., Mourao F.A., Leite H.R., Abreu R.V., Reis H.J., Moraes M.F., Pereira G.S., Massensini A.R. (2012) Differential effects of swimming training on neuronal calcium sensor-1 expression in rat hippocampus/cortex and in object recognition memory tasks. *Brain Res. Bull.* **88**(4), 385–391.
58. Nakamura T.Y., Nakao S., Nakajo Y., Takahashi J.C., Wakabayashi S., Yanamoto H. (2017) Possible signaling pathways mediating neuronal calcium sensor-1-dependent spatial learning and memory in mice. *PLoS One*. **12**(1), e0170829.
59. Nakamura T.Y., Sturm E., Pountney D.J., Orenzoff B., Artman M., Coetzee W.A. (2003) Developmental expression of NCS-1 (frequenin), a regulator of Kv4 K^+ channels, in mouse heart. *Pediatr. Res.* **53**(4), 554–557.
60. Bergmann M., Grabs D., Roder J., Rager G., Jeromin A. (2002) Differential expression of neuronal calcium sensor-1 in the developing chick retina. *J. Comp. Neurol.* **449**(3), 231–240.
61. Reynolds A.J., Bartlett S.E., Morgans C. (2001). The distribution of neuronal calcium sensor-1 protein in the developing and adult rat retina. *Neuroreport*. **12**(4), 725–728.
62. Chen X.L., Zhong Z.G., Yokoyama S., Bark C., Meister B., Berggren P.O., Roder J., Higashida H., Jeromin A. (2001) Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission. *J. Physiol.* **532**(Pt. 3), 649–659.
63. Hui H., McHugh D., Hannan M., Zeng F., Xu S.Z., Khan S.U., Levenson R., Beech D.J., Weiss J.L. (2006) Calcium-sensing mechanism in TRPC5 channels contributing to retardation of neurite outgrowth. *J. Physiol.* **572**(Pt. 1), 165–172.
64. Scalettar B.A., Rosa P., Taverna E., Francolini M., Tsuboi T., Terakawa S., Koizumi S., Roder J., Jeromin A. (2002). Neuronal calcium sensor-1 binds to regulated secretory organelles and functions in basal and stimulated exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Sci.* **115**(Pt. 11), 2399–2412.
65. Pan C.Y., Jeromin A., Lundstrom K., Yoo S.H., Roder J., Fox A.P. (2002) Alterations in exocytosis induced by neuronal Ca^{2+} sensor-1 in bovine chromaffin cells. *J. Neurosci.* **22**(7), 2427–2433.
66. McFerran B.W., Graham M.E., Burgoyne R.D. (1998) Neuronal Ca^{2+} sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. *J. Biol. Chem.* **273**(35), 22768–22772.
67. Guild S.B., Murray A.T., Wilson M.L., Wiegand U.K., Apps D.K., Jin Y., Rindler M., Roder J., Jeromin A. (2001). Over-expression of NCS-1 in AtT-20 cells affects ACTH secretion and storage. *Mol. Cell Endocrinol.* **184**(1–2), 51–63.
68. McFerran B.W., Weiss J.L., Burgoyne R.D. (1999) Neuronal Ca^{2+} sensor 1. Characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca^{2+} -independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca^{2+} signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**(42), 30258–30265.
69. Gromada J., Bark C., Smidt K., Efanov A.M., Janson J., Mandic S.A., Webb D.L., Zhang W., Meister B., Jeromin A., Berggren P.O. (2005) Neuronal calcium sensor-1 potentiates glucose-dependent exocytosis in pancreatic β cells through activation of phosphatidylinositol 4-kinase β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**(29), 10303–10308.
70. Kapp-Barnea Y., Melnikov S., Shefler I., Jeromin A., Sagi-Eisenberg R. (2003) Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase β regulate IgE receptor-triggered exocytosis in cultured mast cells. *J. Immunol.* **171**(10), 5320–5327.
71. Mora S., Durham P.L., Smith J.R., Russo A.F., Jeromin A., Pessin J.E. (2002) NCS-1 inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes through a phosphatidylinositol 4-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **277**(30), 27494–27500.
72. Zhao X., Varnai P., Tuymetova G., Balla A., Toth Z.E., Oker-Blom C., Roder J., Jeromin A., Balla T. (2001) Interaction of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) with phosphatidylinositol 4-kinase β stimulates lipid kinase activity and affects membrane trafficking in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* **276**(43), 40183–40189.
73. Weisz O.A., Gibson G.A., Leung S.M., Roder J., Jeromin A. (2000) Overexpression of frequenin, a modulator of phosphatidylinositol 4-kinase, inhibits biosynthetic delivery of an apical protein in polarized madin-darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **275**(32), 24341–24347.
74. de Barry J., Janoshazi A., Dupont J.L., Procksch O., Chasserot-Golaz S., Jeromin A., Vitale N. (2006) Functional implication of neuronal calcium sensor-1

- and phosphoinositol 4-kinase- β interaction in regulated exocytosis of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **281**(26), 18098–18111.
75. Rajebhosale M., Greenwood S., Vidugiriene J., Jeromin A., Hilfiker S. (2003) Phosphatidylinositol 4-OH kinase is a downstream target of neuronal calcium sensor-1 in enhancing exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* **278**(8), 6075–6084.
 76. Koizumi S., Rosa P., Willars G.B., Challiss R.A., Taverna E., Francolini M., Bootman M.D., Lipp P., Inoue K., Roder J., Jeromin A. (2002) Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **277**(33), 30315–30324.
 77. Bartlett S.E., Reynolds A.J., Weible M., Jeromin A., Roder J., Hendry I.A. (2000) PtdIns 4-kinase β and neuronal calcium sensor-1 co-localize but may not directly associate in mammalian neurons. *J. Neurosci. Res.* **62**(2), 216–224.
 78. Zheng Q., Bobich J.A., Vidugiriene J., McFadden S.C., Thomas F., Roder J., Jeromin A. (2005) Neuronal calcium sensor-1 facilitates neuronal exocytosis through phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Neurochem.* **92**(3), 442–451.
 79. Uzureau S., Lecordier L., Uzureau P., Hennig D., Graversen J.H., Homble F., Mfutu P.E., Oliveira Arcolino F., Ramos A.R., La Rovere R.M., Luyten T., Vermeersch M., Tebabi P., Dieu M., Cuypers B., Deborggraeve S., Rabant M., Legendre C., Moestrup S.K., Levtchenko E., Bultynck G., Erneux C., Perez-Morga D., Pays E. (2020) APOL1 C-terminal variants may trigger kidney disease through interference with APOL3 control of actomyosin. *Cell Rep.* **30**(11), 3821–3836.e13.
 80. Mikhaylova M., Reddy P.P., Munsch T., Landgraf P., Suman S.K., Smalla K.H., Gundelfinger E.D., Sharma Y., Kreutz M.R. (2009) Calneurons provide a calcium threshold for trans-Golgi network to plasma membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**(22), 9093–9098.
 81. Petko J.A., Kabbani N., Frey C., Woll M., Hickey K., Craig M., Canfield V.A., Levenson R. (2009) Proteomic and functional analysis of NCS-1 binding proteins reveals novel signaling pathways required for inner ear development in zebrafish. *BMC Neurosci.* **10**, 27.
 82. Haynes L.P., Sherwood M.W., Dolman N.J., Burgoyne R.D. (2007) Specificity, promiscuity and localization of ARF protein interactions with NCS-1 and phosphatidylinositol-4 kinase-III β . *Traffic.* **8**(8), 1080–1092.
 83. Haynes L.P., Fitzgerald D.J., Wareing B., O'Callaghan D.W., Morgan A., Burgoyne R.D. (2006) Analysis of the interacting partners of the neuronal calcium-binding proteins L-CaBP1, hippocalcin, NCS-1 and neurocalcin δ . *Proteomics.* **6**(6), 1822–1832.
 84. Haynes L.P., Thomas G.M., Burgoyne R.D. (2005) Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADP-ribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase β and trans-Golgi network-plasma membrane traffic. *J. Biol. Chem.* **280**(7), 6047–6054.
 85. Kabbani N., Negyessy L., Lin R., Goldman-Rakic P., Levenson R. (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J. Neurosci.* **22**(19), 8476–8486.
 86. Bergson C., Levenson R., Goldman-Rakic P.S., Lidow M.S. (2003) Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca²⁺ connection in dopamine signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**(9), 486–492.
 87. Evron T., Daigle T.L., Caron M.G. (2012) GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**(3), 154–164.
 88. Ferre S., Casado V., Devi L.A., Filizola M., Jockers R., Lohse M.J., Milligan G., Pin J.P., Guitart X. (2014) G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* **66**(2), 413–434.
 89. Navarro G., Aguinaga D., Moreno E., Hradsky J., Reddy P.P., Cortes A., Mallol J., Casado V., Mikhaylova M., Kreutz M.R., Lluís C., Canela E.I., McCormick P.J., Ferre S. (2014) Intracellular calcium levels determine differential modulation of allosteric interactions within G protein-coupled receptor heteromers. *Chem. Biol.* **21**(11), 1546–1556.
 90. Negyessy L., Goldman-Rakic P.S. (2005) Subcellular localization of the dopamine D2 receptor and coexistence with the calcium-binding protein neuronal calcium sensor-1 in the primate prefrontal cortex. *J. Comp. Neurol.* **488**(4), 464–475.
 91. Guimaraes M.M., Reis H.J., Guimaraes L.P., Carneiro D.S., Ribeiro F.M., Gomez M.V., Jeromin A., Romano-Silva M.A. (2009) Modulation of muscarinic signaling in PC12 cells overexpressing neuronal Ca²⁺ sensor-1 protein. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **55**(Suppl.), OL1138–50.
 92. Angelats E., Requesens M., Aguinaga D., Kreutz M.R., Franco R., Navarro G. (2018) Neuronal calcium and cAMP cross-talk mediated by cannabinoid CB1 receptor and EF-hand calcium sensor interactions. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 67.
 93. Navarro G., Hradsky J., Lluís C., Casado V., McCormick P.J., Kreutz M.R., Mikhaylova M. (2012) NCS-1 associates with adenosine A(2A) receptors and modulates receptor function. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, 53.
 94. Gurevich E.V., Tesmer J.J., Mushegian A., Gurevich V.V. (2012) G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol. Ther.* **133**(1), 40–69.
 95. Pitcher J.A., Fredericks Z.L., Stone W.C., Premont R.T., Stoffel R.H., Koch W.J., Lefkowitz R.J. (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J. Biol. Chem.* **271**(40), 24907–24913.
 96. Serodio P., Rudy B. (1998) Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold

- transient K^+ (A-type) currents in rat brain. *J. Neurophysiol.* **79**(2), 1081–1091.
97. Nakamura T.Y., Pountney D.J., Ozaita A., Nandi S., Ueda S., Rudy B., Coetzee W.A. (2001) A role for frequenin, a Ca^{2+} -binding protein, as a regulator of Kv4 K^+ -currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**(22), 12808–12813.
 98. Guo W., Malin S.A., Johns D.C., Jeromin A., Nerbonne J.M. (2002) Modulation of Kv4-encoded K^+ currents in the mammalian myocardium by neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* **277**(29), 26436–26443.
 99. Zaika O., Tolstykh G.P., Jaffe D.B., Shapiro M.S. (2007) Inositol triphosphate-mediated Ca^{2+} signals direct purinergic P2Y receptor regulation of neuronal ion channels. *J. Neurosci.* **27**(33), 8914–8926.
 100. Winks J.S., Hughes S., Filippov A.K., Tatulian L., Abogadie F.C., Brown D.A., Marsh S.J. (2005) Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J. Neurosci.* **25**(13), 3400–3413.
 101. Xiao L., Koopmann T.T., Ordog B., Postema P.G., Verkerk A.O., Iyer V., Sampson K.J., Boink G.J., Mamarbachi M.A., Varro A., Jordaens L., Res J., Kass R.S., Wilde A.A., Bezzina C.R., Nattel S. (2013) Unique cardiac Purkinje fiber transient outward current β -subunit composition: a potential molecular link to idiopathic ventricular fibrillation. *Circ. Res.* **112**(10), 1310–1322.
 102. Weiss J.L., Archer D.A., Burgoyne R.D. (2000) Neuronal Ca^{2+} sensor-1/frequenin functions in an autocrine pathway regulating Ca^{2+} channels in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **275**(51), 40082–40087.
 103. Weiss J.L., Burgoyne R.D. (2001) Voltage-independent inhibition of P/Q-type Ca^{2+} channels in adrenal chromaffin cells via a neuronal Ca^{2+} sensor-1-dependent pathway involves Src family tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **276**(48), 44804–44811.
 104. Rousset M., Cens T., Gavarini S., Jeromin A., Charner P. (2003) Down-regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels by neuronal calcium sensor-1 is β subunit-specific. *J. Biol. Chem.* **278**(9), 7019–7026.
 105. Scott V.E., De Waard M., Liu H., Gurnett C.A., Venzke D.P., Lennon V.A., Campbell K.P. (1996) β subunit heterogeneity in N-type Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* **271**(6), 3207–3212.
 106. Tsujimoto T., Jeromin A., Saitoh N., Roder J.C., Takahashi T. (2002) Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science.* **295**(5563), 2276–2279.
 107. Wang C.Y., Yang F., He X., Chow A., Du J., Russell J.T., Lu B. (2001) Ca^{2+} -binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca^{2+} channels and transmitter release. *Neuron.* **32**(1), 99–112.
 108. Yan J., Leal K., Magupalli V.G., Nanou E., Martinez G.Q., Scheuer T., Catterall W.A. (2014) Modulation of Cav2.1 channels by neuronal calcium sensor-1 induces short-term synaptic facilitation. *Mol. Cell Neurosci.* **63**, 124–131.
 109. Lian L.Y., Pandalaneni S.R., Todd P.A., Martin V.M., Burgoyne R.D., Haynes L.P. (2014) Demonstration of binding of neuronal calcium sensor-1 to the Cav2.1 P/Q-type calcium channel. *Biochemistry.* **53**(38), 6052–6062.
 110. Schlecker C., Boehmerle W., Jeromin A., DeGray B., Varshney A., Sharma Y., Szigeti-Buck K., Ehrlich B.E. (2006) Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *J. Clin. Invest.* **116**(6), 1668–1674.
 111. Iketani M., Imaizumi C., Nakamura F., Jeromin A., Mikoshiba K., Goshima Y., Takei K. (2009) Regulation of neurite outgrowth mediated by neuronal calcium sensor-1 and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in nerve growth cones. *Neuroscience.* **161**(3), 743–752.
 112. De Raad S., Comte M., Nef P., Lenz S.E., Gundelfinger E.D., Cox J.A. (1995) Distribution pattern of three neural calcium-binding proteins (NCS-1, VILIP and recoverin) in chicken, bovine and rat retina. *Histochem. J.* **27**(7), 524–535.
 113. Vladimirov V.I., Zernii E.Y., Baksheeva V.E., Wimmerberg H., Kazakov A.S., Tikhomirova N.K., Nemashkalova E.L., Mitkevich V.A., Zamyatnin A.A., Jr., Lipkin V.M., Philippov P.P., Permyakov S.E., Senin I.I., Koch K.W., Zinchenko D.V. (2018) Photoreceptor calcium sensor proteins in detergent-resistant membrane rafts are regulated via binding to caveolin-1. *Cell Calcium.* **73**, 55–69.
 114. Baksheeva V.E., Nazipova A.A., Zinchenko D.V., Serebryakova M.V., Senin I.I., Permyakov S.E., Philippov P.P., Li Y., Zamyatnin A.A., Zernii E.Y., Aliev G. (2015) Ca^{2+} -myristoyl switch in neuronal calcium sensor-1: a role of C-terminal segment. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* **14**(4), 437–451.
 115. Koch K.W., Dell’Orco D. (2015) Protein and signaling networks in vertebrate photoreceptor cells. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 67.
 116. Pandalaneni S., Karuppiiah V., Saleem M., Haynes L.P., Burgoyne R.D., Mayans O., Derrick J.P., Lian L.Y. (2015) Neuronal calcium sensor-1 binds the D2 dopamine receptor and G-protein-coupled receptor kinase 1 (GRK1) peptides using different modes of interactions. *J. Biol. Chem.* **290**(30), 18744–18756.
 117. Fik-Rymarkiewicz E., Duda T., Sharma R.K. (2006) Novel frequenin-modulated Ca^{2+} -signaling membrane guanylate cyclase (ROS-GC) transduction pathway in bovine hippocampus. *Mol. Cell Biochem.* **291**(1–2), 187–204.
 118. Butler M.R., Ma H., Yang F., Belcher J., Le Y.Z., Mikoshiba K., Biel M., Michalakakis S., Iuso A., Krizaj D., Ding X.Q. (2017) Endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} -channel activity contributes to ER stress and cone death in cyclic nucleotide-gated channel deficiency. *J. Biol. Chem.* **292**(27), 11189–11205.

119. de Almeida Gomes C.P., Ventura A.L. (2004) Localization of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) in the avian retina. *Brain Res. Bull.* **63**(6), 499–507.
120. Ma H., Butler M.R., Thapa A., Belcher J., Yang F., Baehr W., Biel M., Michalakakis S., Ding X.Q. (2015) cGMP/Protein kinase G signaling suppresses inositol 1,4,5-trisphosphate receptor phosphorylation and promotes endoplasmic reticulum stress in photoreceptors of cyclic nucleotide-gated channel-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **290**(34), 20880–20892.
121. Van Hook M.J., Nawy S., Thoreson W.B. (2019) Voltage- and calcium-gated ion channels of neurons in the vertebrate retina. *Prog. Retin Eye Res.* **72**, 100760.
122. Stella S.L., Jr., Bryson E.J., Thoreson W.B. (2002) A2 adenosine receptors inhibit calcium influx through L-type calcium channels in rod photoreceptors of the salamander retina. *J. Neurophysiol.* **87**(1), 351–360.
123. Nakamura T.Y., Jeromin A., Smith G., Kurushima H., Koga H., Nakabeppu Y., Wakabayashi S., Nabekura J. (2006) Novel role of neuronal Ca^{2+} sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J. Cell Biol.* **172**(7), 1081–1091.
124. Soler R.M., Dolcet X., Encinas M., Egea J., Bayascas J.R., Comella J.X. (1999) Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J. Neurosci.* **19**(21), 9160–9169.
125. Yip P.K., Wong L.F., Sears T.A., Yanez-Munoz R.J., McMahon S.B. (2010) Cortical overexpression of neuronal calcium sensor-1 induces functional plasticity in spinal cord following unilateral pyramidal tract injury in rat. *PLoS Biol.* **8**(6), e1000399.
126. Angebault C., Fauconnier J., Patergnani S., Rieusset J., Danese A., Affortit C.A., Jagodzinska J., Megy C., Quiles M., Cazevielle C., Korchagina J., Bonnet-Wersinger D., Milea D., Hamel C., Pinton P., Thiry M., Lacampagne A., Delprat B., Delettre C. (2018) ER-mitochondria cross-talk is regulated by the Ca^{2+} sensor NCS1 and is impaired in Wolfram syndrome. *Sci. Signal.* **11**(553), eaaq1380.
127. Nguyen L.D., Fischer T.T., Abreu D., Arroyo A., Urano F., Ehrlich B.E. (2020) Calpain inhibitor and ibudilast rescue β cell functions in a cellular model of Wolfram syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**(29), 17389–17398.
128. Wilkinson B.L., Jeromin A., Roder J., Hyson R.L. (2003) Activity-dependent regulation of the subcellular localization of neuronal calcium sensor-1 in the avian cochlear nucleus. *Neuroscience.* **117**(4), 957–964.
129. Warchol M.E., Dallos P. (1990) Neural coding in the chick cochlear nucleus. *J. Comp. Physiol. A.* **166**(5), 721–734.
130. Benkert J., Hess S., Roy S., Beccano-Kelly D., Wiederspohn N., Duda J., Simons C., Patil K., Gaifullina A., Mannal N., Dragicevic E., Spaich D., Muller S., Nemeth J., Hollmann H., Deuter N., Mousba Y., Kubisch C., Poetschke C., Striessnig J., Pongs O., Schneider T., Wade-Martins R., Patel S., Parlato R., Frank T., Kloppenburg P., Liss B. (2019) Cav2.3 channels contribute to dopaminergic neuron loss in a model of Parkinson's disease. *Nat. Commun.* **10**(1), 5094.
131. Wang D., O'Halloran D., Goodman M.B. (2013) GCY-8, PDE-2, and NCS-1 are critical elements of the cGMP-dependent thermotransduction cascade in the AFD neurons responsible for *C. elegans* thermotaxis. *J. Gen. Physiol.* **142**(4), 437–449.
132. Murakami H., Bessinger K., Hellmann J., Murakami S. (2005) Aging-dependent and -independent modulation of associative learning behavior by insulin/insulin-like growth factor-1 signal in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **25**(47), 10894–10904.
133. Nakamura T.Y., Nakao S., Wakabayashi S. (2016) Neuronal Ca^{2+} sensor-1 contributes to stress tolerance in cardiomyocytes via activation of mitochondrial detoxification pathways. *J. Mol. Cell Cardiol.* **99**, 23–34.
134. Terao R., Honjo M., Ueta T., Obinata H., Izumi T., Kuran M., Yatomi Y., Koso H., Watanabe S., Aihara M. (2019) Light stress-induced increase of sphingosine 1-phosphate in photoreceptors and its relevance to retinal degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(15), 3670.
135. McDougald D.S., Papp T.E., Zezulin A.U., Zhou S., Bennett J. (2019) *AKT3* gene transfer promotes anabolic reprogramming and photoreceptor neuroprotection in a pre-clinical model of retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.* **27**(7), 1313–1326.
136. Braunewell K.H. (2005) The darker side of Ca^{2+} signaling by neuronal Ca^{2+} -sensor proteins: from Alzheimer's disease to cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**(7), 345–351.
137. Bandura J., Feng Z.P. (2019) Current understanding of the role of neuronal calcium sensor 1 in neurological disorders. *Mol. Neurobiol.* **56**(9), 6080–6094.
138. Boeckel G.R., Ehrlich B.E. (2018) NCS-1 is a regulator of calcium signaling in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1865**(11 Pt B), 1660–1667.
139. Koh P.O., Undie A.S., Kabbani N., Levenson R., Goldman-Rakic P.S., Lidow M.S. (2003) Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**(1), 313–317.
140. Bai J., He F., Novikova S.I., Undie A.S., Dracheva S., Haroutunian V., Lidow M.S. (2004) Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biol. Psychiatry.* **56**(6), 427–440.
141. Souza B.R., Torres K.C., Miranda D.M., Motta B.S., Caetano F.S., Rosa D.V., Souza R.P., Giovani A., Jr., Carneiro D.S., Guimaraes M.M., Martins-Silva C., Reis H.J., Gomez M.V., Jeromin A., Romano-Silva M.A. (2011) Downregulation of the cAMP/PKA pathway in PC12 cells overexpressing NCS-1. *Cell Mol. Neurobiol.* **31**(1), 135–143.
142. Souza B.R., Souza R.P., Rosa D.V., Guimaraes M.M., Correa H., Romano-Silva M.A. (2006) Dopaminergic

- intracellular signal integrating proteins: relevance to schizophrenia. *Dialogues Clin. Neurosci.* **8**(1), 95–100.
143. Harvey A.G., Talbot L.S., Gershon A. (2009) Sleep disturbance in bipolar disorder across the lifespan. *Clin. Psychol.* (New York). **16**(2), 256–277.
 144. D'Onofrio S., Kezunovic N., Hyde J.R., Luster B., Messias E., Urbano F.J., Garcia-Rill E. (2015) Modulation of gamma oscillations in the pedunculopontine nucleus by neuronal calcium sensor protein-1: relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *J. Neurophysiol.* **113**(3), 709–719.
 145. Garcia-Rill E., D'Onofrio S., Mahaffey S.C., Bisagno V., Urbano F.J. (2019) Bottom-up gamma and bipolar disorder, clinical and neuroepigenetic implications. *Bipolar. Disord.* **21**(2), 108–116.
 146. Jiang X., Lautermilch N.J., Watari H., Westenbroek R.E., Scheuer T., Catterall W.A. (2008) Modulation of CaV2.1 channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**(1), 341–346.
 147. D'Onofrio S., Hyde J., Garcia-Rill E. (2017) Interaction between neuronal calcium sensor protein 1 and lithium in pedunculopontine neurons. *Physiol. Rep.* **5**(7), e13246.
 148. D'Onofrio S., Urbano F.J., Messias E., Garcia-Rill E. (2016) Lithium decreases the effects of neuronal calcium sensor protein 1 in pedunculopontine neurons. *Physiol. Rep.* **4**(6), e12740.
 149. Souza B.R., Torres K.C., Miranda D.M., Motta B.S., Scotti-Muzzi E., Guimaraes M.M., Carneiro D.S., Rosa D.V., Souza R.P., Reis H.J., Jeromin A., Romano-Silva M.A. (2010) Lack of effects of typical and atypical antipsychotics in DARPP-32 and NCS-1 levels in PC12 cells overexpressing NCS-1. *J. Negat. Results Biomed.* **9**, 4.
 150. Souza B.R., Motta B.S., Rosa D.V., Torres K.C., Castro A.A., Comim C.M., Sampaio A.M., Lima F.F., Jeromin A., Quevedo J., Romano-Silva M.A. (2008) DARPP-32 and NCS-1 expression is not altered in brains of rats treated with typical or atypical antipsychotics. *Neurochem. Res.* **33**(3), 533–538.
 151. Kabbani N., Levenson R. (2006) Antipsychotic-induced alterations in D2 dopamine receptor interacting proteins within the cortex. *Neuroreport.* **17**(3), 299–301.
 152. Muralidhar D., Kunjachen Jobby M., Jeromin A., Roder J., Thomas F., Sharma Y. (2004) Calcium and chlorpromazine binding to the EF-hand peptides of neuronal calcium sensor-1. *Peptides.* **25**(6), 909–917.
 153. Kabbani N., Woll M.P., Nordman J.C., Levenson R. (2012) Dopamine receptor interacting proteins: targeting neuronal calcium sensor-1/D2 dopamine receptor interaction for antipsychotic drug development. *Curr. Drug Targets.* **13**(1), 72–79.
 154. Nestler E.J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**(2), 119–128.
 155. Chen X., Marrero H.G., Murphy R., Lin Y.J., Freedman J.E. (2000) Altered gating of opiate receptor-modulated K⁺ channels on amygdala neurons of morphine-dependent rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**(26), 14692–14696.
 156. Stefanski R., Ladenheim B., Lee S.H., Cadet J.L., Goldberg S.R. (1999) Neuroadaptations in the dopaminergic system after active self-administration but not after passive administration of methamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.* **371**(2–3), 123–135.
 157. Jenney C.B., Petko J., Ebersole B., Njatcha C.V., Uzamere T.O., Alexander D.N., Grigson P.S., Levenson R. (2016) Early avoidance of a heroin-paired taste-cue and subsequent addiction-like behavior in rats. *Brain Res. Bull.* **123**, 61–70.
 158. Rodriguez Parkitna J.M., Bilecki W., Mierzejewski P., Stefanski R., Ligeza A., Bargiela A., Ziolkowska B., Kostowski W., Przewlocki R. (2004) Effects of morphine on gene expression in the rat amygdala. *J. Neurochem.* **91**(1), 38–48.
 159. Dahl J.P., Jepson C., Levenson R., Wileyto E.P., Patterson F., Berrettini W.H., Lerman C. (2006) Interaction between variation in the D2 dopamine receptor (DRD2) and the neuronal calcium sensor-1 (FREQ) genes in predicting response to nicotine replacement therapy for tobacco dependence. *Pharmacogenomics J.* **6**(3), 194–199.
 160. Multani P.K., Clarke T.K., Narasimhan S., Ambrose-Lanci L., Kampman K.M., Pettinati H.M., Oslin D.W., O'Brien C.P., Berrettini W.H., Lohoff F.W. (2012) Neuronal calcium sensor-1 and cocaine addiction: a genetic association study in African-Americans and European Americans. *Neurosci. Lett.* **531**(1), 46–51.
 161. Bahi N., Friocourt G., Carrie A., Graham M.E., Weiss J.L., Chafey P., Fauchereau F., Burgoyne R.D., Chelly J. (2003) IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis. *Hum. Mol. Genet.* **12**(12), 1415–1425.
 162. Pavlowsky A., Gianfelice A., Pallotto M., Zanchi A., Vara H., Khelfaoui M., Valnegri P., Rezai X., Bassani S., Brambilla D., Kumpost J., Blahos J., Roux M.J., Humeau Y., Chelly J., Passafaro M., Giustetto M., Billuart P., Sala C. (2010) A postsynaptic signaling pathway that may account for the cognitive defect due to IL1RAPL1 mutation. *Curr. Biol.* **20**(2), 103–115.
 163. Carrie A., Jun L., Bienvenu T., Vinet M.C., McDonnell N., Couvert P., Zemni R., Cardona A., Van Buggenhout G., Frants S., Hamel B., Moraine C., Ropers H.H., Strom T., Howell G.R., Whittaker A., Ross M.T., Kahn A., Fryns J.P., Beldjord C., Marynen P., Chelly J. (1999) A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* **23**(1), 25–31.
 164. Gambino F., Pavlowsky A., Begle A., Dupont J. L., Bahi N., Courjaret R., Gardette R., Hadjkacem H., Skala H., Poulain B., Chelly J., Vitale N., Humeau Y. (2007) IL1-receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1), a protein involved in cognitive functions, regulates N-type Ca²⁺-channel and neurite

- elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**(21), 9063–9068.
165. Ng E., Georgiou J., Avila A., Trought K., Mun H.S., Hodgson M., Servinis P., Roder J.C., Collingridge G.L., Wong A.H.C. (2020) Mice lacking neuronal calcium sensor-1 show social and cognitive deficits. *Behav. Brain Res.* **381**, 112420.
 166. Piton A., Michaud J.L., Peng H., Aradhy S., Gauthier J., Motttron L., Champagne N., Lafreniere R.G., Hamdan F.F.; S2D team; Joobor R., Fombonne E., Marineau C., Cossette P., Dube M.P., Haghighi P., Drapeau P., Barker P.A., Carbonetto S., Rouleau G.A. (2008) Mutations in the calcium-related gene *ILIRAPL1* are associated with autism. *Hum. Mol. Genet.* **17**(24), 3965–3974.
 167. Handley M.T., Lian L.Y., Haynes L.P., Burgoyne R.D. (2010) Structural and functional deficits in a neuronal calcium sensor-1 mutant identified in a case of autistic spectrum disorder. *PLoS One*. **5**(5), e10534.
 168. Krey J.F., Dolmetsch R.E. (2007) Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca^{2+} signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**(1), 112–119.
 169. Surmeier D.J., Guzman J.N., Sanchez-Padilla J., Schumacker P.T. (2011) The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience*. **198**, 221–231.
 170. Dragicevic E., Poetschke C., Duda J., Schlaudraff F., Lammel S., Schiemann J., Fauler M., Hetzel A., Watanabe M., Lujan R., Malenka R.C., Striessnig J., Liss B. (2014) Cav1.3 channels control D2-autoreceptor responses via NCS-1 in *Substantia nigra* dopamine neurons. *Brain*. **137**(Pt. 8), 2287–2302.
 171. Poetschke C., Dragicevic E., Duda J., Benkert J., Dougalis A., DeZio R., Snutch T.P., Striessnig J., Liss B. (2015) Compensatory T-type Ca^{2+} channel activity alters D2-autoreceptor responses of *Substantia nigra* dopamine neurons from Cav1.3 L-type Ca^{2+} channel KO mice. *Sci. Rep.* **5**, 13688.
 172. Borgkvist A., Mosharov E.V., Sulzer D. (2014) Calcium currents regulate dopamine autoreceptors. *Brain*. **137**(Pt. 8), 2113–2115.
 173. Simons C., Benkert J., Deuter N., Poetschke C., Pongs O., Schneider T., Duda J., Liss B. (2019) NCS-1 deficiency affects mRNA levels of genes involved in regulation of ATP synthesis and mitochondrial stress in highly vulnerable *Substantia nigra* dopaminergic neurons. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 252.
 174. Karim S., Mirza Z., Ansari S.A., Rasool M., Iqbal Z., Sohrab S.S., Kamal M.A., Abuzenadah A.M., Al-Qahtani M.H. (2014) Transcriptomics study of neurodegenerative disease: emphasis on synaptic dysfunction mechanism in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. **13**(7), 1202–1212.
 175. Canal-Martin A., Sastre J., Sanchez-Barrena M.J., Canales A., Baldominos S., Pascual N., Martinez-Gonzalez L., Molero D., Fernandez-Valle M.E., Saez E., Blanco-Gabella P., Gomez-Rubio E., Martin-Santamaria S., Saiz A., Mansilla A., Canada F.J., Jimenez-Barbero J., Martinez A., Perez-Fernandez R. (2019) Insights into real-time chemical processes in a calcium sensor protein-directed dynamic library. *Nat. Commun.* **10**(1), 2798.
 176. Romero-Pozuelo J., Dason J.S., Mansilla A., Banos-Mateos S., Sardina J.L., Chaves-Sanjuan A., Jurado-Gomez J., Santana E., Atwood H.L., Hernandez-Hernandez A., Sanchez-Barrena M.J., Ferrus A. (2014) The guanine-exchange factor Ric8a binds to the Ca^{2+} sensor NCS-1 to regulate synapse number and neurotransmitter release. *J. Cell Sci.* **127**(Pt. 19), 4246–4259.
 177. Burgoyne R.D., Helassa N., McCue H.V., Haynes L.P. (2019) Calcium sensors in neuronal function and dysfunction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**(5), a035154.
 178. Grabarek Z. (2006) Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **359**(3), 509–525.
 179. Burgoyne R.D., Weiss J.L. (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca^{2+} -binding proteins. *Biochem. J.* **353**(Pt. 1), 1–12.
 180. Heidarsson P.O., Bjerrum-Bohr I.J., Jensen G.A., Pongs O., Finn B.E., Poulsen F.M., Kragelund B.B. (2012) The C-terminal tail of human neuronal calcium sensor 1 regulates the conformational stability of the Ca^{2+} -activated state. *J. Mol. Biol.* **417**(1–2), 51–64.
 181. Huttner I.G., Strahl T., Osawa M., King D.S., Ames J.B., Thorner J. (2003) Molecular interactions of yeast frequency (Frq1) with the phosphatidylinositol 4-kinase isoform, Pik1. *J. Biol. Chem.* **278**(7), 4862–4874.
 182. Lim S., Strahl T., Thorner J., Ames J.B. (2011) Structure of a Ca^{2+} -myristoyl switch protein that controls activation of a phosphatidylinositol 4-kinase in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **286**(14), 12565–12577.
 183. Stephen R., Bereta G., Golczak M., Palczewski K., Sousa M.C. (2007) Stabilizing function for myristoyl group revealed by the crystal structure of a neuronal calcium sensor, guanylate cyclase-activating protein 1. *Structure*. **15**(11), 1392–1402.
 184. Ames J.B., Ishima R., Tanaka T., Gordon J.I., Stryer L., Ikura M. (1997) Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature*. **389**(6647), 198–202.
 185. Muralidhar D., Jobby M.K., Krishnan K., Annapurna V., Chary K.V., Jeromin A., Sharma Y. (2005) Equilibrium unfolding of neuronal calcium sensor-1: N-terminal myristoylation influences unfolding and reduces protein stiffening in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.* **280**(16), 15569–15578.
 186. Martin V.M., Johnson J.R., Haynes L.P., Barclay J.W., Burgoyne R.D. (2013) Identification of key structural elements for neuronal calcium sensor-1 function in the regulation of the temperature-dependency of locomotion in *C. elegans*. *Mol. Brain*. **6**, 39.
 187. Weiergraber O.H., Senin I.I., Zernii E.Y., Churumova V.A., Kovaleva N.A., Nazipova A.A., Permyakov S.E., Permyakov E.A., Philippov P.P., Granzin J., Koch K.W. (2006) Tuning of a neuronal calcium sensor. *J. Biol. Chem.* **281**(49), 37594–37602.

188. Zhu Y., Yang S., Qi R., Zou Y., Ma B., Nussinov R., Zhang Q. (2015) Effects of the C-terminal tail on the conformational dynamics of human neuronal calcium sensor-1 protein. *J. Phys. Chem. B.* **119**(44), 14236–14244.
189. Zhu Y., Ma B., Qi R., Nussinov R., Zhang Q. (2016) Temperature-dependent conformational properties of human neuronal calcium sensor-1 protein revealed by all-atom simulations. *J. Phys. Chem. B.* **120**(14), 3551–3559.
190. Lian L.Y., Pandalaneni S.R., Patel P., McCue H.V., Haynes L.P., Burgoyne R.D. (2011) Characterisation of the interaction of the C-terminus of the dopamine D2 receptor with neuronal calcium sensor-1. *PLoS One.* **6**(11), e27779.
191. Aravind P., Chandra K., Reddy P.P., Jeromin A., Chary K.V., Sharma Y. (2008) Regulatory and structural EF-hand motifs of neuronal calcium sensor-1: Mg^{2+} modulates Ca^{2+} binding, Ca^{2+} -induced conformational changes, and equilibrium unfolding transitions. *J. Mol. Biol.* **376**(4), 1100–1115.
192. Chandra K., Ramakrishnan V., Sharma Y., Chary K.V. (2011) N-terminal myristoylation alters the calcium binding pathways in neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**(1), 81–95.
193. Jeromin A., Muralidhar D., Parameswaran M.N., Roder J., Fairwell T., Scarlata S., Dowal L., Mustafa S.M., Chary K.V., Sharma Y. (2004) N-terminal myristoylation regulates calcium-induced conformational changes in neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* **279**(26), 27158–27167.
194. Cox J.A., Durussel I., Comte M., Nef S., Nef P., Lenz S.E., Gundelfinger E.D. (1994) Cation binding and conformational changes in VILIP and NCS-1, two neuron-specific calcium-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **269**(52), 32807–32813.
195. Grubbs R.D. (2002) Intracellular magnesium and magnesium buffering. *Biomaterials.* **15**(3), 251–259.
196. O'Callaghan D.W., Burgoyne R.D. (2004) Identification of residues that determine the absence of a Ca^{2+} /myristoyl switch in neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* **279**(14), 14347–14354.
197. O'Callaghan D.W., Hasdemir B., Leighton M., Burgoyne R.D. (2003) Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca^{2+} sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K^{+} channels. *J. Cell Sci.* **116**(Pt. 23), 4833–4845.
198. O'Callaghan D.W., Burgoyne R.D. (2003) Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **31**(Pt. 5), 963–965.
199. Valentine K.G., Mesleh M.F., Opella S.J., Ikura M., Ames J.B. (2003) Structure, topology, and dynamics of myristoylated recoverin bound to phospholipid bilayers. *Biochemistry.* **42**(21), 6333–6340.
200. De Cotiis D.A., Woll M.P., Fox T.E., Hill R.B., Levenson R., Flanagan J.M. (2008) Optimized expression and purification of myristoylated human neuronal calcium sensor 1 in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.* **61**(2), 103–112.
201. Baksheeva V.E., Nemashkalova E.L., Firsov A.M., Zalevsky A.O., Vladimirov V.I., Tikhomirova N.K., Philippov P.P., Zamyatnin A.A., Jr., Zinchenko D.V., Antonenko Y.N., Permyakov S.E., Zernii E.Y. (2020) Membrane binding of neuronal calcium sensor-1: highly specific interaction with phosphatidylinositol-3-phosphate. *Biomolecules.* **10**(2), 164.
202. Salaun C., James D.J., Chamberlain L.H. (2004) Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic.* **5**(4), 255–264.
203. Taverna E., Saba E., Linetti A., Longhi R., Jeromin A., Righi M., Clementi F., Rosa P. (2007) Localization of synaptic proteins involved in neurosecretion in different membrane microdomains. *J. Neurochem.* **100**(3), 664–677.
204. Strahl T., Huttner I.G., Lusin J.D., Osawa M., King D., Thorner J., Ames J.B. (2007) Structural insights into activation of phosphatidylinositol 4-kinase (Pik1) by yeast frequenin (Frq1). *J. Biol. Chem.* **282**(42), 30949–30959.
205. Philippov P.P., Zernii E.Y. (2018) Recoverin. In: *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Ed. Choi S. Cham: Springer Int. Publ., 4556–4563.
206. Ames J.B., Levay K., Wingard J.N., Lusin J.D., Slepak V.Z. (2006) Structural basis for calcium-induced inhibition of rhodopsin kinase by recoverin. *J. Biol. Chem.* **281**(48), 37237–37245.
207. Roca C., Martinez-Gonzalez L., Daniel-Mozo M., Sastre J., Infantes L., Mansilla A., Chaves-Sanjuan A., Gonzalez-Rubio J.M., Gil C., Canada F.J., Martinez A., Sanchez-Barrena M.J., Campillo N.E. (2018) Deciphering the inhibition of the neuronal calcium sensor 1 and the guanine exchange factor Ric8a with a small phenothiazine molecule for the rational generation of therapeutic synapse function regulators. *J. Med. Chem.* **61**(14), 5910–5921.
208. Mansilla A., Chaves-Sanjuan A., Campillo N.E., Semelidou O., Martinez-Gonzalez L., Infantes L., Gonzalez-Rubio J.M., Gil C., Conde S., Skoulakis E.M., Ferrus A., Martinez A., Sanchez-Barrena M.J. (2017) Interference of the complex between NCS-1 and Ric8a with phenothiazines regulates synaptic function and is an approach for fragile X syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**(6), E999–E1008.
209. Nguyen L.D., Petri E.T., Huynh L.K., Ehrlich B.E. (2019) Characterization of NCS1-InsP3R1 interaction and its functional significance. *J. Biol. Chem.* **294**(49), 18923–18933.
210. Bellucci L., Corni S., Di Felice R., Paci E. (2013) The structure of neuronal calcium sensor-1 in solution revealed by molecular dynamics simulations. *PLoS One.* **8**(9), e74383.
211. Zhu Y., Wu Y., Luo Y., Zou Y., Ma B., Zhang Q. (2014) R102Q mutation shifts the salt-bridge network and reduces the structural flexibility of human neuronal calcium sensor-1 protein. *J. Phys. Chem. B.* **118**(46), 13112–13122.

212. Brumback A.C., Ellwood I.T., Kjaerby C., Iafrati J., Robinson S., Lee A.T., Patel T., Nagaraj S., Davatolhagh F., Sohal V.S. (2018) Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. *Mol. Psychiatry*. **23**(100), 2078–2089.
213. Tsvetkov P.O., Roman A.Y., Baksheeva V.E., Nazipova A.A., Shevelyova M.P., Vladimirov V.I., Buyanova M.F., Zinchenko D.V., Zamyatnin A.A., Jr., Devred F., Golovin A.V., Permyakov S.E., Zernii E.Y. (2018) Functional status of neuronal calcium sensor-1 is modulated by zinc binding. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 459.
214. Baksheeva V.E., Tsvetkov P.O., Zalevsky A.O., Vladimirov V.I., Gorokhovets N.V., Zinchenko D.V., Permyakov S.E., Devred F., Zernii E.Y. (2022) Zinc modulation of neuronal calcium sensor proteins: three modes of interaction with different structural outcomes. *Biomolecules*. **12** (7), 956.
215. Maret W. (2011) Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *Biometals*. **24**(3), 411–418.
216. Ugarte M., Osborne N.N. (2014) Recent advances in the understanding of the role of zinc in ocular tissues. *Metallomics*. **6**(2), 189–200.
217. Watt N.T., Whitehouse I.J., Hooper N.M. (2010) The role of zinc in Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, 971021.
218. Li Y., Anderegg L., Yuki K., Omura K., Yin Y., Gilbert H.Y., Erdogan B., Asdourian M.S., Shrock C., de Lima S., Apfel U.P., Zhuo Y., Hershfinkel M., Lipard S.J., Rosenberg P.A., Benowitz L. (2017) Mobile zinc increases rapidly in the retina after optic nerve injury and regulates ganglion cell survival and optic nerve regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(2), E209–E218.
219. Bossy-Wetzel E., Talantova M.V., Lee W.D., Scholzke M.N., Harrop A., Mathews E., Gotz T., Han J., Ellisman M.H., Perkins G.A., Lipton S.A. (2004) Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. *Neuron*. **41**(3), 351–365.
220. Zernii E.Y., Nazipova A.A., Gancharova O.S., Kazakov A.S., Serebryakova M.V., Zinchenko D.V., Tikhomirova N.K., Senin I.I., Philippov P.P., Permyakov E.A., Permyakov S.E. (2015) Light-induced disulfide dimerization of recoverin under *ex vivo* and *in vivo* conditions. *Free Radic. Biol. Med.* **83**, 283–295.
221. Liebl M.P., Kaya A.M., Tenzer S., Mittenzwei R., Koziollek-Drechsler I., Schild H., Moosmann B., Behl C., Clement A.M. (2014) Dimerization of vision-like protein 1 is regulated by oxidative stress and calcium and is a pathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **72**, 41–54.
222. Permyakov S.E., Nazipova A.A., Denesyuk A.I., Bakunts A.G., Zinchenko D.V., Lipkin V.M., Uversky V.N., Permyakov E.A. (2007) Recoverin as a redox-sensitive protein. *J. Proteome Res.* **6**(5), 1855–1863.
223. Permyakov S.E., Zernii E.Y., Knyazeva E.L., Denesyuk A.I., Nazipova A.A., Kolpakova T.V., Zinchenko D.V., Philippov P.P., Permyakov E.A., Senin I.I. (2012) Oxidation mimicking substitution of conservative cysteine in recoverin suppresses its membrane association. *Amino Acids*. **42**(4), 1435–1442.
224. Zernii E.Y., Nazipova A.A., Nemashkalova E.L., Kazakov A.S., Gancharova O.S., Serebryakova M.V., Tikhomirova N.K., Baksheeva V.E., Vladimirov V.I., Zinchenko D.V., Philippov P.P., Senin I.I., Permyakov S.E. (2018) Light-induced thiol oxidation of recoverin affects rhodopsin desensitization. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 474.
225. Beatty S., Koh H., Phil M., Henson D., Boulton M. (2000) The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* **45**(2), 115–134.
226. Baksheeva V.E., Tiulina V.V., Tikhomirova N.K., Gancharova O.S., Komarov S.V., Philippov P.P., Zamyatnin A.A., Jr., Senin I.I., Zernii E.Y. (2018) Suppression of light-induced oxidative stress in the retina by mitochondria-targeted antioxidant. *Antioxidants* (Basel). **8**(1), 3.
227. Chistyakov D.V., Baksheeva V.E., Tiulina V.V., Gorainov S.V., Azbukina N.V., Gancharova O.S., Arifulin E.A., Komarov S.V., Chistyakov V.V., Tikhomirova N.K., Zamyatnin A.A., Philippov P.P., Senin I.I., Sergeeva M.G., Zernii E.Y. (2020) Mechanisms and treatment of light-induced retinal degeneration-associated inflammation: insights from biochemical profiling of the aqueous humor. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(3), 704.
228. Baksheeva V.E., Baldin A.V., Zalevsky A.O., Nazipova A.A., Kazakov A.S., Vladimirov V.I., Gorokhovets N.V., Devred F., Philippov P.P., Bazhin A.V., Golovin A.V., Zamyatnin A.A., Jr., Zinchenko D.V., Tsvetkov P.O., Permyakov S.E., Zernii E.Y. (2021) Disulfide dimerization of neuronal calcium sensor-1: implications for zinc and redox signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(22), 12602.
229. Holtz W.A., Turetzky J.M., Jong Y.J., O'Malley K.L. (2006) Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics. *J. Neurochem.* **99**(1), 54–69.
230. Oshikawa M., Tsutsui C., Ikegami T., Fuchida Y., Matsubara M., Toyama S., Usami R., Ohtoko K., Kato S. (2011) Full-length transcriptome analysis of human retina-derived cell lines ARPE-19 and Y79 using the vector-capping method. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**(9), 6662–6670.
231. Burgoyne R.D., Haynes L.P. (2012) Understanding the physiological roles of the neuronal calcium sensor proteins. *Mol. Brain*. **5**(1), 2.

Neuronal Calcium Sensor 1: a Zinc/Redox-Dependent Protein of Nervous System Signaling Pathways

V. E. Baksheeva¹, A. A. Zamyatnin, Jr.^{1, 2, 3, 4}, and E. Yu. Zernii^{1, *}

¹*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

²*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

³*Scientific Center for Translation Medicine, Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia*

⁴*Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: zerni@belozersky.msu.ru

Intracellular calcium signals play a key role in the regulation of nervous system structure and function. The control of neuronal excitability and plasticity by calcium ions underlies the mechanisms of higher nervous activity, and the mechanisms of this control are of particular interest to researchers. In recent decades, a family of highly specialized neuronal proteins that can translate the information contained in calcium signals into the regulation of channels, enzymes, receptors, and transcription factors has been described. The most abundant member of this family is neuronal calcium sensor-1 (NCS-1), which is intensively expressed in CNS neurons and controls such vital processes as neuronal growth and survival, reception, neurotransmission and synaptic plasticity. In addition to calcium ions, NCS-1 may bind intracellular ‘mobile’ zinc, increased concentration of which is a characteristic feature of cells under oxidative stress. Zinc coordination under these conditions stimulates NCS-1 oxidation to form a disulfide dimer (dNCS-1) with altered functional properties. The combined effect of mobile zinc and the increased redox potential of the medium can thus induce the aberrant NCS-1 activity involving signals for survival of neuronal cells or induction of their apoptosis and, as a consequence, the development of neurodegenerative processes. The review details the localization, regulation of expression, structure and molecular properties of NCS-1, as well as current data on its signaling activity in health and disease, including zinc-dependent redox-regulation cascades.

Keywords: neurons, calcium signals, neuronal calcium sensors, neuronal calcium sensor-1, zinc, oxidative stress, redox regulation, neurodegenerative diseases

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 616-006,616.71,577.3

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ОПУХОЛЕЙ

© 2023 г. М. В. Ширманова^{а, *}, С. Д. Синюшкина^а, А. Д. Комарова^{а, б}

^аПриволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, 603005 Россия

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

*e-mail: Shirmanovam@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 11.04.2023 г.

Принята к публикации 26.04.2023 г.

Опухолевая гетерогенность создает серьезные проблемы как для диагностики и терапии злокачественных новообразований, так и для проведения фундаментальных исследований. Межопухолевые и внутриопухолевые отличия касаются различных характеристик и аспектов жизнедеятельности опухолевых клеток, включая их метаболизм. В представленном обзоре рассмотрена метаболическая гетерогенность опухолей с фокусом на энергетический обмен, ее причины, механизмы и методы исследования. Более подробно описан флуоресцентный времяразрешенный имиджинг как новый перспективный метод наблюдения метаболической гетерогенности на клеточном уровне. Показана важность изучения энергетического обмена опухолей и выявления внутри- и межопухолевых метаболических отличий.

Ключевые слова: опухоль, опухолевая гетерогенность, энергетический метаболизм, окислительное фосфорилирование, гликолиз, метаболические кофакторы, флуоресцентный времяразрешенный имиджинг

DOI: 10.31857/S0026898423060186, EDN: QJIYQ

ВВЕДЕНИЕ

Особый метаболизм опухолей остается предметом активных исследований. Связанные с канцерогенезом изменения затрагивают все метаболические процессы — энергетический обмен, биосинтез, регуляцию редокс-баланса. Главная причина перестройки метаболизма — потребность в энергии и макромолекулах для быстрого роста опухолевых клеток, так что без метаболической реорганизации прогрессия опухоли кажется невозможной.

К метаболическим особенностям, характерным для опухолей, относятся повышенный (по сравнению с нормальными тканями) уровень гликолиза и способность использовать гликолитический путь даже при нормальном содержании кислорода (эффект, открытый в 1920-х гг. Отто Варбургом и названный в его честь), снижение митохондриального дыхания, использование глутамина и жирных кислот в качестве дополнительных или альтернативных глюкозе энергетических субстратов, высокий уровень биосинтеза липи-

дов, повышенная продукция активных форм кислорода и азота и, как следствие, перманентная активация механизмов антиоксидантной защиты [1–5].

В то же время, работы последних десятилетий убедительно показывают, что указанные особенности не абсолютны, а метаболизм опухолевых клеток представляет собой динамичную и высокопластичную систему, в которой отдельные метаболические пути могут взаимно переключаться в зависимости от текущих потребностей клетки и условий микроокружения. Все это приводит к тому, что метаболические профили опухолевых клеток варьируют в широких пределах как внутри одного опухолевого узла, так и между отдельными опухолями одного типа, что приводит к метаболической гетерогенности [6].

Предполагается, что метаболическая гетерогенность является результатом комбинированного воздействия различных факторов, одни из которых относятся к самой опухолевой клетке (например, гистологический тип, степень дифференцировки, соматические мутации), а другие обусловлены микроокружением (например, распределением кислорода и питательных веществ, взаимодействием с внеклеточным матриксом и стромальными клетками) [7]. Чтобы понять, как возникают и развиваются метаболические фенотипы,

Сокращения. FLIM — флуоресцентный времяразрешенный имиджинг (Fluorescence Lifetime Imaging); ¹⁸F-ФДГ — ¹⁸F-фтордезоксиглюкоза; ИГХ — иммуногистохимия; МРС — магнитно-резонансная спектроскопия; МРТ — магнитно-резонансная томография; ОСК — опухолевые стволовые клетки; ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография.

требуется установить, в какой степени каждый из этих факторов влияет на опухолевую клетку, а также иметь высокочувствительные и надежные методы наблюдения метаболического статуса на клеточном уровне.

В прикладном аспекте исследования метаболической гетерогенности важны для прогнозирования заболевания и разработки персонализированных подходов к противоопухолевой терапии. Очевидно, что высокая метаболическая гетерогенность и пластичность опухолевых клеток могут быть факторами, неблагоприятными для терапии опухолей, поскольку позволяют отдельным группам клеток выживать при действии препаратов, а другим — приспосабливаться к неблагоприятным и переменчивым условиям [8, 9].

Рассмотрим более подробно метаболическую гетерогенность как одно из проявлений опухолевой гетерогенности, ее основные причины и механизмы, а также возможности современных методов в изучении метаболической гетерогенности с примерами из экспериментальных и клинических исследований.

ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОПУХОЛЕВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ

Злокачественные новообразования по своей структуре представляют собой сложные системы, которым свойственна генетическая, молекулярная, клеточная и архитектурная (пространственная) неоднородность. Совокупность показателей, демонстрирующих различия между опухолями или внутри каждой отдельной опухоли, называют *опухолевой гетерогенностью* [7–9].

К основным проявлениям опухолевой гетерогенности относятся:

- генетическая гетерогенность — неоднородность опухоли по генным мутациям, хромосомным и кариотипическим нарушениям;

- эпигенетическая гетерогенность — неоднородность профилей метилирования ДНК и ацетилирования гистонов в опухоли;

- транскриптомная гетерогенность — различия в уровне экспрессии генов (транскрипционных профилях) в одиночных опухолевых клетках;

- протеомная гетерогенность — многообразие белковых форм, кодируемых одним геном, которое достигается за счет регуляции транскрипции, трансляции и посттрансляционных модификаций белков;

- фенотипическая гетерогенность — различия морфологического строения опухоли и разнообразие ее биохимических паттернов [6].

Основные факторы, которые приводят к формированию опухолевой гетерогенности, можно разделить на две большие группы: 1) внутрен-

ние, относящиеся к самим опухолевым клеткам, и 2) внешние, связанные с микроокружением опухоли.

Одной из главных причин внутриопухолевого клеточного разнообразия и межопухолевых отличий является *генетическая* изменчивость, обусловленная мутациями в генах, хромосомной и микросателлитной нестабильностью. В большинстве типов злокачественных опухолей целюшка генетическая нестабильность присутствует в форме хромосомных aberrаций, реже — в форме генетической нестабильности на уровне нуклеотидов. Обнаружены различия в генетических профилях клеток, взятых из разных зон одной и той же опухоли, а также клеток первичных опухолей и их метастазов. Генетическая природа опухолевой гетерогенности хорошо описывается теорией клональной эволюции опухолей, которая объясняет опухолевую гетерогенность как результат естественного отбора наиболее агрессивных и адаптированных клеток [10]. Стохастические мутации в отдельных опухолевых клетках служат фундаментом отбора клонов, способных обеспечить онкогенный потенциал, ускользание от иммунного надзора, устойчивость к терапевтическим воздействиям. Случайные мутации происходят из-за повышенной геномной нестабильности опухолевых клеток, а затем “тестируются” дарвиновским отбором: только меньшая часть мутаций окажется в итоге селективно выгодной [11]. Выделение и эволюция отдельных клонов опухолевых клеток способствуют дальнейшей прогрессии опухоли [12].

Помимо генетических мутаций важную роль играют *эпигенетические изменения*, под которыми подразумеваются наследуемые, но обратимые изменения в активности генов и фенотипе клетки без изменений нуклеотидной последовательности ДНК. Эпигенетические факторы опухолевой гетерогенности включают в себя изменение профиля метилирования ДНК, модификацию гистонов, реорганизацию хроматина, нарушение экспрессии микроРНК. Эпигенетический контроль экспрессии генов регулируется соотношением между ферментами, которые “наносят” регуляторные метки на ДНК и гистоны (например, ДНК- и гистон-метилтрансферазы) и “удаляют” эти метки (например, гистондеацетилазы, ДНК-деметилазы) [13, 14]. Механизмы эпигенетической регуляции включают в себя также метилирование промоторных областей генов, ведущее к повышению геномной нестабильности, и ремоделирование хроматина в результате посттрансляционной модификации гистоновых белков [15]. Типичным примером эпигенетической регуляции экспрессии генов в нормальных клетках служит дифференцировка эмбриональных стволовых клеток в процессе эмбриогенеза. При канцерогенезе эпигенетические механизмы вовлече-

ны в трансформацию органоспецифичных стволовых или соматических клеток в опухолевые стволовые клетки (ОСК) и последующую дифференцировку части из них. Согласно “иерархической” гипотезе, за поддержание и прогрессирование опухоли отвечают только ОСК, которые представляют собой особую популяцию опухолевых клеток, обладающую способностью к неограниченному самообновлению и к дифференцировке в основную массу опухоли, что делает их схожими с нормальными стволовыми клетками [10, 11]. При значительной дестабилизации эпигенетического ландшафта, например под действием внешних факторов (окислительный стресс, воспаление и др.), в опухоли могут появляться новые популяции ОСК, меняющие клеточную иерархию [16–18].

К внешним причинам гетерогенности опухолей относится *опухолевое микроокружение*. Микроокружение опухоли неоднородно: разные области опухоли имеют разную плотность кровеносных и лимфатических сосудов, разный состав стромальных клеток и внеклеточного матрикса. Отличительными чертами многих опухолей являются гипоксия, повышенный уровень активных форм кислорода и низкие значения внеклеточного рН (кислая среда). Все эти факторы важны для регуляции пролиферации и способствуют опухолевой прогрессии. В состав микроокружения входят различные типы клеток: опухоль-ассоциированные фибробласты, иммунные клетки, эндотелиальные клетки, перициты, стволовые клетки. Все они находятся в тесном взаимодействии с опухолевыми клетками и играют роль в поддержании роста опухоли [11]. Например, фибробласты продуцируют ростовые факторы, цитокины, коллаген и ремоделирующие его ферменты, стимулируют миграционную активность опухолевых клеток [19]. Иммунные клетки выделяют ряд воспалительных интерлейкинов, которые способствуют поддержанию хронического воспаления в опухоли и вызывают редифференцировку опухолевых клеток в ОСК [20, 21]. Отдельные типы иммунных клеток в опухолевом микроокружении, такие как регуляторные Т-лимфоциты и супрессорные клетки миелоидного происхождения, подавляют активацию, пролиферацию и функции эффекторных Т-лимфоцитов и таким образом защищают опухоль от действия иммунной системы. Эндотелиальные клетки формируют сосудистую сеть, обеспечивая снабжение опухоли кислородом и питательными веществами [10]. Внеклеточный матрикс, в состав которого входит коллаген, эластин, фибронектин, ламинины и др., составляет механический каркас опухоли, обеспечивает ее жесткость, регулирует пролиферативную активность, миграцию и инвазию опухолевых клеток, ограничивает диффузию питательных веществ и лекарственных препаратов. Неоднород-

ный состав внеклеточного матрикса и клеточных компонентов стромы в опухоли способствуют гетерогенности самих опухолевых клеток.

Таким образом, опухолевая гетерогенность обусловлена генетическими изменениями и эпигенетическими событиями, а также влиянием условий опухолевого микроокружения. Множественные различия опухолей на генетическом, молекулярном, клеточном и тканевом уровнях приводят к основному клиническому проявлению гетерогенности — разному ответу на одну и ту же терапию у разных пациентов или клеточных субклонов одной и той же опухоли. Важным процессом, который повышает выраженность опухолевой гетерогенности и скорость формирования резистентности к терапии, является метастазирование: каждый метастаз в условиях, отличных от исходных, начинает самостоятельное развитие с формированием новых субклонов [22]. Именно поэтому разработка подходов к прогнозированию онкологических заболеваний, а также выбор терапевтической стратегии должны проводиться с учетом опухолевой гетерогенности [23].

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ОПУХОЛЕЙ

Метаболическая гетерогенность заключается в том, что в опухолях одновременно присутствуют клетки с различными метаболическими профилями, а метаболизм опухолей одного типа и стадии различается у разных пациентов (рис. 1).

Наиболее известная особенность энергетического метаболизма опухолевых клеток, названная аэробным гликолизом, была описана в 1920-х гг. немецким физиологом Отто Варбургом [24]. Эффект Варбурга заключается в том, что опухолевые клетки используют гликолиз не только при гипоксии, но и в условиях нормальной оксигенации. Изначально считалось, что этот эффект обусловлен митохондриальной дисфункцией в клетках опухоли, однако впоследствии обнаружили, что он имеет место и при нормально функционирующих митохондриях, так что данное предположение было опровергнуто [25].

Хотя причины аэробного гликолиза до сих пор остаются неизвестными, существует несколько биологических объяснений этого процесса:

1) быстрое получение АТФ [24]. С точки зрения выработки АТФ на единицу глюкозы, гликолиз менее эффективен, чем митохондриальное дыхание. Однако его скорость на 1–2 порядка выше скорости полного окисления глюкозы в митохондриях. Таким образом, клетки могут получить АТФ быстрее, что дает определенное преимущество в условиях конкуренции за энергетические субстраты.

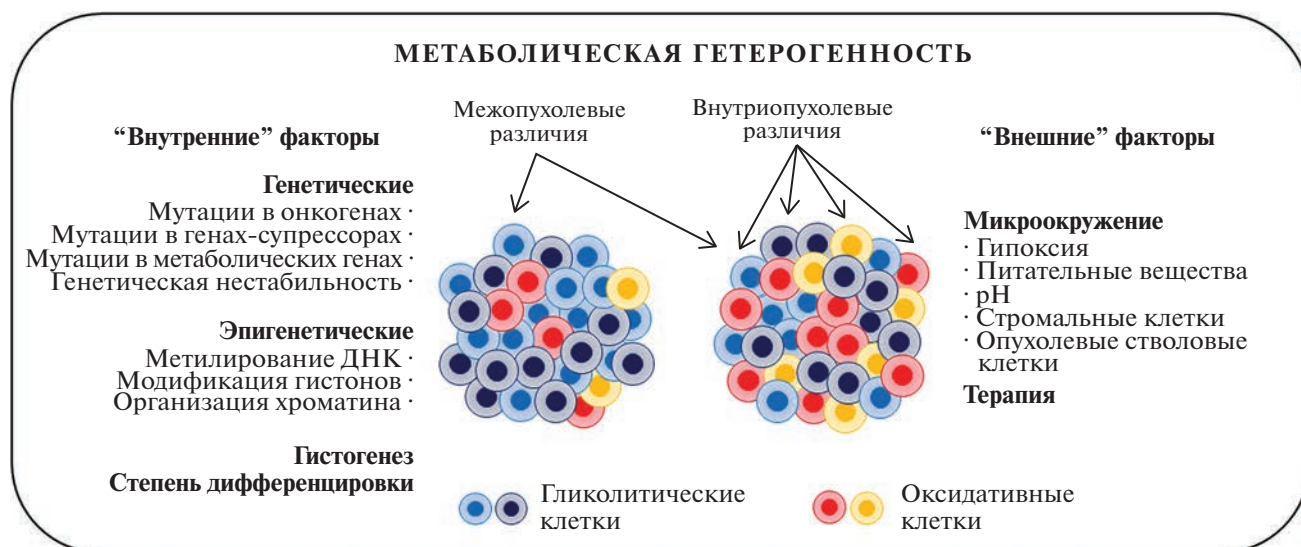


Рис. 1. Метаболическая гетерогенность опухолей. Схематично представлены опухоли, метаболически различающиеся между собой и гетерогенные на клеточном уровне. Перечислены основные факторы, определяющие метаболический профиль опухоли, — “внутренние” (присущие самим опухолевым клеткам) и “внешние” (условия микроокружения и внешние воздействия).

2) Образование углеродных метаболитов для биосинтеза нуклеотидов, липидов и белков [26]. Анаболические процессы, протекающие в пролиферирующих, быстро растущих опухолевых клетках, нуждаются в повышенном потреблении глюкозы. Кроме того, глюкоза служит субстратом для пентозофосфатного пути, один из продуктов которого, NAD(P)H, играет важную роль в *de novo* синтезе липидов и антиоксидантной защите клетки.

3) Закисление внеклеточной среды [27, 28]. Образующийся в ходе гликолиза лактат транспортируется в межклеточное пространство, закисляя его. Кислые значения pH способствуют иммуносупрессии, инвазии и метастазированию опухолей, стимулируют ангиогенез.

4) Снижение уровня активных форм кислорода [29, 30]. Переход клеток на гликолитический метаболизм при условии снижения уровня окислительного фосфорилирования приводит к снижению продукции активных форм кислорода, повреждающих мембраны и ДНК.

Стоит отметить, что в настоящее время теория “чистого гликолиза” в опухолях отвергнута. Дефектные митохондрии действительно встречаются в некоторых типах опухолей, но, как правило, клетки с гликолитическим метаболизмом сохраняют функциональные митохондрии и могут активировать дыхание при определенных условиях. В большинстве опухолей максимальный вклад гликолиза в производство АТФ не превышает 50–60% [31]. Более того, опухолевые клетки могут обратимо переключаться между гликолитическим и окислительным типом метаболизма в зависимо-

сти от наличия глюкозы и кислорода в окружающей среде и собственной пролиферативной активности [32].

Одна из теорий метаболической гетерогенности опухоли основана на способности опухолевых клеток к *пролиферации*, поскольку использование углеродных молекул опухолевыми клетками, активно делящимися и находящимися в состоянии покоя, сильно отличается друг от друга [33]. Активно делящиеся опухолевые клетки имеют тенденцию к гликолитическому метаболизму [34]: в них активируется аэробный гликолиз, что приводит к аномально высокой скорости поглощения глюкозы [35, 36]. При этом уровень митохондриального дыхания может варьировать. В тот период, когда опухолевая клетка находится в состоянии покоя, глюкоза окисляется в процессе клеточного дыхания. Характерно, что опухоли содержат клетки с разной пролиферативной активностью, а доля пролиферирующих клеток отличается на разных сроках роста — небольшие опухоли на ранних стадиях содержат больше активно делящихся клеток, чем зрелые новообразования.

В свою очередь, общий метаболический профиль опухолевых клеток и их пролиферативная активность определяются целым рядом факторов — особенностями метаболизма исходных нормальных клеток и конкретного типа ткани, генетическими нарушениями и эпигенетической регуляцией, а также спецификой опухолевого микроокружения (рис. 1). Кроме того, метаболизм опухоли меняется в процессе ее роста и под действием противоопухолевой терапии.

Метаболическая реорганизация опухолевых клеток может быть результатом *мутаций* в онкогенах и в генах-супрессорах опухолевого роста, либо в самих метаболических генах. В первом случае нарушения регуляции одних сигнальных каскадов приводят к неконтролируемой пролиферации (например, гены *TP53*, *APC*, *KRAS*, *MYC*, *PTEN*, *PI3K*), других — к дисбалансу редокс-статуса (например, *NRF2*, *KEAP1*), но все они вызывают скоординированные изменения в метаболических путях, как правило, связанные с активацией гликолиза [37]. Это подтверждает фундаментальное значение аэробного гликолиза для онкогенеза. Например, при раке молочной железы мутации генов *TP53*, *BRCA*, *HER2* коррелируют с повышенной экспрессией генов, отвечающих за регуляцию гликолиза (*HK3*, *GPI*, *GAPDH*, *PGK1*, *ENO1*, *PDK1*, *SDHC*, *PFKL* и др.) [38–40]. Активация гликолиза при разных типах опухолей коррелирует с экспрессией гена *RAS* и генов пути MAPK. Аденокарцинома легкого является примером онкологической патологии, при которой наблюдаются все наиболее часто встречающиеся в опухолях мутации (гены *TP53*, *KRAS*, *KEAP1*, *STK11*, *EGFR*, *NF1*, *BRAF*) [41], которые прямо или косвенно регулируют метаболизм опухолевых клеток и способствуют их метаболической гетерогенности [42]. Интересно, что экспрессия генов цикла Кребса и окислительного фосфорилирования значительно отличается в разных типах рака, предполагая, что роль митохондриального дыхания не универсальна и может определяться условиями микроокружения или спецификой конкретной ткани.

В опухолях одной локализации разные мутации могут приводить к разным метаболическим нарушениям. Например, опухоли печени, индуцированные мутациями в онкогенах *MYC* и *MET*, имеют существенные различия в метаболизме глюкозы и глутамина [43]. С другой стороны, метаболические процессы в опухоли специфичны для ткани, из которой эта опухоль происходит, поэтому схожие мутации в клетках разного происхождения могут вызывать различные метаболические последствия. Так, метаболизм опухолей печени, индуцированных *MYC*, отличается от метаболизма опухолей легкого, индуцированных этим же онкогеном [43]. Генетическая предрасположенность к преимущественному использованию того или иного метаболического пути приводит к возникновению межопухолевых различий в энергетическом метаболизме [44].

Мутации в генах метаболических путей могут быть причиной злокачественной трансформации, т.е. выполнять опухоль-иницирующую функцию или появляться в процессе развития опухоли. Наиболее известные мутации такого рода связаны с ключевыми ферментами цикла Кребса — сукцинатдегидрогеназой (*SDH*), изоцитратдегидрогеназой (*IDH1/2*) и фумаратгидратазой (*FH*) [37].

Все три онкометаболита — сукцинат, фумарат и D-2-гидроксиглутарат — действуют как ингибиторы α -кетоглутарат-зависимых диоксигеназ и приводят к значительным перестройкам в эпигенетической регуляции генов, отвечающих за точную дифференцировку.

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов также связана с понятием метаболической гетерогенности, потому что, с одной стороны, активность многих метаболических ферментов и переносчиков регулируется эпигенетическими модификациями гистонов и ДНК, а с другой, данные изменения реагируют на метаболическое состояние клетки. Например, соотношение ацетил-KoA и свободного кофермента A может регулировать ацетилирование гистонов, а α -кетоглутарат влияет на деметилирование гистонов и ДНК [14]. Многие гены, связанные с метаболизмом, находятся под эпигенетическим контролем. Например, при гепатоцеллюлярной карциноме и глиобластоме гипометилирование промотора гена гексокиназы-2 усиливает синтез данного фермента и вызывает переход на гликолитический метаболизм [45]. При колоректальном раке и гепатоцеллюлярной карциноме происходит гиперметилирование промотора гена, кодирующего фруктозо-1,6-бисфосфатазу (скорость-лимитирующий фермент глюконеогенеза), что приводит к подавлению активности данного фермента и повышению скорости гликолитических реакций [46].

Метаболический профиль клеток опухоли определяется не только (эпи)генетическими нарушениями, но и условиями микроокружения [11]. Например, в зависимости от сигналов внешней среды опухолевые клетки способны регулировать соотношение процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза и таким образом подстраиваться под текущие условия [47]. Основными факторами в опухолевом микроокружении, которые влияют на метаболизм, являются гипоксия, доступность питательных веществ и воспаление. Поскольку разные участки опухоли подвергаются воздействию неоднородного во времени и пространстве микроокружения, метаболический профиль всей опухоли может быть весьма гетерогенным.

Опухолевым тканям необходим постоянный приток кислорода и питательных веществ через локальную сосудистую сеть. Вследствие неравномерного распределения и атипичной структуры кровеносных сосудов на фоне быстрого роста опухолевой массы в опухолях часто развивается гипоксия [48]. Как правило, солидная опухоль содержит области легкой и тяжелой гипоксии и в процессе роста испытывает колебания кровоснабжения и, следовательно, содержания кислорода. Гипоксия приводит к множественным эпигенетическим и генетическим изменениям, опосредованным, в ос-

новном, молекулярным каскадом mTORC1–HIF1 [49]. Индуцируемый гипоксией фактор HIF-1 инициирует транскрипцию более 100 генов, которые способствуют выживанию клеток в условиях гипоксии, в том числе генов, кодирующих ферменты гликолиза (*GLUT1*, *HK2*, *LDHA*, *MCT4* и др.) и фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*). Так что опухоль адаптируется к условиям недостатка кислорода и становится более агрессивной – гипоксия способствует инвазии, метастазированию и резистентности опухоли к разным видам терапии [50]. Вызываемые гипоксией перестройки клеточного метаболизма зависят от тяжести и длительности гипоксии и различаются в разных типах опухолей. В типичном случае легкая и/или острая гипоксия активирует гликолиз и снижает уровень окислительного фосфорилирования [51], тогда как глубокая и/или хроническая гипоксия запускает продукцию активных форм кислорода в митохондриях и, как следствие, механизмы антиоксидантной защиты, снижает интенсивность гликолиза [52]. Активные формы кислорода индуцируют реакции адаптации к воздействию гипоксии либо инициируют апоптоз клетки. Эти процессы напрямую зависят от функциональной активности митохондрий. Критическое отсутствие кислорода (аноксия) приводит к необратимому повреждению митохондрий и гибели клеток.

Снижение кровоснабжения приводит также к *дефициту глюкозы* – основного питательного субстрата опухолевых клеток. При недостатке глюкозы опухолевые клетки могут получать энергию с использованием альтернативных источников, а именно аминокислот (в основном глутамина) и жирных кислот [53–57]. В процессе глутаминолиза глутамин с помощью митохондриальной глутаминазы (*GLS1*) или ее цитозольной изоформы (*GLS2*) превращается в глутамат, а затем с помощью глутаминдегидрогеназы-1 (*GLUD1*) – в α -кетоглутарат, который поступает в цикл Кребса. Онкоген *MYC* управляет метаболизмом глутамина, способствуя его проникновению в митохондрии и превращению в глутамат. Жирные кислоты в опухолевых клетках расщепляются путем β -окисления, в результате чего образуется ацетил-КоА, который впоследствии также подпитывает цикл Кребса. Ингибирование того или иного метаболического пути в опухолевых клетках запускает целый ряд компенсаторных механизмов для сохранения пролиферации и выживания. Например, при ингибировании глутаминазы глутаминолиз может поддерживаться амидотрансферазами, ингибированный катаболизм глутамина компенсируется гликолизом, а биосинтез аминокислот (например, серина) или жирных кислот – усиленным импортом соответствующих питательных веществ [58].

В качестве энергетического субстрата может использоваться и лактат. Считается, что метабо-

лизм глюкозы и лактата зависит от различий в концентрации кислорода в разных участках опухоли: гипоксические клетки потребляют глюкозу и секретируют лактат, тогда как клетки в областях с лучшей перфузией импортируют молочную кислоту и используют ее в качестве энергетического субстрата [59, 60]. Межклеточный транспорт лактата происходит при участии монокарбоксилатных переносчиков, из которых наибольшую субстратную специфичность к лактату проявляют MCT-1 и -4 [61]. MCT-4-положительные гликолитические клетки формируют кислое микроокружение опухоли за счет секреции лактата, а MCT-1-экспрессирующие окислительные клетки используют молочную кислоту в качестве субстрата для цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, вырабатывают АТФ и продуцируют интермедиаты для биосинтетических процессов. Контроль метаболического симбиоза имеет генетическую основу. В опухолевых клетках с окислительным биоэнергетическим фенотипом, располагающихся вблизи кровеносных сосудов, наблюдается экспрессия *MYC*, который стимулирует биогенез митохондрий, генерацию АТФ и анаболические пути для поддержания пролиферации [62]. В гипоксических клетках опухоли под влиянием HIF-1 стимулируется экспрессия гликолитических генов, снижается метаболизм митохондрий и эффективность окислительного фосфорилирования, активируется гликолиз [63].

Между опухолевыми клетками и опухоль-ассоциированными фибробластами может наблюдаться метаболический симбиоз [60]. Под влиянием активных форм кислорода, исходящих из опухоли, в фибробластах происходит стабилизация HIF-1 α и тем самым создаются “псевдогипоксические” условия, что, в свою очередь, способствует усиленному потреблению глюкозы и активации аэробного гликолиза. Впоследствии фибробласты через MCT-4 выделяют в окружающую среду лактат, который затем через MCT-1 поглощается опухолевыми клетками [14]. Явление, когда фибробласты переключают свой метаболизм на аэробный гликолиз и взаимодействуют с окислительными опухолевыми клетками, известно как обратный эффект Варбурга [64].

Возможность использования опухолевыми клетками разнообразных углеродных соединений также свидетельствует о метаболической гетерогенности опухолей с одинаковыми клиническими признаками.

Еще одним фактором метаболической гетерогенности опухоли считается присутствие ОСК, метаболический статус которых отличается от основной клеточной популяции. При этом неоднозначные результаты получены при изучении метаболического фенотипа ОСК: в зависимости от типа опухоли эти клетки могут быть как гликоли-

тическими, так и окислительными [35]. Первоначально предполагалось, что ОСК, как мультипотентные стволовые клетки, должны иметь преимущественно гликолитический метаболизм. Это показано на клетках рака молочной железы *in vitro* и опухолях у мышей [65], рака носоглотки *in vitro* [66], гепатоцеллюлярной карциномы *in vitro* и соответствующих модельных опухолях [67]. Однако впоследствии установили, что при других разновидностях рака АТР продуцируется в ОСК предпочтительно путем окислительного фосфорилирования. В частности, это наблюдали в экспериментах на *in vitro* и *in vivo* моделях рака легкого [68], глиобластомы [69], аденокарциномы протоков поджелудочной железы [35]. Показано [70], что повышенная активность митохондрий в ОСК глиобластомы приводит к повышению активности окислительного фосфорилирования, служащего источником активных форм кислорода. В результате развивается окислительный стресс, который способствует возникновению мутаций и геномной нестабильности, что в конечном итоге приводит к клональной гетерогенности. Напротив, опухолевые клетки, не обладающие свойством стволовости, используют для получения АТР аэробный гликолиз, что способствует их пролиферации.

Таким образом, существует широкий спектр различных факторов и механизмов, обуславливающих гетерогенность метаболизма опухолей. Неоднородный молекулярно-генетический профиль самих опухолевых клеток и их способность к переключению биохимических процессов и адаптации метаболизма в условиях изменчивого и неблагоприятного микроокружения приводят к преобладанию разных метаболических путей в разных участках одной опухоли и в разных опухолях одного типа. Метаболическая гетерогенность, как одно из фенотипических проявлений опухолевой гетерогенности, представляет проблему для оптимизации лечения онкологических больных [71], а также значительно затрудняет процесс диагностики [72].

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА И МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ОПУХОЛЕЙ

Современная фундаментальная и клиническая онкология располагает рядом методов исследования метаболизма опухолей, в том числе на уровне целых опухолей и на клеточном уровне. Методы первой группы больше применимы для установления межопухолевых отличий или отличий между первичными очагами и метастазами; вторая группа включает методы регистрации внутриопухолевых вариаций клеточного метаболизма. Рассмотрим их подробнее.

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ)

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) — метод молекулярной визуализации, широко используемый для диагностики онкологических заболеваний и оценки эффективности противоопухолевой терапии. Этот метод предполагает использование радиофармпрепаратов — химических соединений, меченных позитрон-излучающими радионуклидами, такими как ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N и др. Накопление этих соединений в определенных морфологических структурах отражает обменные процессы [73]. Наиболее широко используемым радиофармпрепаратом является ^{18}F -фтордезоксиглюкоза (^{18}F -ФДГ). ^{18}F -ФДГ поступает в клетку через транспортеры глюкозы (GLUT), затем фосфорилируется гексокиназой с образованием ^{18}F -ФДГ-6-фосфата, который далее не метаболизируется и служит радиоактивным маркером. С помощью ПЭТ с ^{18}F -ФДГ оценивают потребность опухолевых клеток в глюкозе. Более интенсивное накопление ^{18}F -ФДГ характерно для опухолей или отдельных зон опухолей с гликолитическим метаболизмом. Определяемая с помощью ^{18}F -ФДГ высокая скорость гликолиза в опухоли рассматривается как неблагоприятный прогностический признак [74]. Результаты исследований с помощью ПЭТ показывают, что накопление ^{18}F -ФДГ зависит от микроокружения опухоли: более интенсивное накопление ^{18}F -ФДГ наблюдается в гликолитических клетках в областях гипоксии, в то время как в окислительных клетках, располагающихся в участках опухоли с хорошей перфузией, оно незначительно [75–78]. Накопление ^{18}F -ФДГ значительно варьирует в опухолях разного типа, разного объема и степени злокачественности. В настоящее время ^{18}F -ФДГ применяется для диагностики широкого спектра опухолей, в том числе рака молочной железы, легких, пищевода, поджелудочной железы, колоректального рака, лимфом, опухолей головы и шеи и др.

В контексте метаболической визуализации применение ПЭТ не ограничивается анализом углеводного обмена. В качестве радиофармпрепаратов используют также меченые аминокислоты: глутамин (^{18}F -FGln, ^{18}F -FSPG), тирозин (2-FTyr, ^{18}F -FAMT, ^{18}F -FET), метионин (^{11}C -MET), фенилаланин (^{18}F -FDOPA, ^{18}F -OMFD) [79–82]. Аминокислоты необходимы для биосинтеза белков, они также служат энергетическими субстратами и предшественниками других соединений (пуриновых и пиримидиновых оснований, биогенных аминов, гормонов, триацилглицеринов, холестерина и др.). Повышенное поглощение аминокислот опухолевыми клетками и меньшее их накопление в нормальной ткани и в зоне воспаления позволяют эффективно контрастировать некоторые типы

опухолей, в частности, глиомы, нейроэндокринные опухоли, рак молочной железы и др. [83].

*Магнитно-резонансная томография
и спектроскопия (МРТ, МРС)*

Методы МРТ/МРС на основе ядерного магнитного резонанса основаны на количественной оценке изменений ядерного спина в ответ на сильное внешнее магнитное поле. Эти методы позволяют оценивать биохимические изменения в опухолях по концентрации определенных метаболитов, содержащих изотопы [84, 85]. Для визуализации метаболизма с помощью МРТ/МРС используют изотопы ^1H , ^{13}C и ^{31}P . Сигнал ^1H позволяет обнаружить такие метаболиты, как лактат, холин, *N*-ацетиласпартат, аланин, глутамин/глутамат, цитрат, фосфохолин, *D*-инозит и др. Так, например, в глиобластомах наблюдается снижение содержания *N*-ацетиласпартата (маркер целостности нервных клеток), повышение содержания холина (компонент клеточной мембраны), что обусловлено пролиферацией клеток, и лактата (маркер гликолиза) в гипоксических участках опухоли [86]. Однако протонная МРТ/МРС сопряжена с техническими трудностями в связи с высоким содержанием воды в тканях.

МРТ/МРС с фосфором (^{31}P) позволяет идентифицировать такие метаболиты, как АТР, АДР, фосфокреатин, неорганический фосфат, фосфоэфиры, фосфаты сахаров, и имеет огромный потенциал в изучении биохимических особенностей опухолевого роста. ^{31}P -содержащие метаболиты играют большую роль в энергетическом метаболизме и липидном обмене. Наиболее интенсивно изучают возможности ^{31}P -МРС в нейроонкологии. Показано, что ^{31}P -МРС позволяет оценить метаболические характеристики глиомы и метастазов [87]. Однако достаточно слабый сигнал ^{31}P , длительность процедуры сканирования, сложность постобработки и интерпретации МР-спектров ограничивают широкое применение этого метода в клинике, а высокая гетерогенность опухолей и значительные вариации в энергетических потребностях тканей мозга привносят дополнительные сложности.

Для проведения МРС с гиперполяризованным углеродом ^{13}C требуются контрастные вещества, обогащенные этим изотопом. Поскольку углерод составляет основу многих эндогенных метаболитов, ^{13}C -МРС дает возможность неинвазивно проследить многие метаболические реакции. В качестве контрастных агентов для ^{13}C -МРС чаще всего применяют ^{13}C -меченые пируват или глюкозу. ^{13}C -пируват в процессе гликолиза превращается в лактат или вступает в цикл Кребса с образованием ацетил-КоА и далее окисляется до CO_2 . В ходе карбоангидразной реакции CO_2 пре-

вращается в ^{13}C -бикарбонат, который также можно обнаружить с помощью МРС. Ряд исследований на модельных опухолях у животных и опухолях пациентов показывает возможность детекции меж- и внутриопухолевой гетерогенности метаболизма по соотношению сигналов лактата и пирувата, что не всегда удается зарегистрировать с помощью ^{18}F -ФДГ-ПЭТ. Так, на примере глиобластомы показано повышенное образование лактата из ^{13}C -глюкозы, что согласуется с эффектом Варбурга, в то время как снижение образования лактата в инфильтративной зоне опухоли свидетельствует о меньшей интенсивности гликолиза [88]. В опухолях молочной железы отмечены значительные колебания соотношения сигнала лактат/пируват в разных молекулярных подтипах опухоли, причем более высокие уровни обмена ^{13}C наблюдались в более агрессивных опухолях, что коррелировало с экспрессией МСТ-1 и гипоксией [89]. Более высоким соотношением пируват/лактат было в высокодифференцированных опухолях (почечноклеточный рак), чем в низкодифференцированных [90], при этом гипоксические участки опухоли, характеризующиеся высоким уровнем метаболической активности, давали высокий сигнал ^{13}C -лактата и низкий сигнал ^{13}C -пирувата.

ОМИКС-технологии

Современные омиксные технологии, такие как геномика, транскриптомика, метаболомика, предоставляют обширную информацию о различных классах биомолекул, входящих в состав клеток и тканей. Для этого используют методы секвенирования нуклеиновых кислот, масс-спектрометрии и др., а гигантский объем получаемой информации обрабатывается и анализируется с помощью биоинформатических технологий. Геномика, анализирующая нуклеотидные последовательности ДНК, дает информацию о генетической нестабильности и мутациях, а также о разнообразных модификациях генома. Транскриптомика изучает экспрессию генов; протеомика — состав и структурно-функциональные свойства молекул белков; метаболомика — различные группы эндогенных метаболитов, включая углеводы, липиды, пептиды, органические кислоты и др. В настоящее время на первое место выходит концепция мультиомиксного подхода, означающего использование разных омикс-технологий для установления взаимосвязей генетических изменений с экспрессией генов, связанных с метаболизмом и особенностями метаболических процессов в клетке [91, 92]. Подобные исследования выявляют корреляции между активностью определенных метаболических генов и уровнем отдельных метаболитов в опухолях, идентифицируют метаболические про-

граммы в опухолях с различным молекулярно-генетическим профилем и изменения, индуцированные каким-либо воздействием. Таким образом, эти методы позволяют получить “глобальные” представления об опухолевом метаболизме.

Нужно понимать, что тотальное РНК-секвенирование дает усредненную картину для некоего образца клеточной суспензии, например, для выделенной из опухоли субпопуляции клеток. В случае высокогетерогенных опухолей такой анализ оказывается малоинформативным и дорогостоящим, поскольку необходимо использовать большое число проб. Задача изучения внутриопухолевой гетерогенности метаболизма отчасти решается с помощью технологий секвенирования одиночных клеток (single-cell sequencing), которые позволяют получать информацию о геноме и транскриптоме небольшого числа выделенных клеток [93, 94]. Так, на образцах рака молочной железы Yu и соавт. показали межопухолевую метаболическую гетерогенность на геномном, транскриптомном и метаболомном уровнях. Они выделили два основных метаболических фенотипа опухолей: один зависел преимущественно от гликолиза и пентозофосфатного пути и ассоциировался с низкой выживаемостью, второй — от окисления жирных кислот и глутаминолиза. Первый фенотип был более характерен для HER2-положительного и базальноподобного рака, второй — для люминального А подтипа рака молочной железы. В люминальном Б подтипе одинаково часто встречались оба метаболических фенотипа [95]. Xiao и соавт. проанализировали профили экспрессии “метаболических” генов в отдельных клетках меланомы и плоскоклеточного рака головы и шеи и обнаружили, что активность и пластичность метаболических путей в опухолевых клетках более выражены, чем в стромальных, а основной вклад в метаболическую гетерогенность вносят различия в активности митохондрий [96]. При этом уровни гликолиза и окислительного фосфорилирования на клеточном уровне коррелировали с активностью генов, вовлеченных в ответ на гипоксию. Сообщается также, что активность окислительного фосфорилирования и гликолиза в клетках рака желудка выше, чем в нормальных клетках, и коррелирует с гипоксией на клеточном уровне. Интересно, что в нормальной ткани, окружающей опухоль, повышена активность большего числа метаболических путей, чем в опухоли [97].

Более сложные транскриптомные технологии на основе секвенирования одиночных клеток, такие как Visium ST, Slide-seq, Stereo-seq, предоставляют также и пространственную информацию с разрешением, близким к клеточному, и позволяют визуализировать разные кластеры клеток в опухоли, исходя из профилей пространственной экспрессии генов [98]. С точки зрения опухолевой гетерогенности крайне интересна

пространственная транскриптомика, которая все чаще применяется в онкологических исследованиях. Например, с использованием метода Stereo-seq охарактеризовано микроокружение внутрипеченочной холангиокарциномы [99]. В зоне опухолевой инвазии шириной 500 мкм идентифицировано большое содержание иммунных клеток, иммуносупрессивное микроокружение и метаболическое перепрограммирование опухолевых клеток. Lv и соавт. получена транскриптомная карта инвазивного микропапиллярного рака молочной железы. Оказалось, что опухолевые клетки обладают значительной гетерогенностью, связанной с перепрограммированием метаболизма липидов. Предложен новый прогностический маркер — ген *SREBF1*, кодирующий ключевой транскрипционный фактор, регулирующий *de novo* синтез длинноцепочечных жирных кислот, повышенная экспрессия которого коррелировала с наличием метастазов и плохим прогнозом [100]. С помощью пространственной транскриптомики Wu и соавт. изучен иммунный профиль метастазов колоректального рака в печень и показано, что опухоль-ассоциированные MRC1+ CCL18+ M2-подобные макрофаги имеют наиболее высокую (из всех миелоидных клеток) метаболическую активность, которая снижается при применении эффективной неoadъювантной химиотерапии [101].

Таким образом, омиксные технологии — это мощнейший и неотъемлемый инструмент современных онкологических исследований, в том числе касающихся опухолевого метаболизма. Широкое их внедрение ограничено лишь высокой стоимостью анализа.

Биохимические и физико-химические методы

Биохимические исследования метаболизма проводят на разном уровне — на молекулярном, на уровне отдельных органелл, клеток, тканей. Часто они предполагают оценку функционального состояния митохондрий. Состояние митохондрий определяют с помощью таких традиционных методов, как оценка дыхательной активности путем измерения потребления кислорода, митохондриального мембранного потенциала, экспрессии, концентрации и активности ферментных комплексов и отдельных ферментов, которые контролируют биоэнергетическую функцию. Другими параметрами при оценке метаболизма являются значение pH во внеклеточной среде или внутри клеток, продукция активных форм кислорода, поглощение глюкозы, продукция лактата и АТФ, соотношение $NAD^+/NADH$, определение редокс-потенциала и др. На рынке представлено большое количество наборов для определения различных аналитов в биологических средах и клеточных культурах с помощью колориметрических и люминесцентных методов,

а также приборов-анализаторов клеточного метаболизма для комплексной оценки сразу нескольких показателей (например, системы Seahorse компании “Agilent”, Vi-CELL MetaFLEX от “Beckman Counter”) [101–103].

Ввиду простоты и доступности, эти методики широко используются в экспериментальных исследованиях, но они применимы только в условиях *in vitro* — на выделенной митохондриальной фракции или культуре клеток, реже на тканевых срезах, что ограничивает их распространение [104–111]. Интерпретация таких данных, учитывающая нарушения целостности ткани и оценку метаболических показателей клеток вне организма, требует осторожности, а сами методы мало пригодны для изучения метаболической гетерогенности.

Особую группу инструментов для изучения метаболизма представляют химические и генетически кодируемые сенсоры, которые подходят как для *in vitro* задач, так и для неинвазивного наблюдения изучаемого параметра в опухолях животных *in vivo* с помощью оптического (флуоресцентного, фосфоресцентного или биолюминесцентного) биоимиджинга [112, 113]. Ряд исследований, включая работы нашего коллектива, показывает возможность *in vivo* визуализации с помощью соответствующих сенсоров некоторых параметров, связанных с метаболизмом, например, уровня кислорода, pH цитозоля, поглощения глюкозы [114–118]. Однако сложности, связанные с доставкой сенсоров в опухоль, с количественной оценкой и калибровкой сигнала, низким разрешением оптических изображений в случае имиджинга в макромасштабе, затрудняют изучение гетерогенности опухолей с использованием этих методов.

Иммуногистохимия

Иммуногистохимическим методом (ИГХ) определяют экспрессию клеточного или тканевого компонента (антигена) в гистологических срезах с помощью специфических антител [119]. С помощью иммуногистохимического окрашивания можно выявлять различные белки-маркеры метаболизма опухолей: транспортеры глюкозы (GLUT), лактатдегидрогеназу (LDH), изоцитратдегидрогеназу (IDH), индуцируемые гипоксией факторы (HIF), монокарбоксилатные переносчики (MCT), карбоангидразы (CA) и др.

Из них ИГХ IDH рутинно используется в клинической диагностике глиальных опухолей мозга. Наличие мутации *IDH* (*IDH1mut*) в глиомах высокой степени злокачественности считается благоприятным прогностическим фактором. Фермент IDH катализирует превращение изоцитрата в α -кетоглутарат, а мутация в соответствующем гене приводит к нарушению ферментативной активности

и образованию из α -кетоглутарата 2-гидроксиглутарата, который является онкометаболитом. Помимо изменения эпигенетического профиля клеток, мутация в гене *IDH* индуцирует множество метаболических перестроек. Опухоли с мутантным геном *IDH* метаболически менее активны, имеют низкий уровень АТФ, сниженный метаболизм глутамина, в них нарушен биосинтез жирных кислот [120]. Опухоли с *IDH* дикого типа характеризуются более высоким уровнем поглощения глюкозы и образования лактата, повышенным уровнем глутамата [121].

ИГХ позволяет выявлять пространственную неоднородность экспрессии различных метаболических маркеров опухолей и изменение уровня экспрессии по мере роста опухоли. Так, например, изучение экспрессии транспортера глюкозы GLUT1 и переносчика глутамина SLC1A5 в опухолях пациентов методом ИГХ [122] привело к обнаружению различий в метаболизме глюкозы и глутамина в аденокарциноме и плоскоклеточном раке легкого. С помощью ИГХ-анализа экспрессии MCT-1 и MCT-4 в клетках плоскоклеточного рака шейки матки показано увеличение экспрессии MCT-4 по мере прогрессирования злокачественного новообразования [123]. Возможность использования ИГХ для оценки внутриопухолевой метаболической гетерогенности показана также на примере лимфом [124, 125]. Исследуемые образцы окрашивали на три метаболических маркера: MCT-4 — маркер гликолиза, MCT-1 и TOMM20 — маркеры окислительного метаболизма, и обнаружили метаболический симбиоз между окислительными опухолевыми клетками (экспрессируют MCT-1 и TOMM20) и гликолитическими стромальными клетками (MCT-4).

Хотя метод ИГХ получил широкое применение в диагностической практике в качестве дополнения к стандартному морфологическому исследованию, для оценки метаболических маркеров в опухолях (за исключением IDH) он используется редко и в сугубо научных задачах. Причины тому — длительность и высокая стоимость анализа, низкая информативность, субъективность и ограниченная способность количественной оценки уровня белка, отсутствие стандартов окрашивания.

Оптический метаболический имиджинг и FLIM

Метаболический статус клеток и тканей можно визуализировать также с помощью оптических методов — флуоресцентной микроскопии и макроимиджинга с временным разрешением (FLIM) [126, 127]. Этот подход основан на регистрации автофлуоресценции эндогенных кофакторов из классов пиридинов (NADH и NADPH, суммарно обозначаемые как NAD(P)H) и флавинов (FAD и FMN), участвующих в качестве переносчиков

электронов в различных биохимических реакциях, прежде всего в энергетическом обмене. Из метаболических кофакторов в опухолевых клетках наиболее представлены NADH и FAD. К достоинствам оптического метаболического имиджинга относятся неинвазивность, возможность проведения исследования на живых клетках без применения экзогенных красителей в динамике, быстрое получение информации о метаболическом статусе. Благодаря этому методы оптического метаболического имиджинга получают все большее признание.

Метаболизм оценивают либо по соотношению интенсивностей флуоресценции NAD(P)H и флавинов или редокс-отношения, либо путем анализа времени жизни их флуоресценции. Принцип оценки редокс-состояния митохондрий по интенсивности флуоресценции NAD(P)H и флавопротеинов предложен американским биохимиком и биофизиком Бриттоном Чансом (Britton Chance) в 1960-х гг. и используется до сих пор [128]. Оптическое редокс-отношение фактически является аналогом традиционного отношения $NAD^+/NADH$ — индикатора окислительно-восстановительного статуса. Так как NADH ассоциирован с гликолизом, а флавиновые кофакторы — с окислительным метаболизмом, изменение баланса между этими процессами будет приводить к изменению редокс-отношения. В типичном случае в гликолитических клетках редокс-отношение NAD(P)H/FAD выше, чем в клетках с окислительным метаболизмом [129]. Стоит, однако, отметить, что основанное на интенсивности флуоресценции редокс-отношение применяется в монослойных клеточных культурах, тогда как его измерение в многоклеточных структурах и тканях проблематично из-за артефактов, связанных с рассеянием света и архитектурой клеток.

Время жизни флуоресценции кофакторов зависит от состояния, в котором они находятся. NADH присутствует в клетке в двух формах: свободной, которая локализуется в цитозоле и ассоциирована с гликолизом, и связанной с белками, ассоциированной с митохондриальным дыханием [130, 131]. Время жизни свободной формы NADH составляет ~0.4 нс, связанной ~1.7–3.0 нс в зависимости от связывающих ферментов. Фосфорилированная форма NADH — NADPH, характеризуется более длинным временем жизни ~4.4 нс, но содержание этой формы в опухолевых клетках значительно ниже, чем NADH, и в обычных условиях недостаточно для регистрации оптическим методом [132]. Флавиновые кофакторы FAD и FMN связаны с ферментами митохондрий — флавопротеинами, большинство из которых тушит их флуоресценцию, что приводит к уменьшению времени жизни. Так что большая часть кофактора FAD имеет короткое время жизни ~0.4 нс, а меньшая фракция ~2.5 нс. Время жизни флуорес-

ценции FMN гораздо длиннее (~7.0 нс). Вероятность тушения определяется конформацией кофактора в составе белкового комплекса (закрытая с коротким временем жизни или открытая — с длинным). Поскольку разные формы кофакторов вовлечены в разные метаболические пути клетки, метод FLIM позволяет регистрировать относительные изменения метаболического профиля. Так, клетки с гликолитическим метаболизмом характеризуются более высоким вкладом свободного NAD(P)H и закрытого FAD в затухание флуоресценции, чем клетки с окислительным метаболизмом [133]. К настоящему времени интерпретация данных FLIM NAD(P)H более понятна и доказательна, тогда как результаты FLIM флавинов не всегда однозначны. Необходимо учитывать вклад FMN и участие FAD в других процессах, помимо энергетического метаболизма.

К преимуществам определения времени жизни перед измерением интенсивности флуоресценции относится независимость от концентрации флуорофора, конфигурации системы детекции сигнала, геометрии объекта, что позволяет исследовать как клеточные культуры, так и ткани, включая опухоли *in vivo* [134].

Целый ряд исследований, включая работы нашей группы, показывает возможности FLIM для наблюдения внутри- и межопухолевой гетерогенности метаболизма, а также метаболических переключений при изменении условий микроокружения или при терапевтических воздействиях. Так, Druzhkova и соавт. культивировали совместно клетки HeLa рака шейки матки и фибробласты человека и наблюдали с помощью FLIM NAD(P)H и FAD сдвиг метаболизма опухолевых клеток в сторону гликолиза, а фибробластов — в сторону окислительного фосфорилирования [135]. Ожидаемый переход на более гликолитический тип метаболизма зарегистрирован с помощью FLIM NAD(P)H в монослойной культуре опухолевых клеток и в многоклеточных сфероидах при моделировании гипоксии [116]. Сами опухолевые сфероиды могут быть метаболически гетерогенными [136, 137]: параметры затухания флуоресценции NAD(P)H клеток наружной пролиферирующей зоны сфероида указывают на сдвиг их метаболизма в сторону гликолиза по сравнению с покоящимися клетками внутри сфероида.

В недавнем исследовании мы сравнили оптические метаболические показатели “библиотечных” линий колоректального рака, полученных из них опухолевых ксенографтов и операционных образцов колоректальных опухолей пациентов (рис. 2). Путем поклеточного анализа микроскопических FLIM-изображений установлено, что вариабельность времени жизни флуоресценции NAD(P)H в опухолях человека значительно выше, чем в клеточных линиях и опухолях мышей.

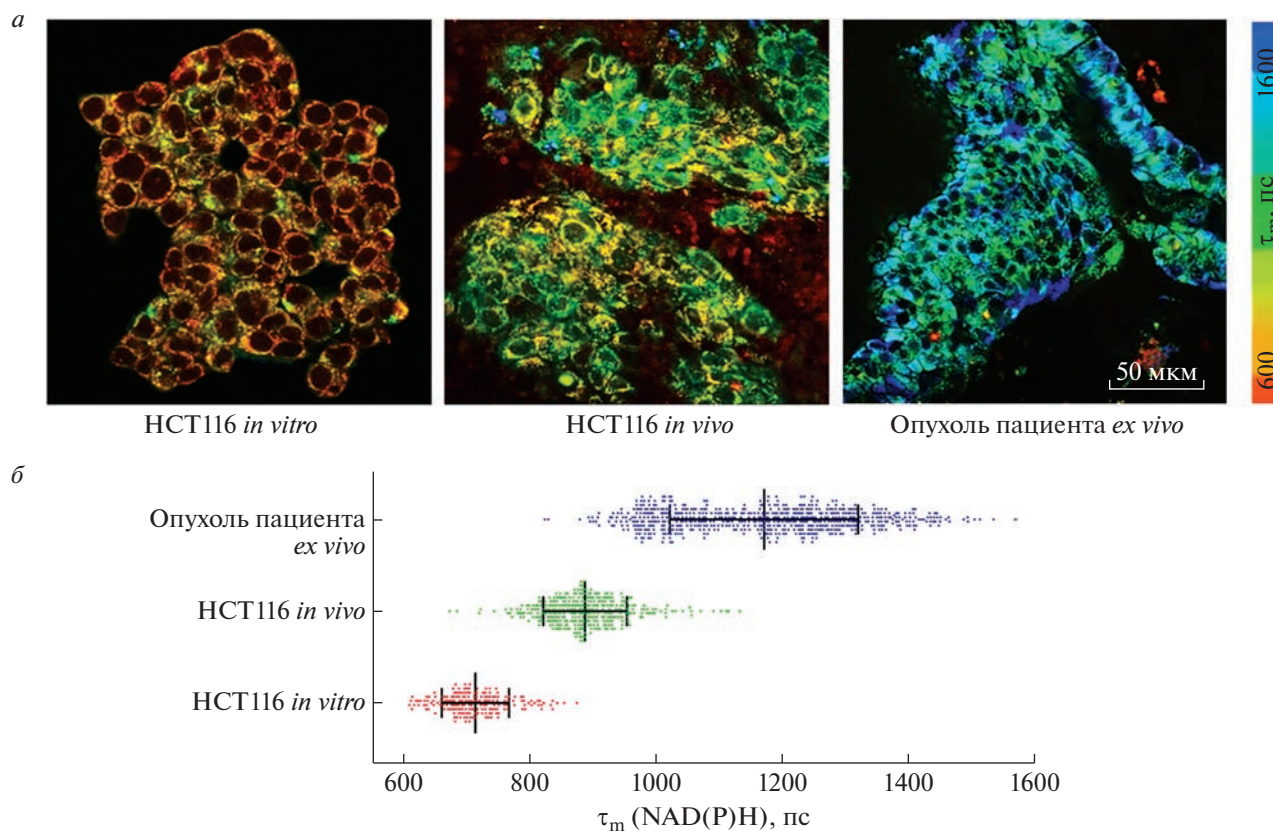


Рис. 2. FLIM-микроскопия кофактора NAD(P)H в опухолевых клетках и тканях. *a* — Репрезентативные изображения клеточной культуры колоректального рака HCT116, опухоли HCT116 у мыши *in vivo* и образца колоректальной опухоли, полученного от пациента. Размер изображений 256×256 мкм. *б* — Диаграммы распределения среднего времени жизни флуоресценции (τ_m) в отдельных клетках, среднее значение и стандартное отклонение. Возбуждение: 750 нм, прием сигнала: 450–490 нм.

Ранее была обнаружена метаболическая гетерогенность клеток первичных опухолевых культур, полученных из образцов опухолей, что отличало их от генетически и фенотипически однородных клеточных линий [138]. Интересно, что метаболическая неоднородность присуща и опухолевым ксенографтам, полученным из одной и той же опухоли, что проявляется в виде межопухолевых различий [139]. Эти наблюдения позволяют заключить, что метаболическая гетерогенность опухолей в значительной степени детерминирована свойствами самих опухолевых клеток, т.е. внутренними, (эпи)генетическими факторами.

Внутриопухолевая гетерогенность может быть причиной низкой эффективности лечения или может развиваться в результате лечения и способствовать приобретению резистентности, поэтому большое внимание уделяется изучению гетерогенности при лекарственных воздействиях. С помощью FLIM показан гетерогенный метаболический ответ линий клеток колоректального рака HCT116 на воздействие 5-фторурацила [138], рака молочной железы PyVmT — паклитаксела [140] и

опухолевых органоидов плоскоклеточного рака гортани на воздействие цетуксимаба и цисплатина [71]. На органоидах из протоковой аденокарциномы поджелудочной железы пациентов выявлена внутриопухолевая гетерогенность ответа на терапию рядом противоопухолевых препаратов (гемцитабин, ингибиторы JAK2, MEK, PI3K и их комбинация) [141]. На примере органоидов из ксенотрансплантатов рака молочной железы показана межопухолевая гетерогенность ответа на терапию паклитакселом и тамоксифеном [142]. В работе Sharick и соавт., выполненной на пациент-специфичных органоидах рака молочной железы и рака поджелудочной железы, развитие метаболической гетерогенности при химиотерапии коррелировало с неблагоприятным клиническим исходом [143].

В некоторых работах показана связь исходной клеточной метаболической гетерогенности со слабым ответом на противоопухолевую терапию. Так, например, Shirshin и соавт. показано, что гетерогенные первичные культуры опухолевых клеток не отвечали на воздействие 5-фторурацила в

Таблица 1. Методы исследования метаболизма опухолей и их возможности в оценке метаболической гетерогенности

Метод	Принцип метода	Особенности метода	Уровень исследования	Возможность анализа метаболической гетерогенности (межопухолевой/внутриопухолевой)	Область приложения
ПЭТ	Регистрация излучения позитронов от радионуклидов	Использование меченой глюкозы или аминокислот, оценка их накопления и распределения в опухоли	Организм, целая опухоль	+/ $\pm$ (возможна визуализация зон внутри опухоли с низким разрешением)	Клиническая диагностика
МРТ, МРС	Измерение электромагнитного отклика атомных ядер в сильном магнитном поле	Регистрация сигнала эндогенных (^1H , ^{31}P) или экзогенно введенных (^{13}C) изотопов, широкая панель анализируемых метаболитов	Организм, целая опухоль	+/ $\pm$ (возможна визуализация зон внутри опухоли с низким разрешением)	Клиническая диагностика
ОМИКС	Высокоинформативный геномный, транскриптомный, метаболомный, протеомный или липидомный анализ	Полное генетическое и молекулярное профилирование клеток, большой массив данных, анализ методами биоинформатики	Генетический, молекулярный	+/ $\pm$ (возможен методами секвенирования ДНК и РНК одиночных клеток)	Научные исследования
ИГХ	Определение антигенов в гистологических срезах с помощью специфических меченых антител и световой или флуоресцентной микроскопии	Выявление экспрессии белков-маркеров метаболизма (ферментов, сигнальных молекул и др.)	Тканевой	+/ $+$	Клиническая диагностика
Биохимический анализ	Определение различных аналитов с помощью колориметрических и люминесцентных методов	Оценка дыхания клеток, активности ферментов, определение отдельных метаболитов	Молекулярный, функциональный	—/—	Научные исследования
FLIM	Получение флуоресцентных микроскопических или макро-изображений, определение времени затухания флуоресценции	Анализ автофлуоресценции метаболитов, кофакторов NAD(P)H и FAD, оценка редокс-статуса и относительных изменений в метаболитических путях	Целая опухоль или ее часть, клеточный	+/ $+$	Научные исследования

отличие от метаболически однородных популяций [138]. Метаболическая гетерогенность органоидов из нейроэндокринных опухолей пациентов также была признаком устойчивости к различным препаратам [144]. Эти исследования показывают, что метаболическая гетерогенность на клеточном уровне может иметь прогностическое значение.

Обобщающая характеристика методов исследования опухолевого метаболизма представлена в табл. 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день метаболическая гетерогенность опухолей является общепризнанным, но малоизученным феноменом. Существует множество теорий о причинах метаболической гетерогенности опухолей, связывающих ее с генетическими факторами, эпигенетическим контролем, особенностями микроокружения, наличием ОСК, степенью дифференцировки опухолевых клеток и их пролиферативной активностью и так далее. При этом имеет место метаболическая пла-

стичность, т.е. обратимое переключение различных метаболических путей (например, аэробного гликолиза на окислительное фосфорилирование и наоборот). Поскольку метаболические перестройки сопутствуют всем проявлениям опухолевой прогрессии и ответу на терапию, межопухолевые и внутриопухолевые метаболические отличия создают серьезные сложности при лечении.

Оценка опухолевого метаболизма или отдельных метаболических маркеров, например, с помощью ПЭТ с ^{18}F -ФДГ, МРС, ИГХ на IDH1/2 давно используется для диагностики и прогнозирования заболевания, а в некоторых случаях — для мониторинга эффективности лечения. Так что межопухолевые отличия и изменения метаболизма опухоли при ответе на терапию хорошо задокументированы.

Внутриопухолевая метаболическая гетерогенность в отличие от межопухолевой, гораздо менее исследована. Отчасти это связано с отсутствием до недавнего времени высокочувствительных и доступных методов ее наблюдения и количественной оценки на клеточном уровне. Развитие методов ДНК- и РНК-секвенирования одиночных клеток значительно расширило представления о внутриопухолевой гетерогенности в целом и ее метаболических аспектах. Перспективным современным методом метаболической визуализации является FLIM автофлуоресценции клеток и тканей, который уже зарекомендовал себя для наблюдения клеточной метаболической гетерогенности в опухолях. Отсутствие пробоподготовки и необходимости в дополнительной окраске ткани, высокое пространственное разрешение и молекулярная специфичность, быстрота получения данных делают этот метод привлекательным не только для фундаментальных исследований, но и для внедрения в клинику.

Можно ожидать, что дальнейшие исследования опухолевого метаболизма позволят сформулировать новые прогностические критерии на основе оценки клеточной гетерогенности.

Авторы благодарят сотрудников НИИ ЭО и БМТ ПИМУ И.Н. Дружкову, А.М. Можерова, В.И. Щеславского за помощь в экспериментах и полезные обсуждения, врача-онколога НОКОД В.М. Терехова за предоставление клинического материала.

Работа поддержана Российским научным фондом (соглашение № 22-64-00057).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Viale A., Corti D., Draetta G.F. (2015) Tumors and mitochondrial respiration: a neglected connection. *Cancer Res.* **75**, 3687.
2. Bensinger S.J., Christofk H.R. (2012) New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 352–361.
3. Solaini G., Sgarbi G., Baracca A. (2011) Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenerg.* **1807**, 534–542.
4. Cluntun A.A., Lukey M.J., Cerione R.A., Locasale J.W. (2017) Glutamine metabolism in cancer: understanding the heterogeneity. *Trends Cancer.* **3**, 169–180.
5. Cao Y. (2019) Adipocyte and lipid metabolism in cancer drug resistance. *J. Clin. Invest.* **129**, 3006–3017.
6. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. (2013) Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение. *Биохимия.* **78**, 1531–1549.
7. Nassar A., Radhakrishnan A., Cabrero I.A., Cotsonis G.A., Cohen C. (2010) Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **18**, 433–441.
8. Somasundaram R., Villanueva J., Herlyn M. (2012) Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism. *Adv. Pharmacol.* **65**, 335–359.
9. Fisher R., Pusztai L., Swanton C. (2013) Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br. J. Cancer.* **108**, 479–585.
10. Prasetyanti P.R., Medema J.P. (2017) Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol. Cancer.* **16**, 41.
11. Marusyk A., Polyak K. (2010) Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Rev. Cancer.* **1805**, 105–117.
12. McGranahan N., Swanton C. (2017) Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell.* **168**, 613–628.
13. Allis C.D., Jenuwein T. (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 487–500.
14. Kim J., DeBerardinis R.J. (2019) Mechanisms and implications of metabolic heterogeneity in cancer. *Cell Metabolism.* **30**, 434–446.
15. Чехун В.Ф., Шербан С.Д., Савцова З.Д. (2012) Гетерогенность опухолей — динамичное состояние. *Онкология.* **14**, 4–12.
16. Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**, 646–674.
17. Clevers H. (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* **17**, 313–319.
18. Murata M. (2018) Inflammation and cancer. *Environ. Health Preventive Med.* **23**, 50.
19. Xiao Z., Dai Z., Locasale J.W. (2019) Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nat. Commun.* **10**, 3763.
20. Balkwill F., Mantovani A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* **357**, 539–545.

21. Korkaya H., Kim G.I., Davis A., Malik F., Henry N.L., Ithimakin S., Quraishi A.A., Tawakkol N., D'Angelo R., Paulson A.K., Chung S., Luther T., Pahlak H.J., Liu S., Hassan K.A., Zen Q., Clouthier S.G., Wicha M.S. (2012) Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2⁺ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol. Cell.* **47**, 570–584.
22. Бросалов В.М., Судапина А.Р., Микуляк Н.И. (2020) Клональная эволюция рака молочной железы: современные перспективы давней теории (обзор литературы). *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.* **2**, 109–119.
23. Michor F., Polyak K. (2010) The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prevention Res.* **3**, 1361–1364.
24. Warmoes M.O., Locasale J.W. (2014) Heterogeneity of glycolysis in cancers and therapeutic opportunities. *Biochem. Pharmacol.* **92**, 12–21.
25. Diaz-Ruiz R., Rigoulet M., Devin A. (2011) The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenergetics.* **1807**, 568–576.
26. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* **324**, 1029–1033.
27. Stern R., Shuster S., Neudecker B.A., Formby B. (2002) Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp. Cell Res.* **276**, 24–31.
28. Sonveaux P., Copetti T., De Saedeleer C.J., Végran F., Verrax J., Kennedy K.M., Moon E.J., Dhup S., Danhier P., Frérart F., Gallez B., Ribeiro A., Michiels C., Dewhirst M.W., Feron O. (2012) Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One.* **7**, e33418.
29. Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* **11**, 85–95.
30. Lunt S.Y., Vander Heiden M.G. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 441–464.
31. Cantor J.R., Sabatini D.M. (2012) Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov.* **2**, 881–898.
32. Smolková K., Bellance N., Scandurra F., Génot E., Gnaiger E., Plecítá-Hlavatá L., Ježek P., Rossignol R. (2010) Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia. *J. Bioenerg. Biomembr.* **42**, 55–67.
33. Pavlova N.N., Thompson C.B. (2016) The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabolism.* **23**, 27–47.
34. Sengupta D., Pratz G. (2016) Imaging metabolic heterogeneity in cancer. *Mol. Cancer.* **15**, 4.
35. Sancho P., Barneda D., Heeschen C. (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br. J. Cancer.* **114**, 1305–1312.
36. Ganapathy-Kanniappan S. (2018) Molecular intricacies of aerobic glycolysis in cancer: current insights into the classic metabolic phenotype. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **53**, 667–682.
37. Seth Nanda C., Venkateswaran S.V., Patani, N., Yuneva M. (2020) Defining a metabolic landscape of tumours: genome meets metabolism. *Br. J. Cancer.* **122**, 136–149.
38. Harami-Papp H., Pongor L.S., Munkacsy G., Horvath G., Nagy A.M., Ambrus A., Hauser P., Szabo A., Tretter L., Gyorffy, B. (2016) TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer. *Oncotarget.* **7**, 67183–67195.
39. Zhang X., Wang J., Zhuang J., Liu C., Gao C., Li H., Ma X., Li J., Sun C. (2021) A novel glycolysis-related four-mRNA signature for predicting the survival of patients with breast cancer. *Front. Genet.* **12**, 606937.
40. Farhadi P., Yarani R., Valipour E., Kiani S., Hoseinkhani Z., Mansouri K. (2022) Cell line-directed breast cancer research based on glucose metabolism status. *Biomed. Pharmacotherapy.* **146**, 112526.
41. The Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* **511**, 543–550.
42. Romero R., Sayin V.I., Davidson S.M., Bauer M.R., Singh S.X., LeBoeuf S.E., Karakousi T.R., Ellis D.C., Bhutkar A., Sánchez-Rivera F.J., Subbaraj L., Martinez B., Bronson R.T., Prigge J.R., Schmidt E.E., Thomas C.J., Goparaju C., Davies A., Dolgalev I., Heguy A., Allaj V., Poirier J.T., Moreira A.L., Rudin C.M., Pass H.I., Vander Heiden M.G., Jacks T., Papagiannakopoulos T. (2017) Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat. Med.* **23**, 1362–1368.
43. Yuneva M.O., Fan T.W., Allen T.D., Higashi R.M., Ferraris D.V., Tsukamoto T., Matés J.M., Alonso F.J., Wang C., Seo Y., Chen X., Bishop J.M. (2012) The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metabolism.* **15**, 157–170.
44. Patra S., Elahi N., Armorer A., Arunachalam S., Omala J., Hamid I., Ashton A.W., Joyce D., Jiao X., Pestell R.G. (2021) Mechanisms governing metabolic heterogeneity in breast cancer and other tumors. *Front. Oncol.* **11**, 700629.
45. Goel A., Mathupala S.P., Pedersen P.L. (2003) Glucose metabolism in cancer. *J. Biol. Chem.* **278**, 15333–15340.
46. Chen M., Zhang J., Li N., Qian Z., Zhu M., Li Q., Zheng J., Wang X., Shi G. (2011) Promoter hypermethylation mediated downregulation of FBP1 in human hepatocellular carcinoma and colon cancer. *PLoS One.* **6**, e25564.
47. Jose C., Bellance N., Rossignol R. (2011) Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenergetics.* **1807**, 552–561.
48. Hill R.P., De Jaeger K., Jang A., Cairns R. (2008) pH, hypoxia and metastasis. *Novartis Found. Symp.* **240**, 154–168.

49. Masson N., Ratcliffe P.J. (2014) Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab.* **2**, 3.
50. Muz B., de la Puente P., Azab F., Azab A.K. (2015) The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*. **3**, 83–92.
51. Kierans S.J., Taylor C.T. (2021) Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J. Physiol.* **599**, 23–37.
52. Korbecki J., Simińska D., Gąsowska-Dobrowolska M., Listos J., Gutowska I., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. (2021) Chronic and cycling hypoxia: drivers of cancer chronic inflammation through HIF-1 and NF-κB activation: a review of the molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10701.
53. Vogelstein B., Kinzler K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–799.
54. Wieman H.L., Wofford J.A., Rathmell J.C. (2007) Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *MBoC*. **18**, 1437–1446.
55. Wise D.R., DeBerardinis R.J., Mancuso A., Sayed N., Zhang X.Y., Pfeiffer H.K., Nissim I., Daikhin E., Yudkoff M., McMahon S.B., Thompson C.B. (2008) Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 18782–18787.
56. Gao P., Tchernyshyov I., Chang T.C., Lee Y.S., Kita K., Ochi T., Zeller K.I., De Marzo A.M., Van Eyk J.E., Mendell J.T., Dang C.V. (2009) c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. **458**, 762–765.
57. Reynolds M.R., Lane A.N., Robertson B., Kemp S., Liu Y., Hill B.G., Dean D.C., Clem B.F. (2014) Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene*. **33**, 556–566.
58. Méndez-Lucas A., Lin W., Driscoll P.C., Legrave N., Novellademunt L., Xie C., Charles M., Wilson Z., Jones N.P., Rayport S., Rodríguez-Justo M., Li V., MacRae J.I., Hay N., Chen X., Yuneva M. (2020) Identifying strategies to target the metabolic flexibility of tumours. *Nat. Metabolism*. **2**, 335–350.
59. Yoshida G.J. (2015) Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, 111.
60. Sonveaux P., Végran F., Schroeder T., Wergin M.C., Verrax J., Rabbani Z.N., De Saedeleer C.J., Kennedy K.M., Diepart C., Jordan B.F., Kelley M.J., Gallez B., Wahl M.L., Feron O., Dewhirst M.W. (2008) Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* **118**(12), 3930–3942.
61. Мещерякова О.В., Чурова М.В., Немова Н.Н. (2010) Митохондриальный лактат-окисляющий комплекс и его значение для поддержания энергетического гомеостаза клеток. *Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: сборник научных статей*. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 163–171.
62. Stine Z.E., Walton Z.E., Altman B.J., Hsieh A.L., Dang C.V. (2015) MYC, metabolism, and cancer. *Cancer Discov.* **5**, 1024–1039.
63. Gordan J.D., Thompson C.B., Simon M.C. (2007) HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. **12**, 108–113.
64. Pavlides S., Whitaker-Menezes D., Castello-Cros R., Flomenberg N., Witkiewicz A.K., Frank P.G., Casimiro M.C., Wang C., Fortina P., Addya S., Pestell R.G., Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P. (2009) The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*. **8**, 3984–4001.
65. Dong C., Yuan T., Wu Y., Wang Y., Fan T.W., Miriyala S., Lin Y., Yao J., Shi J., Kang T., Lorkiewicz P., St Clair D., Hung M.C., Evers B.M., Zhou B.P. (2013) Loss of FBP1 by snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell*. **23**, 316–331.
66. Shen Y.-A., Wang C.-Y., Hsieh Y.-T., Chen Y.-J., Wei Y.-H. (2015) Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Cycle*. **14**, 86–98.
67. Chen C.-L., Uthaya Kumar D.B., Punj V., Xu J., Sher L., Tahara S.M., Hess S., Machida K. (2016) Metabolically reprograms tumor-initiating stem-like cells through tumorigenic changes in oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism. *Cell Metabolism*. **23**, 206–219.
68. Ye X.-Q., Li Q., Wang G.-H., Sun F.-F., Huang G.-J., Bian X.-W., Yu S.-C., Qian G.-S. (2011) Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int. J. Cancer*. **129**, 820–831.
69. Janiszewska M., Suvà M.L., Riggi N., Houtkooper R.H., Auwerx J., Clément-Schatlo V., Radovanovic I., Rheinbay E., Provero P., Stamenkovic I. (2012) Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells. *Genes Dev.* **26**, 1926–1944.
70. Badr C.E., Silver D.J., Siebzehnruhl F.A., Deyle L.P. (2020) Metabolic heterogeneity and adaptability in brain tumors. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 5101–5119.
71. Shah A.T., Diggins K.E., Walsh A.J., Irish J.M., Skala M.C. (2015) *In vivo* autofluorescence imaging of tumor heterogeneity in response to treatment. *Neoplasia*. **17**, 862–870.
72. Haffner M.C., Zwart W., Roudier M.P., True L.D., Nelson W.G., Epstein J.I., De Marzo A.M., Nelson P.S., Yegnasubramanian S. (2021) Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **18**, 79–92.
73. Тлостанова М.С. (2014) Эффективность применения позитронной эмиссионной томографии с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой, ¹¹C-метионином и ⁸²Rb-хлоридом в дифференциальной диагностике опухолевых и некоторых воспалительных забо-

- леваний легких. *Современные технологии в медицине*. 6, 45–50.
74. Ивашенко И.М., Шнякин П.Г., Катаева А.А., Павлова И.С., Григорян К.В., Ширванян М.А. (2018) Возможность позитронно-эмиссионной томографии в диагностике злокачественных опухолей головного мозга (обзор литературы). *В мире научных открытий*. 10, 72–87.
 75. Shen B., Huang T., Sun Y., Jin Z., Li X.F. (2017) Revisit 18F-fluorodeoxyglucose oncology positron emission tomography: “systems molecular imaging” of glucose metabolism. *Oncotarget*. 8(26), 43536–43542.
 76. Yao Y., Li Y.-M., He Z.-X., Civelek A.C., Li X.-F. (2021) Likely common role of hypoxia in driving ¹⁸F-FDG uptake in cancer, myocardial ischemia, inflammation and infection. *Cancer Biother. Radiopharmaceut.* 36, 624–631.
 77. Kaira K., Shimizu K., Kitahara S., Yajima T., Atsumi J., Kosaka T., Ohtaki Y., Higuchi T., Oyama T., Asao T., Mogi A. (2018) 2-Deoxy-2-[fluorine-18] fluoro-*d*-glucose uptake on positron emission tomography is associated with programmed death ligand-1 expression in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer*. 101, 181–190.
 78. Li X.-F., Du Y., Ma Y., Postel G.C., Civelek A.C. (2014) 18F-fluorodeoxyglucose uptake and tumor hypoxia: revisit ¹⁸F-fluorodeoxyglucose in oncology application. *Transl. Oncol.* 7, 240–247.
 79. Skvortsova T.Yu., Savintceva Z.I., Zakhs D.V., Tyurin R.V., Gurchin A.F., Kholyavin A.I., Trofimova T.N. (2021) Comparison of amino acid radiotracers *L*-[methyl-¹¹C]methionine and *O*-2-[¹⁸F]fluoroethyl-*L*-tyrosine for PET/CT imaging of cerebral gliomas. *Diagnostic Radiol. Radiother.* 12, 49–58.
 80. Mittra E.S., Koglin N., Mosci C., Kumar M., Hoehne A., Keu K.V., Iagaru A. H., Mueller A., Berndt M., Bullich S., Friebe M., Schmitt-Willich H., Gekeler V., Fels L.M., Bacher-Stier C., Moon D.H., Chin F.T., Stephens A.W., Dinkelborg L.M., Gambhir S.S. (2016) Pilot preclinical and clinical evaluation of (4*S*)-4-(3-[¹⁸F]fluoropropyl)-*L*-glutamate (¹⁸F-FSPG) for PET/CT imaging of intracranial malignancies. *PLoS One*. 11, e0148628.
 81. Horiguchi K., Tosaka M., Higuchi T., Arisaka Y., Sugawara K., Hirato J., Yokoo H., Tsushima Y., Yoshimoto Y. (2017) Clinical value of fluorine-18α-methyltyrosine PET in patients with gliomas: comparison with fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET. *EJN-MMI Res.* 7, 50.
 82. Tepede A.A., Welch J., Lee M., Mandl A., Agarwal S.K., Nilubol N., Patel D., Cochran C., Simonds W.F., Weinstein L.S., Jha A., Millo C., Pacak K., Blau J.E. (2020) ¹⁸F-FDOPA PET/CT accurately identifies MEN1-associated pheochromocytoma. *Endocrinol. Diabetes Metab. Case Rep.* 2020, 19-0156.
 83. Crippa F., Alessi A., Serafini G.L. (2012) PET with radiolabeled aminoacid. *Quarterly J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 56, 151–162.
 84. Бакунович А.В., Сеницын В.Е., Мершина Е.А. (2014) Клиническое применение протонной магнитно-резонансной спектроскопии при опухолях головного мозга и прилежащих тканей. *Вестник рентгенологии и радиологии*. 1, 39–50.
 85. Gillies R.J., Morse D.L. (2005) *In vivo* magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7, 287–326.
 86. Nguyen M.L., Willows B., Khan R., Chi A., Kim L., Nour S.G., Sroka T., Kerr C., Godinez J., Mills M., Karlsson U., Altdorfer G., Nguyen N.P., Jendrsiak G. (2014) The potential role of magnetic resonance spectroscopy in image-guided radiotherapy. *Front. Oncol.* 4, 91.
 87. Peter S.B., Nandhan V.R. (2022) ³¹Phosphorus magnetic resonance spectroscopy in evaluation of glioma and metastases in 3T MRI. *Indian J. Radiol. Imaging*. 31, 873–881.
 88. Mishkovsky M., Gussyatiner O., Lanz B., Cudalbu C., Vassallo I., Hamou M.F., Bloch J., Comment A., Gruetter R., Hegi M.E. (2021) Hyperpolarized ¹³C-glucose magnetic resonance highlights reduced aerobic glycolysis *in vivo* in infiltrative glioblastoma. *Sci. Rep.* 11, 5771.
 89. Gallagher F.A., Woitek R., McLean M.A., Gill A.B., Manzano Garcia R., Provenzano E., Riemer F., Kaggie J., Chhabra A., Ursprung S., Grist J.T., Daniels C.J., Zaccagna F., Laurent M.C., Locke M., Hilborne S., Fray A., Torheim T., Boursnell C., Schiller A., Patterson I., Slough R., Carmo B., Kane J., Biggs H., Harrison E., Deen S.S., Patterson A., Lanz T., Kingsbury Z., Ross M., Basu B., Baird R., Lomas D.J., Sala E., Wason J., Rueda O.M., Chin S.F., Wilkinson I.B., Graves M.J., Abraham J.E., Gilbert F.J., Caldas C., Brindle K.M. (2020) Imaging breast cancer using hyperpolarized carbon-13 MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 117, 2092–2098.
 90. Tang S., Meng M.V., Slater J.B., Gordon J.W., Vigneron D.B., Stohr B.A., Larson P.E.Z., Wang Z.J. (2021) Metabolic imaging with hyperpolarized ¹³C pyruvate magnetic resonance imaging in patients with renal tumors – initial experience. *Cancer*. 127, 2693–2704.
 91. Nam A.S., Chaligne R., Landau D.A. (2021) Integrating genetic and non-genetic determinants of cancer evolution by single-cell multi-omics. *Nat. Rev. Genet.* 22, 3–18.
 92. Zeng D., Ye Z., Shen R., Yu G., Wu J., Xiong Y., Zhou R., Qiu W., Huang N., Sun L., Li X., Bin J., Liao Y., Shi M., Liao W. (2021) IOBR: multi-omics immuno-oncology biological research to decode tumor microenvironment and signatures. *Front. Immunol.* 12, 687975.
 93. Ding S., Chen X., Shen K. (2020) Single-cell RNA sequencing in breast cancer: understanding tumor heterogeneity and paving roads to individualized therapy. *Cancer Commun.* 40, 329–344.
 94. Lei Y., Tang R., Xu J., Wang W., Zhang B., Liu J., Yu X., Shi S. (2021) Applications of single-cell sequencing in cancer research: progress and perspectives. *J. Hematol. Oncol.* 14, 91.
 95. Yu T.J., Ma D., Liu Y.Y., Xiao Y., Gong Y., Jiang Y.Z., Shao Z.M., Hu X., Di G.H. (2021) Bulk and single-cell transcriptome profiling reveal the metabolic heterogeneity in human breast cancers. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy*. 29, 2350–2365.

96. Xiao Z., Dai Z., Locasale J.W. (2019) Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nat. Commun.*, **10**, 3763.
97. Kou W., Zhao N., Zhao L., Yin Z., Zhang M.C., Zhang L., Song J., Wang Y., Qiao C., Li H. (2022) Single-cell characterization revealed hypoxia-induced metabolic reprogramming of gastric cancer. *Heliyon*. **8**(11), e11866.
98. Yu Q., Jiang M., Wu L. (2022) Spatial transcriptomics technology in cancer research. *Front. Oncol.* **12**, 1019111.
99. Wu L., Yan J., Bai Y., Chen F., Xu J., Zou X., Huang A., Hou L., Zhong Y., Jing Z., Zhou X., Sun H., Cheng M., Ji Y., Luo R., Li Q., Wu L., Wang P., Guo D., Huang W., Lei J., Liao S., Li Y., Jiang Z., Yao N., Yu Y., Li Y., Liu F., Zhang M., Yang H., Yang S., Xu X., Liu L., Wang X., Wang J., Fan J., Liu S., Yang X., Chen A., Zhou J. (2021) Spatially-resolved transcriptomics analyses of invasive fronts in solid tumors. *bioRxiv*. **2021**, 10.
100. Lv J., Shi Q., Han Y., Li W., Liu H., Zhang J., Niu C., Gao G., Fu Y., Zhi R., Wu K., Li S., Gu F., Fu L. (2021) Spatial transcriptomics reveals gene expression characteristics in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Cell Death Dis.* **12**(12), 1095.
101. Wu Y., Yang S., Ma J., Chen Z., Song G., Rao D., Cheng Y., Huang S., Liu Y., Jiang S., Liu J., Huang X., Wang X., Qiu S., Xu J., Xi R., Bai F., Zhou J., Fan J., Zhang X., Gao Q. (2022) Spatiotemporal immune landscape of colorectal cancer liver metastasis at single-cell level. *Cancer Discov.* **12**(1), 134–153.
102. Glycolysis & Carbohydrates Assay Kits. In: *Assay Genie*. [Electronic resource]. URL: <https://www.assaygenie.com/glycolysis-and-carbohydrates-assay-kits> (accessed: 02.09.2022)
103. Leippe D., Sobol M., Vidugiris G., Cali J.J., Vidugiriene J. (2017) Bioluminescent assays for glucose and glutamine metabolism: high-throughput screening for changes in extracellular and intracellular metabolites. *SLAS Discov.* **22**, 366–377.
104. Huang S.-L., Huang Z.-C., Zhang C.-J., Xie J., Lei S.-S., Wu Y.-Q., Fan P.-Z. (2022) LncRNA SNHG5 promotes the glycolysis and proliferation of breast cancer cell through regulating BACH1 via targeting miR-299. *Breast Cancer*. **29**, 65–76.
105. Qin Y., Zheng Y., Huang C., Li Y., Gu M., Wu Q. (2021) Downregulation of miR-181b-5p inhibits the viability, migration, and glycolysis of gallbladder cancer by upregulating PDHX under hypoxia. *Front. Oncol.* **11**, 683725.
106. Zhang K., Hu H., Xu J., Qiu L., Chen H., Jiang X., Jiang Y. (2020) Circ_0001421 facilitates glycolysis and lung cancer development by regulating miR-4677-3p/CDCA3. *Diagn. Pathol.* **15**, 133.
107. Zhang Y., Gao M., Zhu M., Li H., Ma T., Wu C. (2022) Isobavachalcone induces cell death through multiple pathways in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Southern Med. Univ.* **42**, 878–885.
108. Cargill K.R., Stewart C.A., Park E.M., Ramkumar K., Gay C.M., Cardnell R.J., Wang Q., Diao L., Shen L., Fan Y.H., Chan W.K., Lorenzi P.L., Oliver T.G., Wang J., Byers L.A. (2021) Targeting MYC-enhanced glycolysis for the treatment of small cell lung cancer. *Cancer Metab.* **9**, 33.
109. Mazurkiewicz J., Simiczyjew A., Dratkiewicz E., Pietraszek-Gremplewicz K., Majkowski M., Kot M., Ziętek M., Matkowski R., Nowak D. (2022) Melanoma cells with diverse invasive potential differentially induce the activation of normal human fibroblasts. *Cell Commun. Signal.* **20**, 63.
110. Lang L., Wang F., Ding Z., Zhao X., Loveless R., Xie J., Shay C., Qiu P., Ke Y., Saba N.F., Teng Y. (2021) Blockade of glutamine-dependent cell survival augments antitumor efficacy of CPI-613 in head and neck cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **40**, 393.
111. Almouhanna F., Blagojevic B., Can S., Ghanem A., Wölfl S. (2021) Pharmacological activation of pyruvate kinase M2 reprograms glycolysis leading to TXNIP depletion and AMPK activation in breast cancer cells. *Cancer Metab.* **9**, 5.
112. Zhou X., Mehta S., Zhang J. (2020) Genetically encodable fluorescent and bioluminescent biosensors light up signaling networks. *Trends Biochem. Sci.* **45**, 889–905.
113. Zhang Z., Cheng X., Zhao Y., Yang Y. (2020) Lighting up live-cell and *in vivo* central carbon metabolism with genetically encoded fluorescent sensors. *Annu. Rev. Analyt. Chem.* (Palo Alto, Calif.). **13**, 293–314.
114. Shirmanova M.V., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Matlashov M.E., Belousov V.V., Snopova L.B., Prodanetz N.N., Dudenkova V.V., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. (2015) Intracellular pH imaging in cancer cells *in vitro* and tumors *in vivo* using the new genetically encoded sensor SypHer2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1850**, 1905–1911.
115. Shimolina L., Potekhina E., Druzhkova I., Lukina M., Dudenkova V., Belousov V., Shcheslavskiy V., Zagaynova E., Shirmanova M. (2022) Fluorescence lifetime-based pH mapping of tumors *in vivo* using genetically encoded sensor SypHerRed. *Biophys. J.* **121**, 1156–1165.
116. Parshina Y.P., Komarova A.D., Bochkarev L.N., Kovylin T.A., Plekhanov A.A., Klapshina L.G., Konev A.N., Mozherov A.M., Shchechkin I.D., Sirotkina M.A., Shcheslavskiy V.I., Shirmanova M.V. (2022) Simultaneous probing of metabolism and oxygenation of tumors *in vivo* using FLIM of NAD(P)H and PLIM of a new polymeric Ir(III) oxygen sensor. *Internat. J. Mol. Sci.* **23**, 10263.
117. Solomatina A.I., Su S., Lukina M.M., Dudenkova V.V., Shcheslavskiy V.I., Wu C., Chelushkin P.S., Chou P., Koshevoy I.O., Tunik S.P. (2018) Water-soluble cyclometalated platinum(II) and iridium(III) complexes: synthesis, tuning of the photophysical properties, and *in vitro* and *in vivo* phosphorescence lifetime imaging. *RSC Adv.* **8**, 17224–17236.
118. Díaz-García C.M., Lahmann C., Martínez-François J.R., Li B., Koveal D., Nathwani N., Rahman M., Keller J.P., Marvin J.S., Looger L.L., Yellen G. (2019) Quantitative *in vivo* imaging of neuronal glucose concentrations with a genetically encoded fluorescence lifetime sensor. *J. Neurosci. Res.* **97**, 946–960.

119. Бабиченко И.И. (2008) Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста. *Вестник РУДН, сер. Медицина*. **4**, 94–99.
120. Fack F., Tardito S., Hochart G., Oudin A., Zheng L., Fritah S., Golebiewska A., Nazarov P.V., Bernard A., Hau A.C., Keunen O., Leenders W., Lund-Johansen M., Stauber J., Gottlieb E., Bjerkvig R., Niclou S.P. (2017) Altered metabolic landscape in IDH – mutant gliomas affects phospholipid, energy, and oxidative stress pathways. *EMBO Mol. Med.* **9**, 1681–1695.
121. Garrett M., Sperry J., Braas D., Yan W., Le T.M., Mottahedeh J., Ludwig K., Eskin A., Qin Y., Levy R., Breunig J.J., Pajonk F., Graeber T.G., Radu C.G., Christofk H., Prins R.M., Lai A., Liao L.M., Coppola G., Kornblum H.I. (2018) Metabolic characterization of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant and IDH wildtype gliomaspheres uncovers cell type-specific vulnerabilities. *Cancer Metab.* **6**, 4.
122. Meijer T.W.H., Looijen-Salamo, M.G., Lok J., van den Heuvel M., Tops B., Kaanders J.H.A.M., Span P.N., Bussink J.J. (2019) Glucose and glutamine metabolism in relation to mutational status in NSCLC histological subtypes. *Thoracic. Cancer*. **10**, 2289–2299.
123. Pinheiro C., Garcia E.A., Morais-Santos F., Scapulatempo-Neto C., Mafra A., Steenbergen R.D., Boccardo E., Villa L.L., Baltazar F., Longatto-Filho A. (2014) Lactate transporters and vascular factors in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *BMC Cancer*. **14**, 751.
124. Mikkilineni L., Whitaker-Menezes D., Domingo-Vidal M., Sprandio J., Avena P., Cotzia P., Dulau-Florea A., Gong J., Uppal G., Zhan T., Leiby B., Lin Z., Pro B., Sotgia F., Lisanti M.P., Martinez-Outschoorn U. (2017) Hodgkin lymphoma: a complex metabolic ecosystem with glycolytic reprogramming of the tumor microenvironment. *Semin. Oncol.* **44**, 218–225.
125. Gootu M., Whitaker-Menezes D., Sprandio J., Domingo-Vidal M., Lin Z., Uppal G., Gong J., Frattamico R., Leiby B., Dulau-Florea A., Caro J., Martinez-Outschoorn U. (2017) Mitochondrial and glycolytic metabolic compartmentalization in diffuse large B-cell lymphoma. *Semin. Oncol.* **44**, 204–217.
126. Georgakoudi I., Quinn K.P. (2012) Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state. *Annu. Rev. Biomed. Engin.* **14**, 351–367.
127. Shirmanova M.V., Shcheslavskiy V.I., Lukina M.M., Becker W., Zagaynova E.V. (2020) Exploring tumor metabolism with time-resolved fluorescence methods: from single cells to a whole tumor. In: *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*. Eds Tuchin V.V., Popp J., Zakharov V. Cham: Springer, 133–155.
128. Chance B., Schoener B., Oshino R., Itshak F., Nakase Y. (1979) Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J. Biol. Chem.* **254**, 4764–4771.
129. Skala M.C., Riching K.M., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K.W., White J.G., Ramanujam N. (2007) *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 19494–19499.
130. Chorvat D., Chorvatova A. (2009) Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. *Laser Phys. Lett.* **6**, 175–193.
131. Lakowicz J.R., Szmacinski H., Nowaczyk K., Johnson M.L. (1992) Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 1271–1275.
132. Blacker T.S., Mann Z.F., Gale J.E., Ziegler M., Bain A.J., Szabadkai G., Duchen M.R. (2014) Separating NADH and NAD(P)H fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nat. Commun.* **5**, 3936.
133. Kalinina S., Freymueller C., Naskar N., von Einem B., Reess K., Sroka R., Rueck A. (2021) Bioenergetic alterations of metabolic redox coenzymes as NADH, FAD and FMN by means of fluorescence lifetime imaging techniques. *Internat. J. Mol. Sci.* **22**, 5952.
134. Berezin M.Y., Achilefu S. (2010) Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2641–2684.
135. Druzhkova I.N., Shirmanova M.V., Lukina M.M., Dudenkova V.V., Mishina N.M., Zagaynova E.V. (2016) The metabolic interaction of cancer cells and fibroblasts – coupling between NAD(P)H and FAD, intracellular pH and hydrogen peroxide. *Cell Cycle*. **15**, 1257–1266.
136. Shirmanova M.V., Gorbachev D.A., Sarkisyan K.S., Parnes A.P., Gavrina A.I., Polozova A.V., Kovaleva T.F., Snopova L.B., Dudenkova V.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A. (2021) FUCCI-Red: a single-color cell cycle indicator for fluorescence lifetime imaging. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 3467–3476.
137. Lukina M.M., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Druzhkova I.N., Shimolina L.E., Zagaynova E.V., Shirmanova M.V. (2018) Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subjects*. **1862**, 1693–1700.
138. Shirshin E.A., Shirmanova M.V., Gayer A.V., Lukina M.M., Nikonova E.E., Yakimov B.P., Budylin G.S., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Komarov D.V., Yakovlev V.V., Becker W., Zagaynova E.V., Shcheslavskiy V.I., Scully M.O. (2022) Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: the quest for metabolic heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **119**, e2118241119.
139. Yuzhakova D., Kiseleva E., Shirmanova M., Shcheslavskiy V., Sachkova D., Snopova L., Bederina E., Lukina M., Dudenkova V., Yusubalieva G., Belovezhets T., Matvienko D., Baklaushev V. (2022) Highly invasive fluorescent/bioluminescent patient-derived orthotopic model of glioblastoma in mice. *Front. Oncol.* **12**, 897839.
140. Sharick J.T., Jeffery J.J., Karim M.R., Walsh C.M., Esbona K., Cook R.S., Skala M.C. (2019) Cellular metabolic heterogeneity *in vivo* is recapitulated in tumor organoids. *Neoplasia*. **21**, 615–626.
141. Walsh A.J., Castellanos J.A., Nagathihalli N.S., Merchant N.B., Skala M.C. (2016) Optical imaging of drug-induced metabolism changes in murine and human pancreatic cancer organoids reveals heterogeneous drug response. *Pancreas*. **45**, 863–869.

142. Walsh A.J., Cook R.S., Sanders M.E., Aurisicchio L., Ciliberto G., Arteaga C.L., Skala M.C. (2014) Quantitative optical imaging of primary tumor organoid metabolism predicts drug response in breast cancer. *Cancer Res.* **74**, 5184–5194.
143. Sharick J.T., Walsh C.M., Sprackling C.M., Pasch C.A., Pham D.L., Esbona K., Choudhary A., Garcia-Valera R., Burkard M.E., McGregor S.M., Matkowskyj K.A., Parikh A.F., Meszoely I.M., Kelley M.C., Tsai S., Deming D.A., Skala M.C. (2020) Metabolic heterogeneity in patient tumor-derived organoids by primary site and drug treatment. *Front. Oncol.* **10**, 553.
144. Gillette A.A., Babiarz C.P., VanDommelen A.R., Pasch C.A., Clipson L., Matkowskyj K.A., Deming D.A., Skala M.C. (2021) Autofluorescence imaging of treatment response in neuroendocrine tumor organoids. *Cancers.* **13**, 1873.

Tumor Metabolic Heterogeneity

M. V. Shirmanova^{1, *}, S. D. Sinyushkina¹, and A. D. Komarova^{1, 2}

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

² Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

*e-mail: Shirmanovam@mail.ru

Currently, much attention in oncology is devoted to the issues of tumor heterogeneity, which creates serious problems in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms. Intertumoral and intratumoral differences relate to various characteristics and aspects of the vital activity of tumor cells, including cellular metabolism. This review provides general information about the tumor metabolic heterogeneity with a focus on energy metabolism, its causes, mechanisms and research methods. Among the methods, fluorescence lifetime imaging is described in more detail as a new promising method for observing metabolic heterogeneity at the cellular level. The review demonstrates the importance of studying the features of tumor metabolism and identifying intra- and intertumoral metabolic differences.

Keywords: tumors, tumor heterogeneity, energy metabolism, oxidative phosphorylation, glycolysis, metabolic cofactors, fluorescence lifetime imaging

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.321

ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННЫЕ ПОРАЖЕНИЯ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА И СПОСОБЫ ИХ КОРРЕКЦИИ

© 2023 г. Р. Г. Гончаров^a, М. Г. Шарапов^a, *

^a Институт биофизики клетки Российской академии наук “Федеральный исследовательский центр
“Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: sharapov.mg@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 09.05.2023 г.

Принята к публикации 10.05.2023 г.

Ишемия-реперфузия — каскад сложных и взаимосвязанных патологических процессов, лежащих в основе многих заболеваний человека, в том числе таких социально-значимых, как инсульт, инфаркт миокарда, острая почечная недостаточность и др. В представленном обзоре рассмотрены современные представления об основных биохимических и сигнально-регуляторных процессах, протекающих в клетке в условиях ишемии-реперфузии. Рассмотрены как общепринятые, так и новые способы коррекции ишемических-реперфузионных поражений, направленные на разные этапы этого патологического процесса.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, окислительный стресс, внутриклеточная сигнализация, HIF-1α, NRF2, NF-κB, PI3K/AKT/mTOR, гипотермия, ингибиторы оксидаз, H₂S, антиоксиданты, селен, ферменты-антиоксиданты

DOI: 10.31857/S0026898423060071, EDN: RASNDH

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день убедительно доказано, что окислительный стресс является неотъемлемой частью многих патологических состояний, одно из которых — поражение тканей и органов, подвергнутых ишемии-реперфузии (И-Р). В основе И-Р-повреждения лежит нарушение нормального притока крови к тканям (ишемия) в ре-

зультате сдавливания или закупоривания приводящих кровеносных сосудов с последующим восстановлением кровотока (реперфузия). Согласно одному из определений: “И-Р-повреждение — это парадоксальный и сложный процесс, возникающий после восстановления кровотока в ранее ишемизированной ткани, приводящий к возрастанию клеточной дисфункции и клеточной

Сокращения. И-Р — ишемия-реперфузия; АФК — активные формы кислорода; МДА — малоновый диальдегид; ЭТЦ — электрон-транспортная цепь; QH2 — гидрохинон; XO — ксантиноксидаза; XDH — ксантиндегидрогеназа; LOOP — гидропероксиды липидов; NHE — белок-обменник Na⁺/H⁺ (Na⁺/H⁺ Exchanger); NCX — белок-обменник Na⁺/Ca²⁺ (Na⁺/Ca²⁺ Exchanger); Glut 1/4 — переносчик глюкозы типа 1 или 4 (Glucose transporter type 1 or 4); ЭПР/СР — эндоплазматический/саркоплазматический ретикулум; MCU — митохондриальный Ca²⁺-унипортер (Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter); mPTP — Ca²⁺-зависимая митохондриальная пора (mitochondrial Permeability Transition Pore); DAMP — молекулярные паттерны, связанные с повреждением (Damage Associated Molecular Pattern); CypD — циклофиллин D; NET — внеклеточные нейтрофильные ловушки (Neutrophils Extracellular Traps); SERCA — Ca²⁺-активируемая АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase); SIRS — синдром системного воспалительного ответа (Systemic Inflammatory Response Syndrome); CARS — синдром компенсаторного противовоспалительного ответа (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome); ПОН — полиорганная недостаточность; HIF — фактор, индуцируемый гипоксией (Hypoxia Inducible Factor); NRF2 — транскрипционный фактор, основной регулятор антиоксидантного ответа (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2); ARE — элемент ответа на антиоксиданты (Antioxidant Response Element); KEAP1 — ингибитор NRF2 (Kelch-like ECH-associated protein); MAPK — митоген-активируемая протеинкиназа; CBP — транскрипционный коактиваторный белок (CREB-binding protein); HDAC — гистондеацетилаза (Histone DeAcetylase); PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; mTOR — протеинкиназа, мишень рапамицина млекопитающих (mammalian Target Of Rapamycin); AKT — серин/треониновая протеинкиназа В (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase B alpha); NOX — NADPH-оксидазы; MAO — моноаминоксидаза; COX — цитохром-с-оксидаза; FoxO — транскрипционный фактор, мишень киназы AKT (forkhead box protein O); TLR — Toll-подобные рецепторы (Toll-Like Receptor); RTK — рецептор с тирозинкиназной активностью (Receptor Tyrosin Kinases); PDGF — фактор роста тромбоцитов (Platelet-Derived Growth Factor); SOD — супероксиддисмутаза; CAT — каталаза; GPx — глутатионпероксидаза; Trx — тиоредоксин; Prdx (Prx) — пероксиредоксин; RyR — рецептор рианоидина; TNFα — фактор некроза опухоли α; VEGF — фактора роста эндотелия сосудов; VEGFR — рецептор фактора роста эндотелия сосудов.

гибели” [1]. При ишемии происходит быстрое развитие взаимосвязанных патофизиохимических процессов, сопряженных со снижением продукции АТФ и повреждением структурно-функциональной целостности метаболически активных тканей. Восстановление притока крови, насыщенной кислородом, к ишемизированным тканям (реперфузия) приводит к лавинообразному росту уровня активных форм кислорода (АФК) и развитию окислительного стресса, внося тем самым основной вклад в патогенез И-Р-поражения.

Патологии, связанные с И-Р-поражением, на сегодняшний день рассматриваются как одна из наиболее частых причин тяжелых заболеваний, не только ухудшающих качество жизни человека, но и приводящих к тяжелой инвалидизации и летальному исходу [2]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения заболевания, связанные с И-Р, стали причиной смерти более 7 млн человек в мире. К числу таких социально значимых заболеваний относятся: ишемическая болезнь сердца, ишемическая острая почечная недостаточность, ишемия печени, ишемия кишечника, цереброваскулярные заболевания [3, 4]. И-Р-повреждение представляет серьезную проблему трансплантологии, кардиоторакальной, сосудистой и общей хирургии. Понимание молекулярных механизмов И-Р-поражения необходимо для разработки эффективных стратегий терапии патологических состояний, связанных с этим состоянием.

ОБЩИЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

И-Р представляет собой сложный многостадийный патофизиохимический процесс. На сегодняшний день условно выделяют несколько взаимосвязанных механизмов развития И-Р-повреждения: 1) отсутствие кислорода и питательных веществ; 2) накопление токсичных метаболитов в ишемизированных тканях; 3) нарушение водно-электролитного гомеостаза; 4) развитие окислительного стресса; 5) нарушение функционирования компартментов клетки (в первую очередь, митохондрий); 6) развитие системной воспалительной реакции [5]. Далее мы подробно рассмотрим каждый из этапов И-Р-поражения.

Ишемия

Нарушение нормального притока и оттока крови к органам (вызванного тромбозом, атеросклерозом, передавливанием сосудов и т.д.) вызывает развитие патологического состояния — ишемии. Ишемия приводит к развитию кислородного голодания (гипоксия/аноксия), нарушению поступления питательных веществ и вывода клеточных метаболитов, провоцирующих интоксика-

цию пораженных тканей. Снижение уровня O_2 нарушает работу электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий (вследствие нехватки доноров электронов $NADH^+/NAD^+$ и QH_2) и подавляет окислительное фосфорилирование, что вызывает снижение уровня АТФ. Оставшиеся молекулы АТФ подвергаются катаболизму до гипоксантина, основного субстрата ксантиноксидазы (ХО) — патологической формы ксантиндегидрогеназы (ХДН), на стадии реперфузии. Кроме того, дефицит кислорода нарушает процесс β -окисления жиров и функционирования цитрат-малатного челнока. Все это приводит к энергетическому голоданию клетки и переходу на менее эффективный анаэробный способ извлечения энергии — гликолиз, в результате чего происходит накопление молочной кислоты и закисление внутриклеточной среды (ацидоз) [6]. Ацидоз, в свою очередь, приводит к ингибированию основных ферментов гликолиза и, в конечном счете, к еще большему дефициту АТФ. Снижение внутриклеточного pH вызывает дестабилизацию мембран лизосом и высвобождение гидролитических ферментов, разрушающих структурные компоненты клеток (рис. 1).

Энергетический дефицит приводит к снижению активности АТФ-зависимых Na^+/K^+ -каналов, накоплению в клетке избытка ионов Na^+ и H_2O и, как следствие, к нарушению электролитного и осмотического гомеостаза клеток [7]. Накопление ионов Na^+ в клетке нарушает функцию Na^+/Ca^{2+} -обменника, вызывая рост концентрации Ca^{2+} в цитозоле с последующей активацией фосфолипаз (фосфолипаза A_2) и протеаз (кальпаины), нарушающих целостность клеток, а также активирующих ряд оксидаз. Например, под действием кальпаинов происходит частичный протеолиз ХДН, что вместе с окислением остатков цистеина способствует превращению ХДН в ХО, которая играет важнейшую роль в патогенезе И-Р на стадии реперфузии.

В попытке снизить высокую концентрацию Ca^{2+} в цитозоле клетка увеличивает транспорт ионов Ca^{2+} через митохондриальный Ca^{2+} -унипортер MCU (Mitochondrial C Ca^{2+} Uniporter). Используя отрицательный митохондриальный потенциал, MCU обеспечивает движение положительно заряженных ионов Ca^{2+} в митохондрии. В результате происходит снижение концентрации Ca^{2+} в цитозоле и, напротив, повышение Ca^{2+} в матриксе митохондрий. Избыток Ca^{2+} в матриксе митохондрий инициирует открытие митохондриальной поры mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore) во внутренней мембране митохондрий, что приводит к стремительному проникновению воды и растворенных в ней веществ (размером ≤ 1.5 кДа) в матрикс митохондрий, вызывая тем самым отек и разрыв наружной мем-

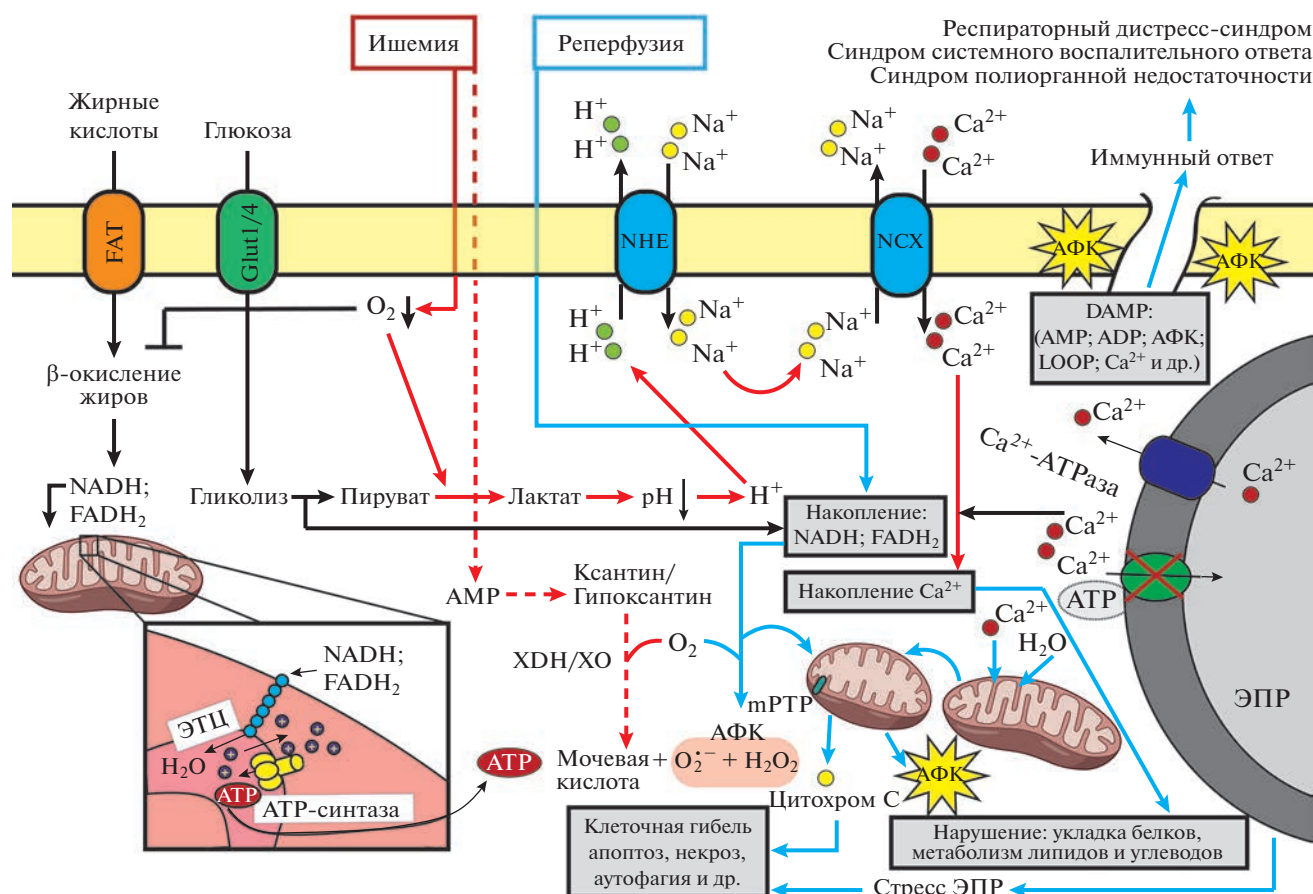


Рис. 1. Упрощенная схема ишемически-реперфузионного поражения. Красные сплошные и пунктирные стрелки относятся к ишемическим процессам; синие стрелки — к стадии реперфузии. XDH — ксантиндегидрогеназа; XO — ксантиноксидаза; mPTP — Ca^{2+} -зависимая митохондриальная пора; DAMP — сигнальные молекулы опасности, ассоциированные с повреждениями; LOOP — продукты перекисного окисления липидов. NHE — Na^+/H^+ -обменник; NCX — $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник; Glut 1/4 — переносчик глюкозы типа 1 или 4; FAT — переносчик жирных кислот.

браны. В результате активируется программируемая гибель клеток (митофагия, аутофагия, апоптоз) [8]. Увеличение содержания ионов Ca^{2+} в клетке приводит к образованию комплексов пирофосфата кальция и мочевой кислоты, которые относятся к DAMP — индукторам “стерильного воспаления” [9]. Повышенный уровень DAMP служит сигналом для формирования инфламасом, которые не только распознают DAMP с использованием NOD-подобных рецепторов (NRL), но и модулируют воспалительный ответ клетки, продуцируя ряд цитокинов: IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-18 и IL-6. Это может активировать различные факторы транскрипции, такие как NF- κB , и увеличивать вероятность развития воспалительного ответа клетки. В конечном счете это активирует аутофагию — один из основных механизмов снижения уровня DAMP [10]. Если же процесс аутофагии не справляется с утилизацией DAMP, то это приводит к их выходу во внеклеточное пространство в результате некротической гибели клетки. Появление DAMP, провоспалительных цитокинов в

периферической крови вызывает реакцию сосудистого русла, связанную с активацией системы свертывания крови и образованием внеклеточных нейтрофильных ловушек — NET (Neutrophils Extracellular Traps) [11]. Образование NET индуцируется при непосредственном участии тромбоцитов. Появление NET в кровеносных сосудах способствует быстрой локальной реакции свертывания крови, предотвращающей системное распространение DAMP [12]. Сывороточные факторы (иммуноглобулины, антитела, коллектины, молекулы адгезии, опсонины) активно формируют иммунные комплексы с внеклеточными DAMP. В свою очередь, эти иммунные комплексы активируют систему комплемента и активно фагоцитируются прежде всего нейтрофилами. Нейтрофилы кооперируются с активированными тромбоцитами и эндотелиальными клетками кровеносных сосудов, активированными DAMP. Это обеспечивает выход нейтрофилов из сосудистого русла в очаг ишемического повреждения для ограничения патологического очага, тромбоза сосудов, фагоци-

тоза поврежденных молекул, клеточных органелл и их обломков. Важно отметить, что привлеченные в очаг ишемии нейтрофилы играют важную роль в развитии окислительного стресса на стадии реперфузии, благодаря эффекту кислородного взрыва, опосредованного оксидазами.

Как отмечалось ранее, при ишемии наблюдается нарушение работы ЭТЦ митохондрий, что приводит к повышенной утечке электронов на остаточный молекулярный кислород (O_2) и генерации супероксидного анион-радикала $O_2^{\cdot-}$, который вызывает перекисное окисление липидов и нарушение мембранного потенциала митохондрий. Известно, что при ишемии образуется относительно небольшое количество АФК, однако на фоне сниженной антиоксидантной защиты организма это приводит к развитию начальной стадии окислительного стресса [13, 14].

Реперфузия

Восстановление кровотока и поступление насыщенной кислородом крови к ишемизированным тканям индуцирует запуск свободнорадикальных реакций и лавинообразному росту уровня АФК, что индуцирует развитие окислительного стресса, который играет ключевую роль в патофизиологии И-Р-поражения. В ходе реперфузии O_2 проникает в ишемизированные ткани, в которых уже активированы различные оксидазы. В частности, ХО, образуемая при ишемии, участвует в катаболизме пуринов до мочевой кислоты и в сопряженной реакции восстанавливает поступивший молекулярный кислород O_2 (вместо NAD^+ в случае ХДН) до $O_2^{\cdot-}$, который затем спонтанно (или при действии SOD) дисмутирует в H_2O_2 , а также вступает в реакции с H_2O , H_2O_2 и другими молекулами, генерируя различные виды АФК ($O_2^{\cdot-} + H_2O \rightarrow \cdot HOO + HO^-$; $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow HO\cdot + HO^- + {}^1O_2...$). Интересно отметить, что еще на заре редокс-биологии, за год до открытия в 1968 году супероксид-дисмутазы, McCord и Fridovich предположили, что главным источником свободных радикалов при реперфузионном поражении служит ХО. Кроме ХО, источниками АФК на стадии реперфузии являются: ЭТЦ митохондрий, NADPH-оксидазы (Nox/Duox), NO-синтазы (NOS), цитохром P450, липоксигеназы (LOX), циклооксигеназы (COX) и моноаминоксидазы (MAO) [15, 16].

Следует также отметить, что в образовании АФК в области И-Р-поражения участвуют привлеченные провоспалительными цитокинами клетки иммунной системы. Например, NADPH-оксидазы полиморфноклеточных нейтрофилов вносят существенный вклад в генерацию супероксидного анион-радикала ($NADPH + 2O_2 \rightarrow 2O_2^{\cdot-} +$

$+ NADP^+ + H^+$) [17]. Вероятно, NOX играют важнейшую роль в образовании $O_2^{\cdot-}$ на стадии реперфузии, так как фармакологическое ингибирование этих ферментов или подавление экспрессии их генов снижает тяжесть И-Р-поражений [18, 19]. Миелопероксидаза лейкоцитов (привлеченных цитокинами в область И-Р) окисляет анионы Cl и Br с образованием активных форм: HOCl и HOBr, являющихся мощными окислителями. Индуцибельная NO-синтаза (iNOS) макрофагов при компенсаторной генерации NO (в области адгезии клеток к эндотелию сосудов) способна образовывать $O_2^{\cdot-}$, провоцируя таким образом рост АФК (особенно высокотоксичного пероксинитрита ONOO $^-$) [20].

На стадии реперфузии источниками АФК могут быть не только оксидазы, но и железосодержащие белки (такие как гемоглобин, миоглобин, цитохром С, трансферрин и др.), высвобождающиеся во внеклеточную среду после повреждения клеток [21, 22]. Ионы железа в простетических группах этих белков могут участвовать в реакции Фентона с пероксидом водорода ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + ^-OH$), что приводит к образованию высокореакционного гидроксильного радикала [23, 24]. Однако, по всей видимости, большая часть АФК продуцируется в реакциях, катализируемых указанными оксидазами.

В период реперфузии эффективность ННЕ-обменника возрастает за счет утилизации внеклеточных ионов H^+ , накопившихся во время ишемии. Это, в свою очередь, способствует избыточному накоплению ионов Ca^{2+} в клетке. В условиях реперфузии нарушается обратный захват Ca^{2+} эндоплазматическим/саркоплазматическим ретикулумом (ЭПР/СР) из цитозоля в связи с нарушением активности SERCA2b (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase 2b), представленной преимущественно в гладкомышечных и немышечных тканях [25]. Это нарушение сопряжено с увеличением высвобождения Ca^{2+} из ЭПР/СР через рианодиновые рецепторы (Ryanodine Receptors, RyRs). Нарушения в обмене Ca^{2+} в ЭПР/СР приводят к увеличению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Стремительное увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} приводит к активации различных гидролаз: фосфолипаз, протеаз и др., активность которых возрастает в период реперфузии, когда нормализуется уровень pH. Кроме того, рост концентрации ионов Ca^{2+} нарушает процесс сворачивания белков, метаболизма липидов и углеводов в ЭПР [26]. Рост количества неправильно свернутых/развернутых белков в просвете ЭПР приводит к развитию ЭПР-стресса, который может спровоцировать апоптоз клетки [27].

Как отмечалось ранее, уже на стадии ишемии в клетках накапливаются DAMP. Гибель клеток и выход DAMP в межклеточное пространство в ходе реперфузии индуцируют процессы острого воспаления. Воспалительные реакции, тромбозы и окислительный стресс, активируемые в период реперфузии, вызывают интерстициальный отек и развитие синдрома невосстановленного кровотока “no-reflow”, что оказывает дополнительное повреждающее действие [28]. Миграция провоспалительных нейтрофилов в очаг И-Р-повреждения приводит к развитию синдрома системного воспалительного ответа — SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) с последующей полиорганной недостаточностью, которая является основной причиной высокой летальности при И-Р-поражениях [29]. Полиорганная недостаточность может возникать при И-Р-повреждении кишечника, легких, печени, почек, скелетных мышц и сердца. Описан синдром компенсаторного противовоспалительного ответа (CARS, Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome) [30], действие которого противоположно ответу на SIRS и приводит к восстановлению гомеостаза. Однако длительное действие CARS вызывает развитие глубокой иммунодепрессии, которая проявляется нарушением процесса репарации, неспособностью противостоять бактериальной инфекции и формированием поздней полиорганной недостаточности.

Таким образом, взрывной рост уровня АФК в ходе реперфузии способствует развитию окислительного стресса, внося существенный вклад в усиление патологических процессов, связанных с нарушением энергетического обмена, дисфункцией митохондрий, электролитным дисбалансом, осмотическим стрессом, ЭПР-стрессом, развитием синдрома “no-reflow” и острой воспалительной реакции (рис. 1). Все эти процессы приводят к быстрой клеточной гибели, нарушению функции тканей и органов, подверженных И-Р-поражению [21, 22]. Несмотря на то, что механизм И-Р-поражения практически везде одинаков, его последствия для различных органов и тканей могут различаться. Наиболее чувствительны к действию И-Р ткани с густой сосудистой сетью и активным потреблением кислорода [31].

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

Гиперпродукция АФК при И-Р-поражении, как и при других свободнорадикальных патологиях, приводит к адаптивной индукции антиоксидантной защиты клеток. Ведущая роль в этих процессах принадлежит транскрипционным факторам HIF-1 α , NF- κ B и NRF2 [32–34], которые координировано регулируют экспрессию генов многих антиоксидантных ферментов. Интересно

отметить, что промоторы этих генов часто имеют сайты связывания всех указанных транскрипционных факторов, что, вероятно, позволяет более тонко регулировать ответ клетки на изменение окислительно-восстановительного гомеостаза [35, 36]. Кроме того, антиоксидантный ответ при И-Р регулируется также с участием микроРНК [37–39]. Однако ведущая роль все же принадлежит аппарату транскрипции, который чутко реагирует на изменение окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Это возможно благодаря редокс-чувствительным элементам (преимущественно остаткам цистеина), окисление или восстановление которых влияет на активность и специфичность многих транскрипционных факторов. При И-Р-поражениях к таким ключевым факторам относятся HIF, NRF2, NF- κ B и сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR (рис. 2).

Транскрипционный фактор HIF

Основным регулятором экспрессии генов в условиях И-Р является фактор HIF. На сегодняшний день выделяют три изоформы HIF: HIF-1, HIF-2 и HIF-3, из которых основным регулятором клеточного и системного гомеостаза кислорода в клетках при И-Р считается HIF-1, состоящий из α - и β - субъединиц [40].

В качестве фактора транскрипции HIF-1 контролирует экспрессию более 100 генов, в число которых входят регуляторы ангиогенеза (фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и ангиопоэтин-2 (Ang2)), эритропоэза (эритропоэтин, EPO) и тонуса сосудов (гемоксигеназа-1, HO-1, iNOS, эндотелин-1 и др). Регуляция этих генов фактором HIF-1 увеличивает эффективность доставки кислорода к клеткам тканей, испытывающих гипоксию. Помимо этого, HIF-1 способен активировать транскрипцию генов, которые играют важную роль в регуляции пролиферации клеток (IGF-2, p21), в апоптозе (BNIP3 и BNIP3L), клеточной миграции и инвазии (виментин, матриксная металлопротеиназа-2, рецептор хемокина CXCR4), регуляции уровня pH (карбоангидраза-9). Отмечена важная роль HIF-1 в регуляции метаболизма глюкозы в процессе гликолиза путем увеличения экспрессии переносчиков глюкозы (Glut-1, 3) и ферментов гликолиза: гексокиназы 1 и 2 (HK-1, 2), фосфофруктокиназы-1 (PFK-1) и др. Важная роль HIF-1 в условиях И-Р показана на различных животных моделях [38, 39].

Механизм регуляции HIF-1 основан на ингибировании его транскрипционной активности в результате окисления в условиях нормальной концентрации кислорода в клетках. На первом этапе в результате воздействия O₂, Fe²⁺ и/или аскорбатзависимых пролилгидроксилаз-1-3 (PHD1-3) гидроксигированию подвергаются остатки про-

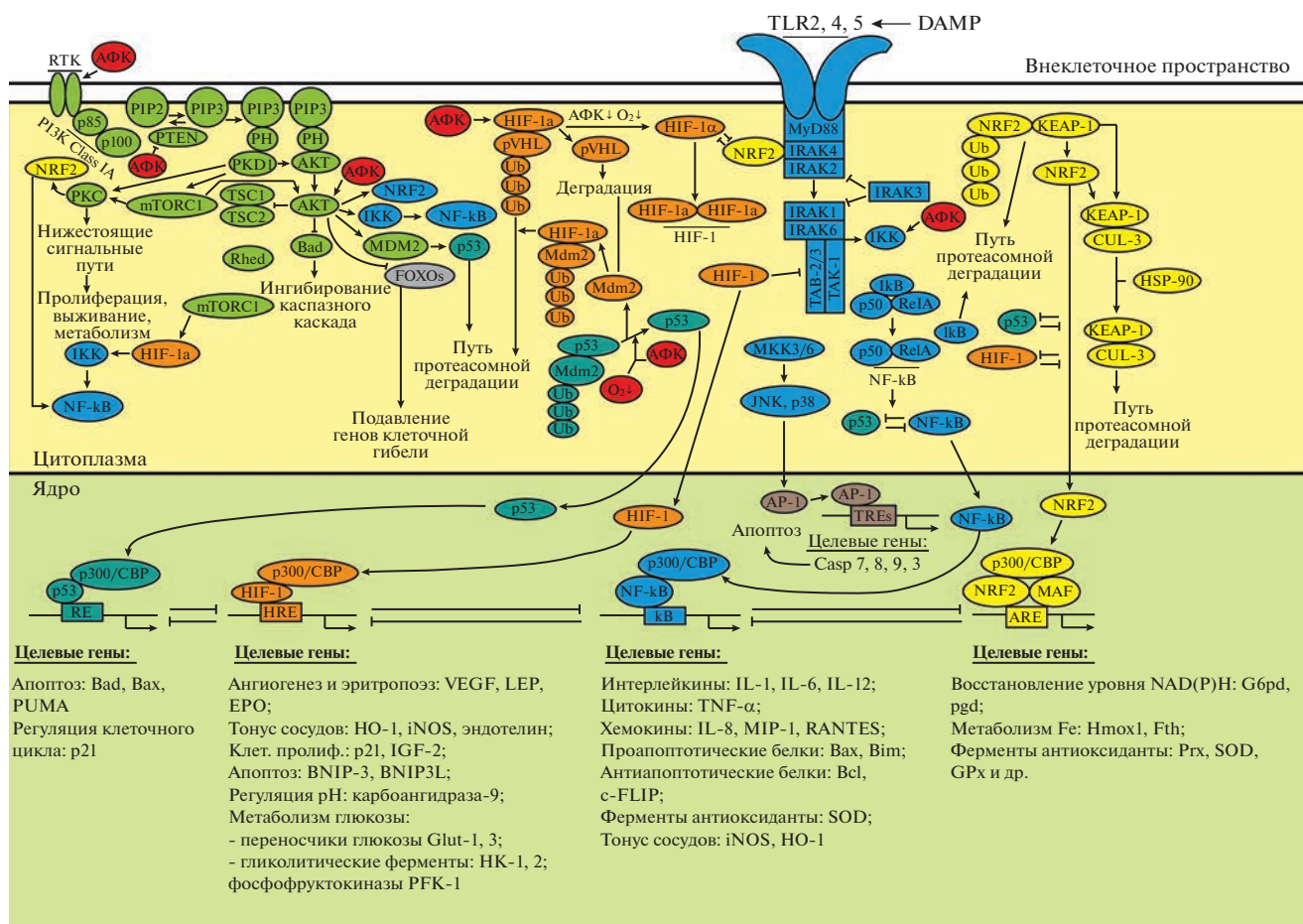


Рис. 2. Основные сигнально-регуляторные пути клетки и некоторые целевые гены, контролируемые транскрипционными факторами (HIF-1a, NF- κ B, p53 и NRF2) при ишемии-реперфузии. Стрелки указывают на стимулирующий эффект. Линии с перпендикулярной черточкой – ингибирующий эффект.

лина в α -субъединице HIF-1. Гидроксильированные остатки пролина взаимодействуют с белком pVHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein), который в составе комплекса с элонгинами С и В, куллином (CUL2) и активной убиквитинлигазой E3 участвует в убиквитинировании α -субъединицы HIF-1, подготавливая ее к деградации 26S протеасомой. Схожий механизм обнаружен и у белка FIH (Factor Inhibiting HIF), катализирующего реакцию гидроксильирования Asn803 в HIF-1 α , однако этот белок (в отличие от PHD) в малой степени зависит от концентрации кислорода, но в большей степени зависит от концентрации АФК. В результате указанных реакций подавляется транскрипционная активность HIF-1, который утрачивает способность взаимодействовать с коактиватором p300/CBP [43]. В условиях ишемии (со снижением парциального давления O_2) происходит стабилизация и накопление HIF-1 α с последующей его димеризацией с HIF-1 β , который постоянно синтезируется в клетке независимо от концентрации кислорода. Образовавшийся гетеро-

димер HIF-1 α / β транслоцируется в ядро клетки, где связывается с консенсусной последовательностью 5-(A/G)CGTG-3' внутри области HRE (Hypoxia-Response Element), что активирует транскрипцию целевых генов.

Фактор HIF-1 может регулироваться также посредством взаимодействия с различными киназами (MAPK, PI3K/АКТ/mTOR) и другими транскрипционными факторами (p53, Мус, AP-1, NRF-2 и NF-κB) [43].

В ряде работ показано, что фактор NF-κB может быть прямым модулятором экспрессии HIF-1 не только в ответ на такие стимулы, как TNF-α и H₂O₂, но и на гипоксию [41, 42].

Взаимная регуляция факторов HIF-1 α и p53 в условиях И-Р может осуществляться двумя способами: 1) посредством конкуренции p53 и HIF-1 за общий коактиватор транскрипции CBP/p300, присутствующей в ограниченном количестве (определяющим фактором при этом является тяжесть гипоксии); 2) посредством того, что субъ-

единица HIF-1 α может взаимодействовать с E3 убиквитин-лигазой Mdm2 и снижать протеасомную деградацию p53, увеличивая тем самым его транскрипционную активность. Стоит также отметить, что p53 регулирует содержание белка Mdm2 на уровне транскрипции по принципу обратной связи [46].

Взаимодействие между HIF-1 и NRF2 зависит не только от АФК, но и от сложной сети передачи сигналов, точный механизм которой установлен не полностью [47]. Показано также, что ингибитор NRF2 — брусатол, подавляет HIF-1 α в клетках рака толстой кишки, способствуя его деградации в протеасомах [48]. Стоит отметить, что эти сигнальные пути не всегда работают согласованно. На культуре эндотелиальных клеток показано, что стабилизация HIF-1 α подавляет передачу сигналов NRF2 через транскрипционный фактор Bach1, тогда как индукция NRF2 андрографолидом снижает экспрессию HIF-1 α [49].

Взаимодействие между HIF-1 α и сигнальным путем PI3K/Akt/mTOR осуществляется главным образом через комплекс mTORC1. mTORC1 регулирует HIF- α преимущественно за счет повышения фосфорилирования белка 4E-BP1, а также трансляцию HIF-1 α , действуя через киназу S6K1 [50].

Транскрипционный фактор NRF2

Помимо HIF, особое место в регуляции клеточного гомеостаза в условиях И-Р отводится транскрипционному фактору NRF2, который регулирует экспрессию более 1000 генов, участвующих в клеточной пролиферации, метаболизме, иммунном ответе и передаче сигналов. NRF2 играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов, связанных с окислительно-восстановительным гомеостазом [51], таких как гены, ответственные за восстановление уровня NADPH (*G6pd*, *Pgd*, *Idh1*, *Me1*), метаболизм железа (*Hmox1*, *Ftl*, *Fth*), нейтрализацию свободнорадикальных и пероксидных АФК (*PRDX*, *SOD*, *GPX*) и т.д. [52].

Важность защитного действия NRF2 показана на модели И-Р сердца [53]. Обнаружено значительное снижение степени повреждения миокарда и сокращение восстановительного периода в группе мышей, получавших сероводород или 4-гидрокси-2-ноненаль для активации NRF2 перед этапом реперфузии [54].

NRF2 контролирует различные клеточные процессы, поэтому в зависимости от конкретных условий регуляция NRF2 может осуществляться на разных этапах сигнальных каскадов с участием множества киназ и других транскрипционных факторов. Например, транскрипционная активность NRF2 может регулироваться такими факторами, как Ahr, PPAR γ , Sp-1, p53, MEF2D, c-Jun, c-Myc, BRCA1, HIF-1 и NF- κ B [52, 53].

Важнейшую роль в регуляции транскрипционной активности NRF2 играет NF- κ B, который конкурентно взаимодействует с их общим коактиватором — CBP/p300. В результате увеличение уровня NF- κ B подавляет экспрессию гена *NRF2* и наоборот [52]. Помимо этого, в комплексе с белком HDAC (**H**istone **D**e**A**cetylase) NF- κ B может регулировать транскрипцию генов, контролируемых NRF2, путем деацетилирования гистонов в области ARE (**A**ntioxidant **R**esponse **E**lement), препятствуя связыванию NRF2 и запуску экспрессии целевых генов [57]. Обратным примером является ситуация, когда NRF2 при участии белка RAC1 (GTPase **R**as-related **C**3 botulinum toxin substrate 1) ингибирует NF- κ B, снижая тем самым его провоспалительную активность [58].

Регулировать NRF2 может также белок p53, который функционирует в качестве репрессора транскрипции генов, содержащихся в области ARE, что приводит к снижению транскрипционной активности NRF2. Кроме того (как и в случае с NF- κ B), взаимная регуляция NRF2 и p53 может происходить в результате конкуренции за общий коактиваторный белок CBP/p300 [56, 57].

NRF2-ARE-зависимые антиоксидантные функции могут регулироваться с помощью сигнального пути PI3K/AKT. На культуре эпителиальных клеток сетчатки (ARPE-19) показано, что ингибирование сигнального пути PI3K/AKT вортманнином и LY294002 приводит к снижению транскрипционной активности NRF2. Кроме того, NRF2 способен регулировать собственную экспрессию через ARE-подобный элемент, расположенный в проксимальной области его промотора, приводя к “затяжной” индукции его целевых генов [61]. Показано также, что в регуляции транскрипции NRF2 участвуют различные эпигенетические механизмы, такие как метилирование промотора *NRF2* в островках CpG, метилирование гистонов H3 и ацетилирование гистонов H4 [62].

На посттрансляционном уровне NRF2 регулируется путем протеасомной деградации его главного ингибитора — KEAP1 (**K**elch-like **E**CH-associated protein 1). В нормальных условиях одна молекула NRF2 ассоциирована с двумя молекулами ингибитора KEAP1. Комплекс NRF2-KEAP1 подвергается убиквитинированию, что приводит к его быстрой деградации в протеасомах. В условиях повышенного уровня АФК в клетке остатки цистеина в молекулах KEAP1 окисляются, что приводит к изменению их конформации и диссоциации комплекса KEAP1-NRF2. Освободившаяся молекула NRF2 стабилизируется и транслируется в ядро, где связывается с элементами ARE в геномной ДНК и запускает транскрипцию целевых генов. Помимо KEAP1, активность NRF2 может регулироваться такими белками, как β TrCP, CRIF1 (CR6-interacting Factor 1), HRd1 и

WDR23. Кроме того, в условиях окислительного стресса активность NRF2 может регулироваться путем посттрансляционной модификации – фосфорилированием Ser40 в домене Neh2 протеинкиназой С (PKC) [52].

Транскрипционный фактор NF-κB

Важную роль в регуляции клеточных процессов в условиях окислительного стресса играют не только факторы HIF-1 и NRF2, но и семейство фактора NF-κB. Этот фактор способен регулировать экспрессию более 100 генов, ответственных за иммунные реакции, пролиферацию и регенерацию. К числу генов, наиболее значимых в условиях И-Р, относятся гены цитокинов (IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α/β), хемокинов (IL-8, MIP1, RANTES), проапоптотических белков (Bax, Bim), антиапоптотических белков (Bcl, c-FLIP, TRAF), ферментов антиоксидантной защиты (SOD), регуляторов тонуса сосудов (iNOS, HO-1, аденомодулин, эндотелин-1) и молекул клеточной адгезии (Е-селектин, VCAM-1) [63].

Семейство NF-κB состоит из пяти белков: p50 (и его предшественник p105), p52 (и его предшественник p100), p65 (RelA), c-Rel и RelB, образующих до 15 комбинаций различных димеров. Гомодимеры p50 и p52 подавляют экспрессию генов, тогда как p65, c-Rel и RelB в любых сочетаниях (в том числе и с p50, и с p52) активируют транскрипцию [64]. Белки семейства Rel содержат домен RHD (Rel Homology Domain) – высококонсервативную N-концевую последовательность из ~300 аминокислотных остатков, необходимую для образования белковых димеров, связывания NF-κB с IκB, а также для транслокации в ядро клетки. Кроме RHD, эти белки содержат сигнал ядерной локализации NLS (Nuclear Localizing Signal), необходимые для ядерной транслокации [65].

Основными регуляторами NF-κB в нормальных условиях являются его ингибиторы – белки семейства IκB (IκB-α, IκB-β, IκB-γ, IκB-δ, IκB-ε и Bcl-3), все члены которого содержат от пяти до семи анкириновых повторов (Ankyrin Repeat Domain – ARD), которые опосредуют взаимодействие с областью RHD в NF-κB, обеспечивая тем самым его цитоплазматическую локализацию [66].

В условиях И-Р наблюдается увеличение содержания различных клеточных индукторов, таких как АФК, TNF-α, IL-1, способных (например, посредством сигнального пути TLR (Toll-like receptor)) активировать специфические IκB-киназы (IKK), катализирующие реакцию фосфорилирования остатков серина в области SRR (Signal Responsive Regions) IκB (например, Ser32 и Ser36 в IκBα). После этого фосфорилированные IκB модифицируются убиквитинлигазами семейства SCF или SCRF и направляются, в конечном сче-

те, на деградацию в 26S протеасому. В результате высвобожденный NF-κB транслоцируется в ядро, где связывается с консенсусной последовательностью (5'-GGGRNNYYCC-3', где R – пурин, Y – пиримидин, а N – любое основание) в области κB, стимулируя тем самым транскрипцию целевых генов [67].

Фактор NF-κB может регулироваться такими транскрипционными факторами, как AP-1, p53, NRF2, HIF-1, PI3K/Akt/mTOR и др. NF-κB взаимодействует с транскрипционным фактором AP-1 с помощью киназы ASK-1 с последующей активацией нижестоящих сигнальных каскадов (МКК4, МКК3/6, p38, JNK), в результате чего осуществляется регуляция роста, дифференцировки и апоптоза [68]. В свою очередь, ASK-1 активируется при окислении остатков цистеина под действием АФК [69]. Аналогичным образом происходит опосредованная АФК активация AP-1 – посредством окисления остатков цистеина с последующей активацией протеинкиназ (PTK, PKC, MAPK), фосфорилирующих c-Fos и c-Jun. AP-1 модулируется также путем окисления с последующим глутатионилированием остатков цистеина в семи субъединицах c-Fos и c-Jun. В свою очередь, AP-1 оказывает влияние на NF-κB [67, 68].

В регуляции NF-κB по эволюционно-консервативному механизму отрицательной обратной связи могут участвовать также киназы IKK/ТАК-1 и HIF-1. В ряде случаев HIF-1 регулирует NF-κB с помощью циклинзависимой киназы-6 (CDK-6) совместно с ингибитором p21, а также посредством активации TNF-α и IL-1β, мощных индукторов NF-κB [72].

Взаимная регуляция факторов NF-κB и p53 в условиях И-Р может осуществляться в результате конкуренции за общий коактиватор p300/CBP, причем эта конкуренция определяется тяжестью гипоксического состояния клетки. Стоит отметить, что способность p53 связываться с ДНК (консенсусная последовательность 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3') и активировать транскрипцию жестко регулируется посттрансляционными модификациями, важная роль среди которых принадлежит редокс-регуляции [73, 74]. NF-κB/RelA и p53 могут ингибировать активность друг друга путем прямого взаимодействия, в ходе которого образуются гетеродимеры/тетрамеры. Показано, что обработка культуры клеток индуктором p53 подавляет экспрессию генов-мишеней NF-κB [75, 76].

Регулировать NF-κB может также киназа АКТ – ключевой компонент сигнального пути PI3K/AKT/mTOR: АКТ фосфорилирует киназы IKKα и IKKβ, индуцируя тем самым их взаимодействие с IκB, что приводит к активации и ядерной транслокации NF-κB [77].

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR

Важным регулятором внутриклеточных процессов в условиях И-Р является сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR, центральные компоненты которого — фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), киназы AKT и mTOR, регулируют клеточные процессы настолько взаимосвязанно, что их рассматривают как единый сигнальный путь. Взаимная связанность этих процессов имеет решающее значение для осуществления различных функций клетки, таких как регуляция метаболизма, пролиферация и репарация [78].

PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа) — первый основной элемент сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, входит в семейство липидкиназ, способных катализировать перенос γ -фосфатной группы от АТФ в положение D3 фосфоинозитидов. Выделяют три класса PI3K, которые различаются строением, субстратной специфичностью и функциям в клетке [79]. Киназы PI3K класса I изучены наиболее полно и представляют наибольший интерес в этом сигнальном пути. Отличительная особенность киназ данного класса состоит в том, что они представляют собой гетеродимеры, содержащие две субъединицы — каталитическую (p110) и регуляторную (p85). В составе PI3K класса I выделяют два подкласса: IA и IB. Киназа подкласса IA состоит из одной регуляторной субъединицы, представленной пятью изоформами (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β или p55 γ), и одной каталитической, имеющей три изоформы (p110 α , p110 β или p110 δ). PI3K подкласса IB — это гетеродимерный белок, состоящий из регуляторного белка p101 (или p84) и связанной с ним каталитической субъединицы p110 γ . PI3K активируется в результате взаимодействия с АФК и мембранной рецепторной тирозинкиназой (RTK, Receptor Tyrosine Kinases) или PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor). На внутренней поверхности мембраны клеток происходит активация субъединицы p100, которая катализирует реакцию образования ключевого вторичного посредника фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PtdIns(3,4,5)P₃) из фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PtdIns(4,5)P₂). Образовавшийся PtdIns(4,5)P₃ взаимодействует с плекстрин-гомологичным (PH) доменом сигнальных киназ, таких как AKT и PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase) [79–81].

AKT — это серин/треониновая протеинкиназа, второй ключевой элемент сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, активация которой инициируется транслокацией в цитоплазматическую мембрану. Эта транслокация опосредована взаимодействием PH-домена AKT (находящегося в N-концевой области) с PtdIns(4,5)P₃ на мембране клетки. В мембране AKT фосфорилируется по двум аминокислотным остаткам — Thr308 в киназном до-

мене (киназой PDK-1) и Ser473 в гидрофобном мотиве (комплексом mTORC2) [78]. Активированный фосфорилированием AKT перемещается из мембраны в цитоплазму и ядро клетки, приобретает способность взаимодействовать с различными транскрипционными факторами, такими как FoxO (Forkhead box protein O), HIF-1, NRF2, NF- κ B, mTOR и др. и регулировать широкий спектр клеточных процессов: синтез белка, репарацию, пролиферацию и др. [82]. Так, показано [83], что путь PI3K/AKT/FoxO3a участвует в регуляции апоптоза нейронов в развивающемся мозге крысы. Активированный AKT фосфорилирует FoxO3a, что приводит к локализации FoxO3a в цитоплазме и ингибированию апоптоза [84]. Показано, что активаторы сигнального пути PI3K/AKT/FoxO3a: STS (Sodium Tanshinone IIA Sulfonate) и бромелаин защищают сердце крысы от И-Р-поражения [85]. Уровни белков AKT и HIF-1 α увеличиваются в ответ на гипоксию в мезенхимальных стволовых клетках человека, где уровень фосфорилированного AKT достигал пика раньше, чем HIF-1 α [86]. Установлено [87, 88], что ингибитор PI3K (LY294002) и двойной ингибитор PI3K/mTOR (NVP-BEZ235) могли подавлять активацию AKT, экспрессию HIF-1 α и VEGF при ишемии. В свою очередь, это увеличивает тяжесть заболевания. Подавлять экспрессию HIF-1 α может также вортманнин — ингибитор AKT [86].

mTOR — третий ключевой компонент сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, играет важную роль в регуляции роста и пролиферации клеток. mTOR участвует в мониторинге доступности питательных веществ, уровней клеточной энергии, кислорода и митогенных сигналов [89]. mTOR принадлежит к группе Ser/Thr-протеинкиназ суперсемейства PI3K класса IV. mTOR входит в состав двух разных комплексов — mTORC1 и mTORC2. Комплекс mTORC1 состоит из каталитической субъединицы mTORC1, RapTOR (regulatory associated protein of mTOR), PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), или G β L и PRAS40 (proline-rich PKB/AKT substrate 40 kDa). Этот комплекс является основным нижестоящим эффектором передачи сигналов от AKT и активируется посредством AKT-опосредованного ингибирования PRAS40 и TSC1-TSC2. В зависимости от условий mTORC1 контролирует широкий перечень клеточных процессов, фосфорилируя белки S6K, 4E-BP1, IKK, а также усиливая экспрессию фактора HIF-1 α [90, 91]. Комплекс mTORC2 состоит из субъединицы mTOR, Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR), mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1), Protor (protein observed rictor) и mLST8/G β L. Регуляторная активность mTORC2 не зависит от mTORK1. Считается, что mTORC2 опосредует

пролиферацию, выживание, организацию актинового скелета и метаболизм липидов путем фосфорилирования белков-мишеней, которые включают в себя АКТ, SGK (serum-/glucocorticoid-induced protein kinase) и некоторые виды РКС [92].

Передача сигналов в пути PI3K/АКТ/mTOR негативно регулируется с помощью опухолевых супрессорных фосфатаз, инозитолполифосфат-4-фосфатазы типа 2 (INPP4B) и гомолога тензина (PTEN), способных превращать PtdIns(3,4,5)P₃ в PtdIns(3)P. Известно также, что PTEN может окисляться и ингибироваться H₂O₂, приводя к активации PI3K/АКТ/mTOR. Показано, что PTEN может взаимодействовать с пероксиредоксином 1 (Prx1), защищая таким образом свой липидфосфатазный участок, локализованный в N-концевом домене, от инактивирующего действия H₂O₂ [93]. Установлено также, что активированная S6K (Ribosomal S6 Kinase p70, p70S6K) способна негативно регулировать PI3K/АКТ/mTOR путем фосфорилирования mTORC2, что приводит к снижению mTORC2-зависимого фосфорилирования Ser472 в составе АКТ [94].

СПОСОБЫ КОРРЕКЦИИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРFUЗИОННЫХ ПАТОЛОГИЙ

Гипотермия

Понижение температуры органа, подверженного И-Р, является одним из наиболее действенных подходов к снижению поражения тканей. Этот прием используется в трансплантологии еще с середины 20 века. Гипотермия обеспечивает обратимое снижение активности ферментных систем (особенно это важно в случае оксидаз) и скорости клеточного метаболизма в целом, а также минимизирует потребность тканей в кислороде [95]. Например, при снижении температуры до +4°C активность ферментов составляет всего 10% от исходных значений, а потребность тканей в кислороде снижается на 80–90%, что позволяет уменьшить тем самым энергетический дефицит [96]. Снижение активности оксидаз при гипотермии снижает продукцию АФК на стадии ишемии, а также тяжесть реперфузионного периода. Кроме того, гипотермия замедляет процессы деградации клеточных компонентов (активации протеаз и т.д.), стабилизирует мембрану клеток и снижает развитие острых воспалительных процессов на стадии реперфузии [97, 98]. Гипотермия оказалась эффективным нейрозащитным подходом при моделируемом на животных ишемическом инсульте [99]. Клинические исследования показали также лучшие неврологические исходы у пациентов с риском ишемического поражения головного мозга при использовании лечебной гипотермии [100]. Важно отметить, что применение

гипотермии недостаточно для эффективного сохранения ишемизированных органов, так как И-Р-поражение развивается также при восстановлении кровотока по мере согревания тканей. Кроме того, при гипотермии нарушается работа ионных каналов. Например, нарушение функции Ca²⁺-каналов вызывает перегрузку внутриклеточного кальция, что приводит к нарушению многих внутриклеточных процессов и развитию серьезных клеточных повреждений. Подавление активности АТР-зависимых Na⁺/K⁺-каналов приводит к перетоку ионов Na⁺ и Cl[–] вместе с водой из внеклеточного пространства во внутриклеточное, что может вызывать клеточный отек. Проблему отека изолированных органов при гипотермии отчасти решают добавлением в перфузирующий раствор сахаров (глюкоза, трегалоза, раффиноза) или маннитола, которые не проникают пассивно в клетки и удерживают внеклеточную воду, предотвращая тем самым отек клеток [101]. В качестве примера можно привести кардиоплегический раствор Кустадиол (Custodiol, или НТК – Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate), который нашел широкое применение при холодовой консервации донорских органов (сердце, почки, печень). Кустадиол, благодаря высокой концентрации калия (9 мМ), вызывает остановку сердца за счет деполяризации мембраны кардиомиоцитов, что снижает расход АТР и потребность клеток в кислороде. Высокое содержание гистидина (198 мМ) снижает ацидоз, вызванный накоплением анаэробных метаболитов во время длительного ишемического периода; кетоглутарат (1 мМ) способствует синтезу АТР на стадии реперфузии; триптофан (2 мМ) стабилизирует клеточную мембрану, а маннитол (30 мМ) уменьшает клеточный отек и нейтрализует свободные радикалы [102].

Интересно отметить, что гибернирующие млекопитающие (такие, как суслики) испытывают экстремальное понижение температуры тела (от 2 до 10°C) и проявляют высокую устойчивость к И-Р-поражению печени, сердца и тонкого кишечника во время зимней спячки. Потребление кислорода в тканях таких животных снижается до 2–3% от нормальных значений, при этом происходит переключение с углеводного обмена на липидный для обеспечения клеток энергией [103–105]. Такое метаболическое переключение снижает активность гликолиза и образование лактата, препятствуя тем самым развитию ацидоза (см. выше). Кроме того, увеличение метаболизма липидов приводит к образованию кетонных тел и активации рецепторов PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), которые защищают от И-Р-повреждения, модулируя экспрессию многих генов [106].

В настоящее время ведется поиск веществ, способных вызвать гипотермию, для клинического применения. Например, гипотермию могут

вызывать гормон желудка грелин, 5'-AMP, 3-йодтирозамин (T1AM) и газ H_2S . Механизмы действия таких соединений до конца не изучены, однако нет сомнений, что глубокое понимание этих механизмов позволит разработать новые медицинские стратегии [105].

Ишемическое пре- и посткондиционирование

Кроме гипотермии, одним из эффективных методов защиты тканей от И-Р-поражений является впервые испытанное в 1986 г. ишемическое preconditionирование (ИПК), которое позволяет активировать эндогенную систему антиоксидантной защиты (в первую очередь, ферменты-антиоксиданты), способствуя увеличению устойчивости клеток к АФК на стадии реперфузии [107]. Методологически ИПК представляет собой серию (3–4 цикла) коротких этапов ишемии (3–5 мин) с последующей реперфузией (5 мин). На различных животных моделях И-Р-поражения сердца, почек, печени, легких, кишечника, мозга убедительно показано, что такая “подготовка” к более длительной ишемии способствует существенному сохранению тканей. Например, четыре коротких эпизода окклюзии коронарной артерии, чередующиеся с пятиминутными периодами реперфузии перед длительной (40 мин) ишемией сердца, уменьшали зону инфаркта на 70–80% [108]. ИПК может осуществляться с применением как физиологических приемов (кратковременная окклюзия сосудов), так и с помощью фармакологических препаратов. Среди препаратов, вызывающих эффект preconditionирования, можно отметить аденозин, агонисты рецепторов аденозина, препараты, открывающие K^+ATP -каналы (никорандил), доноры оксида азота (нитриты), агонисты РКС (кальфостин С), соединения лития (ингибиторы киназы гликогенсинтазы-3 β (GSK-3 β)), ингаляционные анестетики (изофлюран) и др. [103, 105, 106].

Однако применение ИПК не всегда возможно, так как этот подход работает только непосредственно перед ишемией, при развитии окислительного стресса после реперфузии он неэффективен. Отчасти эта проблема решается с помощью ишемического посткондиционирования (ИПостК) — метода, успешно примененного на миокарде крыс в 2003 г. [111]. ИПостК представляет собой серию коротких ишемических стимулов (например, три цикла: 30 с ишемия, 30 с реперфузия), выполненных в раннем реперфузионном периоде, что, как и в случае ИПК, запускает, вероятно, эндогенные защитные механизмы [108, 109]. ИПостК более привлекателен для клинического применения, поскольку его можно быстро вызвать в начале реперфузии с помощью серии коротких циклов И-Р после серьезного ишемического события. На сегодняшний день изучены различные

способы фармакологического ИПостК, а также проведены доклинические испытания некоторых препаратов на животных моделях. К таким препаратам относятся агенты, воздействующие на различные рецепторы (аденозиновые, α -адренергические, опиоидные, брадикининовые, эстрогеновые) или активирующие различные сигнальные пути клетки PI3K/AKT (GY4137, генистеин), HIF-1 α (сенофлуран), GSK3 β (сфингозин-1-фосфат — S1P), JNK (морфин, налоксон) [113].

Ингибиторы оксидаз

Одним из наиболее эффективных подходов к предотвращению И-Р-поражений принято считать ингибирование некоторых ключевых оксидаз, таких как XO, NADPH-оксидазы (NOX/DUOX) и моноаминоксидазы (MAO). Эти оксидазы провоцируют стремительный рост уровня АФК в ишемизированных тканях на стадии реперфузии, причем не только в месте развития ишемии. Например, XO может попадать в плазму крови и связываться с поверхностью эндотелия сосудов органов, не подверженных ишемии, вызывая тем самым системное повреждение. Показано, что иммуноблокада с помощью антител к циркулирующей в плазме XO защищает легочное сосудистое русло от пагубного воздействия И-Р-поражения кишечника [114]. Как отмечено ранее, XO — патологический вариант XDH, образующийся либо в результате окисления остатков цистеина, либо частичного протеолиза кальпаинами. XO — гомодимерная молибден-содержащая оксидоредуктаза, содержащая дополнительные кофакторы: железосерный кластер ферредоксина (2Fe-2S) и FAD. XO окисляет пурины (гипоксантин и ксантин) до мочевой кислоты, используя при этом в сопряженной реакции вместо NAD^+ (как и XDH) молекулярный кислород O_2 , который окисляет до O_2^- . Показано, что применение ингибиторов XO позволяет существенно снизить индуцированную И-Р проницаемость сосудов и снизить тяжесть И-Р-повреждений [115]. При этом эффективность таких ингибиторов зависит как от их природы, так и от патологии, при которой их применяют. Например, пуриновые ингибиторы (неокисляемые аналоги гипоксантина — аллопуринол и оксипуринол) более эффективно предотвращают развитие сердечно-сосудистых патологий, чем непуриновые (фебуксостат и топилоксостат) [116].

Ингибиторы NADPH-оксидаз относятся к наиболее перспективным терапевтическим средствам при заболеваниях, связанных с окислительным стрессом. В норме NADPH-оксидазы (преимущественно NOX2) участвуют в иммунной защите организма в случае так называемого кислородного взрыва в фагоцитах, при котором в 10–20 раз увеличивается потребление O_2 и его

окисление до супероксидного анион-радикала ($\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$). NADPH-оксидаза (NOX) состоит из цитозольных (p47phox, p67phox, p40phox и Rac) и мембранных субъединиц (gp91phox и p22phox). Во время активации NOX (в том числе при ишемии) цитозольные субъединицы фосфорилируются киназами, мигрируют к плазматической мембране для “стыковки” с мембранными субъединицами и образуют многокомпонентный фермент, генерирующий O_2^- [117]. Следует также отметить, что в области ишемии развиваются провоспалительные процессы, которые способствуют активации NOX в полиморфноядерных нейтрофилах. Таким образом, NOX играют ключевую роль в генерации O_2^- на стадии реперфузии [118, 119]. Первые ингибиторы NADPH-оксидаз (апоцинин и дифенилениодоний) не проявляли достаточной селективности к различным изоформам NOX. Новые селективные ингибиторы NOX, такие как GKT137831, ML171 и VAS2870, более специфичны и селективны в отношении различных изоформ NADPH-оксидаз. С помощью рационального дизайна разработан селективный ингибитор NOX2 — 18-членный пептид NOX2ds-tat, содержащий последовательность из 9 аминокислотных остатков внутриклеточной В-петли NOX2, которая связывает белок-организатор p47phox, тем самым предотвращая сборку активного комплекса NOX2 [120]. Вторая часть пептида (ТАТ-фрагмент транскриптора транскрипции ВИЧ) обеспечивает проникновение всего пептида в клетку. NOX2ds-tat показал свою эффективность в условиях *in vivo* на животных моделях [119]. Таким образом, разработка изоформ-специфичных ингибиторов NOX позволит избирательно подавлять изоформы NOX, активация которых выявлена при определенных патологиях. На сегодняшний день препарат GKT137831 (специфический ингибитор NOX1/4) является первым ингибитором NOX, проходящим клинические испытания в качестве средства для лечения идиопатического легочного фиброза [115, 117].

Еще один важный источник АФК при И-Р-поражениях — флавоферменты MAO, расположенные на внешней мембране митохондрий, которые катализируют окислительное дезаминирование катехоламинов, серотонина и биогенных аминов. В ходе дезаминирования, катализируемого MAO, образуется соответствующий альдегид, а также H_2O_2 и аммиак или замещенный амин, в зависимости от субстрата. Гиперактивация MAO и рост количества продуктов их катализа негативно влияют на функцию митохондрий и жизнеспособность клетки в целом. Избыточную активность MAO связывают с различными патологическими состояниями [122, 123]. Важная роль MAO в мета-

болизме нейротрансмиттеров сделала их терапевтическими мишенями при глубокой депрессии и болезни Паркинсона, а также при других нейродегенеративных заболеваниях. Уже в конце 1950-х годов было одобрено применение первых ингибиторов MAO при глубокой депрессии. Обнаружение двух изоферментов MAO (MAO-A и MAO-B) с различной субстратной избирательностью и тканевой экспрессией привело к новым терапевтическим подходам и разработке новых классов ингибиторов (обратимых/необратимых). В настоящее время различные ингибиторы MAO проходят испытания в качестве средств для лечения болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза и сердечно-сосудистых заболеваний [124].

Доноры сероводорода

Долгое время сероводород (H_2S) считали токсичным газом, который обратимо ингибирует цитохром-с-оксидазу (COX) ЭТЦ митохондрий, тем самым подавляя окислительное фосфорилирование и снижая уровень АТФ. В настоящее время H_2S рассматривается как третий сигнальный газотрансмиттер (после NO и CO), выполняющий широкий спектр физиологических и патофизиологических функций в организме. Сегодня убедительно показано, что применение H_2S и его предшественников может оказывать защитный эффект при реперфузионном повреждении.

В норме H_2S вырабатывается различными типами клеток и может легко диффундировать (как и в случае с NO и CO) во внутриклеточном и межклеточном пространстве, не нуждаясь в транспортерах. Снижение уровня H_2S в организме связывают с развитием целого ряда патологических состояний, таких как гипертония, сахарный диабет, атеросклероз, сердечная недостаточность, сепсис, воспаление, катаракта, астма и нейродегенеративные заболевания [125]. Напротив, при избыточной продукции H_2S (например, при трисомии хромосомы 21) прогрессирование таких свободнорадикальных патологий, как атеросклероз, происходит медленнее [126]. H_2S снижает образование окисленных липопротеинов низкой плотности (oxLDL), подавляет экспрессию скавенджер-рецепторов (ответственных за накопление oxLDL), препятствуя тем самым образованию пенных клеток из макрофагов и прогрессированию атеросклероза [125].

В низких концентрациях H_2S стимулирует деятельность митохондрий, выступая в качестве донора электронов с эффектом, сравнимым с работой NADH или FADH_2 . На стадии ишемии H_2S может способствовать поддержанию энергетического гомеостаза, снижая негативное влияние гипоксии [127], участвуя в регуляции активности

нейронов, вазодилатации сосудов, регуляции уровня глюкозы [128]. Кроме того, благодаря беспрепятственной диффузии, H_2S влияет и на другие регуляторные молекулы [129]. В частности, взаимодействуя с остатками цистеина, H_2S влияет на активность важнейшего регулятора антиоксидантного ответа NRF2 [130], АТР-чувствительные калиевые каналы митохондрий (КАТР) [131], рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) [132] и рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) [133]. Показано, что H_2S увеличивает экспрессию VEGF, действуя через сигнальный путь PI3K/АКТ и активацию HIF-1 α , стимулируя тем самым ангиогенез [134]. H_2S способствует повышению уровня глутатиона (GSH) и антиоксидантных белков (гемоксигеназа-1, глутатион-S-трансферазы и тиоредоксин-1) в клетке. Кроме того, через опосредованные АКТ сигнальные пути H_2S подавляет открытие митохондриальной поры (mPTP), высвобождение цитохрома c и активацию каспаз, тем самым препятствуя развитию апоптоза [135].

Появляется все больше доказательств того, что H_2S может защищать от И-Р-повреждения различные органы и ткани (сердце, печень, почки, мозг, легкие, кишечник и др.) [136]. Газ H_2S достаточно сложно дозировать из-за его летучести, высокой растворимости и скорости диффузии, что может привести к токсическому действию. В этой связи разработаны соединения, которые постепенно высвобождают H_2S . На сегодняшний день известно более 60 таких веществ, которые можно разделить на два основных типа: 1) истинные доноры H_2S и 2) гибридные препараты, содержащие другое действующее вещество [128]. В качестве доноров H_2S широко используются неорганические соли: сульфиды (Na_2S , CaS), гидросульфиды ($NaHS$) и тиосульфаты ($Na_2S_2O_3$). При этом максимальная концентрация H_2S , высвобождаемого из таких солей, достигается за несколько секунд—минут, следовательно, эффективное время пребывания H_2S в пораженных тканях очень короткое. Идеальные доноры H_2S для терапевтических целей должны генерировать H_2S с относительно медленным высвобождением и более длительным временем пребывания в организме. За последнее время разработаны и синтезированы различные гибридные препараты, медленно высвобождающие H_2S и при этом оказывающие антиапоптотическое, противовоспалительное и антиоксидантное действие [128, 136].

Возможность использования H_2S и его предшественников при И-Р-повреждениях нуждается в дальнейшем изучении, так как до сих пор известны не все молекулярные мишени H_2S , а долгосрочные последствия применения доноров H_2S не исследованы. Вероятно, создание новых эф-

фективных доноров H_2S , подбор оптимальных способов их применения (способы введения, временной диапазон применения, эффективные концентрации и т.д.) позволит внедрить их в клиническую практику.

Препараты, направленные на митохондрии

Как отмечалось ранее, митохондрии — основной источник АФК в клетке. При И-Р роль митохондрий как источника энергии, АФК и важнейшего регулятора программируемой клеточной гибели (митофагии, аутофагии и апоптоза) многократно возрастает. Хорошо известно, что в гибели клеток с участием митохондрий ведущую роль играет mPTP [8]. Избыток Ca^{2+} в матриксе митохондрий, возникающий при дисфункции ионных каналов, инициирует открытие mPTP и гибель клеток. При этом открытие mPTP является мощным стимулом образования митохондриальных АФК, которые, в свою очередь, усиливают открытие mPTP и провоцируют взрывной рост АФК [137]. Таким образом, открытие mPTP приводит к митохондриальной дисфункции и, в конечном счете, к гибели клетки. Поэтому mPTP, как объект фармакологического воздействия, представляет значительный интерес [138]. Следует отметить, что точная структура mPTP до сих пор не определена. Не вызывает сомнений, что mPTP — это комплекс белков внешней и внутренней мембраны митохондрий. При этом единственным точно установленным компонентом, входящим в mPTP, является циклофилин D (CypD), который в присутствии ионов Ca^{2+} стимулирует перестройку комплекса белков, ответственных за формирование канала mPTP [139], поэтому большинство известных ингибиторов mPTP нацелены на CypD. Современные ингибиторы mPTP можно разделить на две большие категории: 1) ингибирующие CypD и 2) ингибирующие mPTP через CypD-независимые механизмы [140].

Одним из первых обнаруженных ингибиторов CypD был циклоспорин А (CsA). Первые клинические испытания CsA показали, что его введение в ходе чрескожного коронарного вмешательства приводит к 40%-ному уменьшению размера инфаркта у пациентов с реперфузионным повреждением [141]. Однако более масштабные и детальные клинические исследования не позволили выявить статистически значимой разницы между контрольной (плацебо) и экспериментальной группами с применением CsA, что может быть связано с узким терапевтическим окном и побочным иммуносупрессивным действием CsA. Создание полусинтетических модифицированных форм CsA (NIM-811, Debio025/alisporivir), не обладающих иммуносупрессивными свойствами, отчасти решает эту проблему и позволяет наде-

яться на появление новых эффективных ингибиторов mPTR.

Первым СурD-независимым ингибитором, который связывается с белком-транслокатором TSPO (известным также как периферический бензодиазепиновый рецептор — PBR), находящимся на внешней мембране митохондрий, стал TRO-40303. Однако в дальнейшем установили, что TSPO не участвует в образовании mPTR, а клинические испытания предсказуемо показали его неэффективность. В настоящее время активно изучают другие СурD-независимые ингибиторы mPTR (ER-000444793, GNX-4975, GNX-4728 и др.), которые, возможно, будут более эффективно подавлять открытие mPTR [140, 142].

Сегодня развиваются также альтернативные подходы к ингибированию открытия mPTR, направленные на процессы (сигнальные пути), предшествующие открытию mPTR. К таким подходам относятся модуляция окислительно-восстановительного состояния митохондрий, коррекция/защита функции ЭТЦ митохондрий, а также регуляция концентрации внутриклеточного и митохондриального Ca^{2+} [140].

Антиоксиданты

Как отмечено ранее, в основе патогенеза И-Р-поражения лежит гиперпродукция АФК на стадии реперфузии и развитие окислительного стресса. С помощью электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) показано, что образование свободнорадикальных форм АФК (в первую очередь O_2^-) в ишемизированных тканях миокарда начинается уже в первые секунды реперфузии [143]. На более поздних стадиях реперфузии в тканях, подверженных И-Р-поражению, детектируются характерные продукты свободнорадикального окисления липидов (МДА, 4-гидроксиноненаль, акролеин), белков (карбонильные модификации) и нуклеиновых кислот (8-оксо-dG) [31]. Такие окислительные модификации приводят к дисфункции биологических макромолекул, накоплению мутаций и, в конечном счете, к гибели клетки.

В многочисленных экспериментах показано, что животные, имеющие дефицит антиоксидантов (как низкомолекулярных, так и ферментов), более чувствительны к действию И-Р. Напротив, животные с суперэкспрессией ферментов-антиоксидантов (SOD, GPx, Prx) проявляют устойчивость к И-Р [144].

Низкомолекулярные антиоксиданты. Одними из первых соединений, изученных в начале 50-х годов 20 века в качестве антиоксидантов и радиопротекторов, в частности, были цистеин, глутатион, цистамин и их аналоги. Самыми эффективными оказались соединения, содержащие сульфид-

рильную и аминогруппу, из которых наиболее известны N-ацилцистеин, цистамин, меркаптопропионилглицин, производные тиомочевины, бигуаниды, диэтилдитиокарбамат и 2-меркаптоэтансульфонат натрия [145]. Приведем несколько примеров применения низкомолекулярных антиоксидантов при И-Р-поражениях.

Внутривенное введение N-ацетилцистеина при аортокоронарном шунтировании приводило к почти двукратному снижению уровня супероксидного анион-радикала (O_2^-), H_2O_2 и гипохлорита (HClO^-) в пробах крови пациентов [146]. Кроме того, применение N-ацетилцистеина в период реперфузии статистически значимо снижало уровень МДА в крови, тогда как уровень активности антиоксидантных ферментов (SOD и GPx) при этом значимо повышался [147].

Метформин, изначально применяемый при сахарном диабете типа 2, проявляет плеiotропный эффект [148]. В частности, в серии исследований показано, что метформин может предотвращать реперфузионное повреждение сердца. Оказалось, что метформин ингибирует комплекс I в ЭТЦ митохондрий, подавляя тем самым производство АФК и оказывая антиоксидантный эффект, способствуя снижению повреждений в реперфузионный период [149]. Кроме того, кардио-защитный эффект метформина при ишемии опосредован активацией протеинкиназы AMPK (5'-AMP-активируемая киназа) [150].

На сегодняшний день одобрено клиническое применение мощного антиоксиданта — эдаравона, который подавляет образование АФК, открытие mPTR и запуск ферроптоза [151]. Эдаравон проявил высокую эффективность в различных моделях И-Р-поражения: мозга, сердца, печени, почек и легких [140, 152–154].

Особое место среди низкомолекулярных антиоксидантных препаратов занимают митохондриально-направленные соединения. К таким препаратам относятся хиноны: MitoQ10 (на основе убихинона), SkQ и его производные (на основе пластохинона), подавляющие генерацию O_2^- в ЭТЦ митохондрий [151, 152]. Защитный эффект этих веществ показан на различных клеточных и животных моделях патологических состояний, связанных с окислительным стрессом (И-Р-поражения, сахарный диабет, нейродегенеративные заболевания, старение и т.д.). Например, обнаружен защитный эффект SkQR1 при И-Р-поражении почек и мозга лабораторных животных [155–159].

Селен-содержащие соединения. Изучение селен-содержащих соединений выявило перспективность их применения при И-Р-повреждениях. Использование селен-содержащих продуктов позволяет повысить активность ферментов (в первую очередь, селен-содержащих глутатионпе-

роксидаз), содержащих селеноцистеин, что особенно важно в условиях хронического окислительного стресса (например, при воспалительных процессах). Однако важно отметить достаточно узкий диапазон допустимой концентрации селена, который, с одной стороны, покрывает дефицит селена, а с другой — не оказывает токсического действия. В этой связи для терапевтического применения селена очень важно подобрать оптимальную дозу препарата [160]. По-видимому, наибольший интерес представляет селен в форме наночастиц, учитывая их большую биодоступность и безопасность. Высокая эффективность наночастиц селена показана на моделях И-Р-поражения мозга [161].

Миметики антиоксидантных ферментов. Миметики ферментов, представляют собой низкомолекулярные соединения, имитирующие активность ферментов. В настоящее время известны миметики SOD, CAT и GPx. Одними из первых были синтезированы миметики SOD — комплексы органических соединений с ионами железа, меди, цинка, никеля и марганца. Комплексы марганца более предпочтительны, поскольку марганец лучше переносится клетками и не катализирует реакции Фентона и Габера—Вейса, генерирующие образование высокореакционного и токсичного гидроксильного радикала $\text{HO}^\bullet$. Известные миметики MnSOD включают комплексы марганца с такими соединениями, как порфирины, салены, циклические полиамины, фталоцианины или пептидные лиганды [162]. Некоторые миметики SOD обладают несколькими антиоксидантными активностями. Например, EUK-134, комплекс ароматического соединения с марганцем, проявляет не только супероксид-дисмутазную активность, но и пероксидазную, оказывая тем самым мощный антиоксидантный эффект [163, 164]. В настоящее время ведутся активные работы по синтезу новых миметиков SOD [165].

На сегодняшний день известно более 70 селен-содержащих органических соединений, которые обладают антиоксидантными свойствами. Эбселен, имитирующий активность GPx, показал многообещающие результаты в ряде исследований [166]. Показано, что эбселен эффективно восстанавливает пероксид водорода и пероксинитрит, благодаря чему защищает почки от окислительного повреждения после ишемии. Кроме того, применение эбселена улучшает состояние головного мозга пациентов, перенесших окклюзионную ишемию [167]. Ведутся работы по получению аналогов эбселена с новыми фармакологическими свойствами [168].

Некоторые наночастицы оксидов металлов, таких как CeO_2 , TiO_2 и Fe_3O_4 , проявляют антиоксидантные свойства, имитируя ферменты-антиоксиданты. Простой способ получения таких со-

единений, относительно низкая токсичность, гибкость в их модификации возможность делает их привлекательными для применения в различных областях, в том числе в биомедицине [169].

Миметики представляют значительный интерес для применения в лечении патологий, связанных с окислительным стрессом, так как, обладая схожими каталитическими свойствами с имитируемыми ферментами-антиоксидантами, они имеют относительно малые размеры и благодаря этому легче проникают в клетки. Однако, несмотря на ряд преимуществ миметиков по сравнению с исходными ферментами, в условиях *in vivo* они оказываются малостабильными. Кроме этого, миметики все же уступают исходным ферментам по активности, а в ряде случаев могут проявлять токсичность [170].

Экзогенные ферменты-антиоксиданты. Несомненно, наиболее эффективным способом элиминации АФК является ферментативный катализ. Среди ферментов-антиоксидантов наиболее известны SOD, CAT, (GPx), глутатион-S-трансферазы (GST), тиоредоксины (Trx), пероксиредоксины (Prdx) и др. Несмотря на широкий спектр известных ферментов антиоксидантного действия, лишь немногие из них нашли практическое применение.

SOD относится к важнейшим антиоксидантным ферментам, осуществляющим дисмутацию супероксид анион-радикала в менее опасный пероксид водорода: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (SOD). Уже спустя 5 лет после открытия SOD (1969 г.) и понимания их важнейшей функции в клетке, были предприняты попытки их применения для коррекции лучевой болезни. Применение экзогенных SOD для коррекции И-Р-поражений началось значительно позже (1987 г.). Эксперименты на животных моделях И-Р показали, что применение экзогенной Cu/Zn-содержащей SOD уменьшает реперфузионное повреждение тканей: желудка [171], сердца [172], почек [173] и головного мозга [174]. В связи с тем, что время полужизни экзогенной Cu/Zn-SOD в крови животных составляет всего около 6 мин, первые результаты хоть и обнадеживали исследователей, но зачастую были противоречивыми. Модификация SOD с помощью ковалентной сшивки с полиэтиленгликолем (PEG) увеличивала период полураспада до 25–36 ч [175]. PEG-модифицированные Cu/Zn-SOD были успешно испытаны в экспериментальных моделях И-Р мышц [176], сердца [177], мозга [178, 179], печени [180] и почек [173]. Применение PEG-Cu/Zn-SOD существенно снижало уровень перекисного окисления липидов, способствовало сохранению нормальной морфологии тканей и функции ишемизированных органов. Аналогичные эксперименты проведены с Mn-содержащей SOD. На животной модели остро-

го почечного поражения показана нефропротекторная активность рекомбинантной Mn-SOD человека [181]. Разработка новых подходов и способов применения SOD остается перспективным направлением для профилактики/лечения И-Р-поражений [182].

Уже в ранних работах по применению SOD в качестве антиоксидантов при И-Р-поражениях было предложено одновременно применять каталазу [183], которая нейтрализует образующийся пероксид водорода: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (CAT). Позднее были проведены испытания как исходных форм SOD и CAT, так и их конъюгированных и модифицированных форм, которые показали высокую эффективность химерных ферментов (SOD и CAT) [184].

Пероксиредоксины (Prdx) – сравнительно недавно открытые ферменты, относятся к эволюционно древней группе тиоредоксин-подобных пероксидаз. Для катализа Prdx используют консервативный остаток Cys в активном центре. Эффективность катализа Prdx ниже, чем у CAT или селен-содержащих GPx, однако Prdx проявляют максимальную активность при физиологически допустимых микромолярных (до 200 мкМ) концентрациях гидропероксидов, в отличие от CAT и GPx (проявляют активность в миллимолярных концентрациях, которые практически не встречаются в живой клетке) [144]. При этом Prdx обладают наиболее широкой среди всех известных пероксидаз субстратной специфичностью. Prdx способны восстанавливать различные неорганические (H_2O_2 , пероксинитрит) и органические (алкилгидропероксиды, пероксиды фосфолипидов и т.д.) гидропероксиды, тем самым играя важную роль в регуляции редокс-гомеостаза клетки. Кроме пероксидазной функции, Prdx проявляют шаперонную, фосфолипазную, сигнально-регуляторную и иммуномодулирующую активность [144, 185, 186]. Учитывая вышесказанное, применение Prdx для нейтрализации окислительного стресса представляется перспективным подходом. Действительно, на животных моделях И-Р-поражения было показано, что введение пероксиредоксинов и их модифицированных форм (в том числе химерный белок, содержащий MnSOD и Prdx6) [187–189] до реперфузионного периода существенно снижает ишемическое поражение сердца [184, 185], кишечника [186, 187] и почек [190–192]. Экзогенные Prdx подавляют окислительные процессы и способствуют сохранению морфофункционального состояния ишемизированных тканей, увеличивая выживаемость экспериментальных животных. Помимо нейтрализации гидропероксидов, экзогенные Prdx вызывают индукцию экспрессии NO-синтаз в ишемизированных тканях и последующий рост уровня NO в крови, что приводит к вазодилата-

ции сосудов, подавлению тромбообразования и быстрой нормализации микроциркуляции кровотока при И-Р [193, 194].

Активному внедрению ферментов-антиоксидантов препятствует их ограниченная биодоступность и недостаточная стабильность. Однако генно-инженерные и биохимические методы модификации белков позволяют успешно решить эти проблемы. Генно-инженерные подходы позволяют получать ферменты с PTD-пептидами (PTD – Protein Transduction Domain), которые обеспечивают их проникновение в клетки и тем самым расширяют биодоступность [195]. Конъюгирование ферментов с полиэтиленгликолем или сахарами (галактозой или маннозой) позволяет существенно повысить устойчивость к действию протеаз и в несколько раз увеличить время их действия в организме [171, 192]. Инкапсуляция ферментов в наночастицы, гидрогели или липосомы позволяет защитить их от действия протеаз и увеличить время полужизни белков [196, 197]. Помимо инкапсуляции, эффективным способом доставки ферментов-антиоксидантов является их сорбция на поверхности наночастиц, которые сами могут обладать антиоксидантным потенциалом (наночастицы оксида/фторида церия, селена и т.д.), что может оказывать синергичный эффект [198]. Имобилизация ферментов-антиоксидантов на суперпарамагнитных наночастицах оксида железа (SPION) позволяет значительно повысить эффективность их терапевтического действия при последующем их введении в организм и удержании с помощью внешнего магнитного поля в зоне ишемического поражения, [199].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, И-Р-поражение представляет собой сложный каскад взаимосвязанных патологических молекулярно-клеточных событий, включающий нарушения аэробного метаболизма, осмотического, ионного и окислительно-восстановительного гомеостаза, а также развитие острых иммунных реакций.

Несмотря на длительное и всестороннее исследование патогенеза И-Р-поражений, очевидно, что многие молекулярные механизмы еще ждут своего открытия. Глубокое понимание этих механизмов позволит более точно прогнозировать течение заболеваний, патогенез которых связан с И-Р-поражением, а также будет способствовать поиску новых эффективных стратегий лечения.

Рассмотренные современные подходы к предупреждению и лечению И-Р-поражений не позволяют в должной мере защитить пораженные ткани и органы. Наиболее перспективным представляется использование комбинации препара-

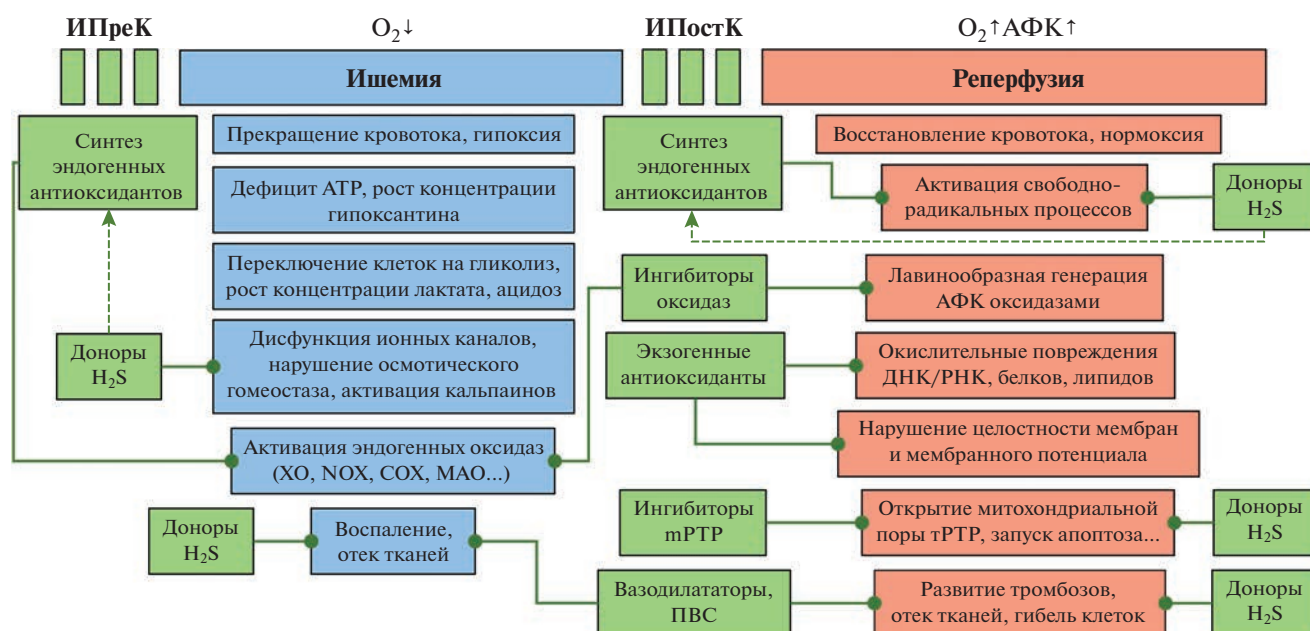


Рис. 3. Основные подходы к коррекции И-Р-поражений. ИПреК (ишемическое прекодиционирование) и ИПостК (ишемическое посткодиционирование) активируют эндогенные системы защиты, в первую очередь, антиоксидантную. Пунктирные стрелки обозначают стимулирующий эффект, сплошные линии с точкой — ингибирующее действие. Применение ингибиторов оксидаз, ингибиторов Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры (mPTP), экзогенных антиоксидантов, доноров H_2S , вазодилаторов/антикоагулянтов, противовоспалительных средств (ПВС) возможно как до, так и после ишемии, а также в ходе реперфузии.

тов, направленных на различные ключевые звенья сложной цепи патологических процессов при И-Р (рис. 3). Например, применение экзогенных антиоксидантов для нормализации уровня АФК и подавления свободнорадикальных процессов в очаге поражения с одновременным применением ингибиторов оксидаз будет способствовать наиболее эффективному сохранению и более быстрому восстановлению тканей. Однако применение комбинированных препаратов требует дальнейших детальных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00013).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hardev Ramandeep Singh Girm., Ahilathirunayagam S., Mavor A.I.D., Homer-Vanniasinkam S. (2007) Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc. Endovasc. Surg.* **41**, 277–293.
- Soares R.O.S., Losada D.M., Jordani M.C., Évora P., Castro-E-Silva O. (2019) Ischemia/reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5034.
- Dar W.A., Sullivan E., Bynon J.S., Eltzschig H., Ju C. (2019) Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: cellular and molecular mechanisms. *Liver Int.* **39**, 788–801.
- Chen Z., Tian R., She Z., Cai J., Li H. (2020) Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* **152**, 116–141.
- Wu M.Y., Yiang G.T., Liao W.T., Tsai A.P.Y., Cheng Y.L., Cheng P.W., Li C.Y., Li C.J. (2018) Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol. Biochem.* **46**, 1650–1667.
- Eltzschig H.K., Eckle T. (2011) Ischemia and reperfusion — from mechanism to translation. *Nat. Med.* **17**, 1391–1401.
- Mishra P.K., Adameova A., Hill J.A., Baines C.P., Kang P.M., Downey J.M., Narula J., Takahashi M., Abbate A., Piristine H.C., Kar S., Su S., Higa J.K., Kawasaki N.K., Matsui T. (2019) Guidelines for evaluating myocardial cell death. *Am. J. Physiol. — Heart Circ. Physiol.* **317**, H891–H922.
- Bauer T.M., Murphy E. (2020) Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death. *Circ. Res.* **126**, 280–293.
- van Golen R.F., Reiniers M.J., Marsman G., Alles L.K., van Rooyen D.M., Petri B., Van der Mark V.A., van Beek A.A., Meijer B., Maas M.A., Zeerleder S., Verheij J., Farrell G.C., Luken B.M., Teoh N.C., van Gu-

- lik T.M., Murphy M.P., Heger M. (2019) The damage-associated molecular pattern HMGB1 is released early after clinical hepatic ischemia/reperfusion. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* **1865**, 1192–1200.
10. Gong L., Pan Q., Yang N. (2020) Autophagy and inflammation regulation in acute kidney injury. *Front. Physiol.* **11**, 576463.
11. Воробьева Н.В. (2020) Нейтрофильные внеклеточные ловушки: новые аспекты. *Вест. Моск. ун-та Сер. 16 Биология.* **75**, 210–225.
12. Kim S.W., Lee H., Lee H.K., Kim I.D., Lee J.K. (2019) Neutrophil extracellular trap induced by HMGB1 exacerbates damages in the ischemic brain. *Acta Neuropathol. Commun.* **7**, 94.
13. Raedschelders K., Ansley D.M., Chen D.D.Y. (2012) The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol. Ther.* **133**, 230–255.
14. Zhou T., Chuang C.C., Zuo L. (2015) Molecular characterization of reactive oxygen species in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 864946.
15. Bugger H., Pfeil K. (2020) Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* **1866**, 165768.
16. Matsushima S., Sadoshima J. (2022) Yin and Yang of NADPH oxidases in myocardial ischemia-reperfusion. *Antioxidants.* **11**, 1069.
17. Lambeth J.D., Krause K.H., Clark R.A. (2008) NOX enzymes as novel targets for drug development. *Semin. Immunopathol.* **30**, 339–363.
18. Loukogeorgakis S.P., Van Den Berg M.J., Sofat R., Nitsch D., Charakida M., Haiyee B., De Groot E., MacAllister R.J., Kuijpers T.W., Deanfield J.E. (2010) Role of NADPH oxidase in endothelial ischemia/reperfusion injury in humans. *Circulation.* **121**, 2310–2316.
19. Nakagiri A., Sunamoto M., Murakami M. (2007) NADPH oxidase is involved in ischaemia/reperfusion-induced damage in rat gastric mucosa via ROS production – role of NADPH oxidase in rat stomachs. *Inflammopharmacology.* **15**, 278–281.
20. Förstermann U., Sessa W.C. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837.
21. Xu F., Mack C.P., Quandt K.S., Schlafer M., Massey V., Hultquist D.E. (1993) Pyrroloquinoline quinone acts with flavin reductase to reduce ferryl myoglobin *in vitro* and protects isolated heart from reoxygenation injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 434–439.
22. McLeod L.L., Alayash A.I. (1999) Detection of a ferrylhemoglobin intermediate in an endothelial cell model after hypoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol – Heart Circ. Physiol.* **277**, H92–H99.
23. Ruan Y., Zeng J., Jin Q., Chu M., Ji K., Wang Z., Li L. (2020) Endoplasmic reticulum stress serves an important role in cardiac ischemia/reperfusion injury (Review). *Exp. Ther. Med.* **20**, 260.
24. Zhou H., Toan S. (2020) Pathological roles of mitochondrial oxidative stress and mitochondrial dynamics in cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury. *Biomolecules.* **10**, 85.
25. Lipskaia L., Keuylian Z., Blirando K., Mougenot N., Jacquet A., Rouxel C., Sghairi H., Elaib Z., Blaise R., Adnot S., Hajjar R.J., Chemaly E.R., Limon I., Bobe R. (2014) Expression of Sarco (Endo) plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) system in normal mouse cardiovascular tissues, heart failure and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 2705.
26. Wang R., Wang M., He S., Sun G., Sun X. (2020) Targeting calcium homeostasis in myocardial ischemia/reperfusion injury: an overview of regulatory mechanisms and therapeutic reagents. *Front. Pharmacol.* **11**, 1–14.
27. Adams C.J., Kopp M.C., Larburu N., Nowak P.R., Ali M.M.U. (2019) Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 1–12.
28. Kaul S., Methner C., Cao Z., Mishra A. (2022) Mechanisms of the “No-Reflow” phenomenon after acute myocardial infarction. *JACC Basic to Transl. Sci.* **8**, 204–220.
29. Edwards N.J., Hwang C., Marini S., Pagani C.A., Spreadborough P.J., Rowe C.J., Yu P., Mei A., Visser N., Li S., Hespe G.E., Huber A.K., Strong A.L., Shelef M.A., Knight J.S., Davis T.A., Levi B. (2020) The role of neutrophil extracellular traps and TLR signaling in skeletal muscle ischemia reperfusion injury. *FASEB J.* **34**, 15753–15770.
30. Arlati S. (2019) Pathophysiology of acute illness and injury. In *Operative Techniques and Recent Advances in Acute Care and Emergency Surgery*. Cham: Springer Internat. Publ., 11–42.
31. Granger D.N., Kvietys P.R. (2015) Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol.* **6**, 524–551.
32. Tennant D., Howell N.J. (2014) The role of HIFs in ischemia-reperfusion injury. *Hypoxia.* **2**, 107–115.
33. Silva-Islas C.A., Maldonado P.D. (2018) Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol. Res.* **134**, 92–99.
34. Toth R., Warfel N. (2017) Strange bedfellows: nuclear factor, erythroid 2-like 2 (Nrf2) and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in tumor hypoxia. *Antioxidants.* **6**, 27.
35. Gallagher B.M., Phelan S.A. (2007) Investigating transcriptional regulation of Prdx6 in mouse liver cells. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1270–1277.
36. Park Y.-H., Kim S.-U., Kwon T.-H., Kim J.-M., Song I.-S., Shin H.-J., Lee B.-K., Bang D.-H., Lee S.-J., Lee D.-S., Chang K.-T., Kim B.-Y., Yu D.-Y. (2016) Peroxiredoxin II promotes hepatic tumorigenesis through cooperation with Ras/Forkhead box M1 signaling pathway. *Oncogene.* **35**, 3503–3513.
37. Guo Q.J., Mills J.N., Bandurraga S.G., Nogueira L.M., Mason N.J., Camp E.R., Larue A.C., Turner D.P.,

- Findlay V.J. (2013) MicroRNA-510 promotes cell and tumor growth by targeting peroxiredoxin1 in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **15**, R70.
38. Hopkins B.L., Nadler M., Skoko J.J., Bertomeu T., Pelosi A., Shafaei P.M., Levine K., Schempf A., Penarun B., Yang B., Datta D., Bucur O., Ndebele K., Oesterreich S., Yang D., Rizzo M.G., Khosravi-Far R., Neumann C.A. (2018) A peroxidase peroxiredoxin 1-specific redox regulation of the novel FOXO3 microRNA target let-7. *Antioxid. Redox Signal.* **28**, 62–77.
 39. Joris V., Gomez E.L., Menchi L., Lobysheva I., Di Mauro V., Esfahani H., Condorelli G., Balligand J.-L., Catalucci D., Dessy C. (2018) MicroRNA-199a-3p and microRNA-199a-5p take part to a redundant network of regulation of the NOS (NO synthase)/NO pathway in the endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 2345–2357.
 40. Zheng J., Chen P., Zhong J., Cheng Y., Chen H., He Y., Chen C. (2021) HIF-1 α in myocardial ischemia-reperfusion injury (Review). *Mol. Med. Rep.* **23**, 1–9.
 41. Schellinger I.N., Cordasic N., Panesar J., Buchholz B., Jacobi J., Hartner A., Klanke B., Jakubiczka-Smorag J., Burzlaff N., Heinze E., Warnecke C., Raaz U., Willam C., Tsao P.S., Eckardt K.U., Amann K., Hilgers K.F. (2017) Hypoxia inducible factor stabilization improves defective ischemia-induced angiogenesis in a rodent model of chronic kidney disease. *Kidney Int.* **91**, 616–627.
 42. Wigerup C., Pålman S., Bexell D. (2016) Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* **164**, 152–169.
 43. Koyasu S., Kobayashi M., Goto Y., Hiraoka M., Harada H. (2018) Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: two decades of knowledge. *Cancer Sci.* **109**, 560–571.
 44. BelAïba R.S., Bonello S., Zahringer C., Schmidt S., Hess J., Kietzmann T., Gorchach A. (2007) Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor B in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 4691–4697.
 45. van Uden P., Kenneth N.S., Webster R., Müller H.A., Mudie S., Rocha S. (2011) Evolutionary conserved regulation of HIF-1 β by NF- κ B. *PLoS Genet.* **7**, e1001285.
 46. Zhang C., Liu J., Wang J., Zhang T., Xu D., Hu W., Feng Z. (2021) The interplay between tumor suppressor p53 and hypoxia signaling pathways in cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 648808.
 47. Potteti H.R., Noone P.M., Tamatam C.R., Ankireddy A., Noel S., Rabb H., Reddy S.P. (2021) Nrf2 mediates hypoxia-inducible HIF1 α activation in kidney tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Am. J. Physiol – Heart Circ. Physiol. Ren. Physiol.* **320**, F464–F474.
 48. Cai S.J., Liu Y., Han S., Yang C. (2019) Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic. *Cell Biosci.* **9**, 9–11.
 49. Burgos R.A., Alarcón P., Quiroga J., Manosalva C., Hancke J. (2021) Andrographolide, an anti-inflammatory multitarget drug: all roads lead to cellular metabolism. *Molecules.* **26**, 5.
 50. Lin J., Fan L., Han Y., Guo J., Hao Z., Cao L., Kang J., Wang X., He J., Li J. (2021) The mTORC1/eIF4E/HIF-1 α pathway mediates glycolysis to support brain hypoxia resistance in the Gansu Zokor, *Eospalax cansus*. *Front. Physiol.* **12**, 626240.
 51. Zang H., Mathew R.O., Cui T. (2020) The dark side of Nrf2 in the heart. *Front. Physiol.* **11**, 1–8.
 52. He F., Ru X., Wen T. (2020) NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–23.
 53. Calvert J.W., Jha S., Gundewar S., Elrod J.W., Ramachandran A., Pattillo C.B., Kevil C.G., Lefer D.J. (2009) Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ. Res.* **105**, 365–374.
 54. Howden R. (2013) Nrf2 and cardiovascular defense. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2013**, 1–10.
 55. Chen Q.M. (2021) Nrf2 for cardiac protection: pharmacological options against oxidative stress. *Trends Pharmacol. Sci.* **42**, 729–744.
 56. Bardallo G.R., Panisello-Roselló A., Sanchez-Nuno S., Alva N., Roselló-Catafau J., Carbonell T. (2022) Nrf2 and oxidative stress in liver ischemia/reperfusion injury. *FEBS J.* **289**, 5463–5479.
 57. Arfin S., Jha N.K., Jha S.K., Kesari K.K., Ruokolainen J., Roychoudhury S., Rath B., Kumar D. (2021) Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants.* **10**, 167–197.
 58. Saha S., Buttari B., Panieri E., Profumo E., Saso L. (2020) An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules.* **25**, 1–31.
 59. Wu J., Sun X., Jiang Z., Jiang J., Xu L., Tian A., Sun X., Meng H., Li Y., Huang W., Jia Y., Wu H. (2020) Protective role of NRF2 in macrovascular complications of diabetes. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 8903–8917.
 60. Ganner A., Pfeiffer Z.C., Wingendorf L., Kreis S., Klein M., Walz G., Neumann-Haefelin E. (2020) The acetyltransferase p300 regulates NRF2 stability and localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **524**, 895–902.
 61. Kim M.J., Jeon J.H. (2022) Recent advances in understanding Nrf2 agonism and its potential clinical application to metabolic and inflammatory diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 2846.
 62. Zhang J., Pan W., Zhang Y., Tan M., Yin Y., Li Y., Zhang L., Han L., Bai J., Jiang T., Li H. (2022) Comprehensive overview of Nrf2-related epigenetic regulations involved in ischemia-reperfusion injury. *Theranostics.* **12**, 6626–6645.
 63. Ngo K.A., Kishimoto K., Davis-Turak J., Pimplaskar A., Cheng Z., Spreafico R., Chen E.Y., Tam A., Ghosh G., Mitchell S., Hoffmann A. (2020) Dissecting the regulatory strategies of NF- κ B RelA target genes in the inflammatory response reveals differential transactivation logics. *Cell Rep.* **30**, 2758–2775. e6.

64. Naguib S., Backstrom J.R., Gil M., Calkins D.J., Rex T.S. (2021) Retinal oxidative stress activates the NRF2/ARE pathway: an early endogenous protective response to ocular hypertension. *Redox Biol.* **42**, 101883.
65. Lu J., Wu T., Zhang B., Liu S., Song W., Qiao J., Ruan H. (2021) Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Commun. Signal.* **19**, 1–10.
66. Mulero M.C., Wang V.Y., Huxford T., Ghosh G. (2019) Genome reading by the NF- κ B transcription factors. *Nucl. Acids Res.* **47**, 9967–9989.
67. Albensi B.C. (2019) What is nuclear factor kappa B (NF- κ B) Doing in and to the mitochondrion? *Front. Cell. Dev. Biol.* **7**, 1–7.
68. Oeckinghaus A., Hayden M.S., Ghosh S. (2011) Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* **12**, 695–708.
69. Jarvis R.M., Hughes S.M., Ledgerwood E.C. (2012) Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1522–1530.
70. Howell J.A., Bidwell G.L. (2020) Targeting the NF- κ B pathway for therapy of ischemic stroke. *Ther. Deliv.* **11**, 113–123.
71. Hasan A.A., Kalinina E., Tatarskiy V., Shtil A. (2022) The thioredoxin system of mammalian cells and its modulators. *Biomedicines.* **10**, 1757.
72. Ghosh R., Samanta P., Sarkar R., Biswas S., Saha P., Hajra S., Bhowmik A. (2022) Targeting HIF-1 α by natural and synthetic compounds: a promising approach for anti-cancer therapeutics development. *Molecules.* **27**, 1–37.
73. Shi T., Dansen T.B. (2020) Reactive oxygen species induced p53 activation: DNA damage, redox signaling, or both? *Antioxidants Redox Signal.* **33**, 839–859.
74. Eriksson S.E., Ceder S., Bykov V.J.N., Wiman K.G. (2019) P53 as a hub in cellular redox regulation and therapeutic target in cancer. *J. Mol. Cell. Biol.* **11**, 330–341.
75. Konrath F., Mittermeier A., Cristiano E., Wolf J., Loewer A. (2020) A systematic approach to decipher crosstalk in the p53 signaling pathway using single cell dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **16**, 1–27.
76. Pan M., Blattner C. (2021) Regulation of P53 by E3S. *Cancers (Basel).* **13**, 1–43.
77. Ghoneum A., Said N. (2019) PI3K-AKT-mTOR and NF κ B pathways in ovarian cancer: implications for targeted therapeutics. *Cancers (Basel).* **11**, 1757.
78. Xu F., Na L., Li Y., Chen L. (2020) Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci.* **10**, 1–12.
79. Yoshioka K. (2021) Class II phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in vesicular trafficking. *Biochem. Soc. Trans.* **49**, 893–901.
80. Khan H., Singh A., Thapa K., Garg N., Grewal A.K., Singh T.G. (2021) Therapeutic modulation of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) pathway in cerebral ischemic injury. *Brain Res.* **1761**, 147399.
81. Walkowski B., Kleibert M., Majka M., Wojciechowska M. (2022) Insight into the role of the PI3K/Akt pathway in ischemic injury and post-infarct left ventricular remodeling in normal and diabetic heart. *Cells.* **11**, 1553.
82. Tsai P.J., Lai Y.H., Manne R.K., Tsai Y.S., Sarbassov D., Lin H.K. (2022) Akt: a key transducer in cancer. *J. Biomed. Sci.* **29**, 1–17.
83. Li D., Qu Y., Mao M., Zhang X., Li J., Ferriero D., Mu D. (2009) Involvement of the PTEN-AKT-FOXO3a pathway in neuronal apoptosis in developing rat brain after hypoxia-ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **29**, 1903–1913.
84. Yang S., Pang L., Dai W., Wu S., Ren T., Duan Y., Zheng Y., Bi S., Zhang X., Kong J. (2021) Role of forkhead box O proteins in hepatocellular carcinoma biology and progression (Review). *Front. Oncol.* **11**, 1–15.
85. Wu P., Du Y., Xu Z., Zhang S., Liu J., Aa N., Yang Z. (2019) Protective effects of sodium tanshinone IIA sulfonate on cardiac function after myocardial infarction in mice. *Am. J. Transl. Res.* **11**, 351–360.
86. Zhang Z., Yao L., Yang J., Wang Z., Du G. (2018) PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). *Mol. Med. Rep.* **18**, 3547–3554.
87. Yang X.M., Wang Y.S., Zhang J., Li Y., Xu J.F., Zhu J., Zhao W., Chu D.K., Wiedemann P. (2009) Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1 α and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 1873–1879.
88. Karar J., Cerniglia G.J., Lindsten T., Koumenis C., Maity A. (2012) Dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 suppresses hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α expression by blocking protein translation and increases cell death under hypoxia. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 1102–1111.
89. Deng H., Chen Y., Li P., Hang Q., Zhang P., Jin Y., Chen M. (2023) PI3K/AKT/mTOR pathway, hypoxia, and glucose metabolism: potential targets to overcome radioresistance in small cell lung cancer. *Cancer Pathog. Ther.* **1**, 56–66.
90. Bouyahya A., El Allam A., Aboulaghra S., Bakrim S., El Menyiy N., Alshahrani M.M., Al Awadh A.A., Benali T., Lee L.-H., El Omari N., Goh K.W., Ming L.C., Mubarak M.S. (2022) Targeting mTOR as a cancer therapy: recent advances in natural bioactive compounds and immunotherapy. *Cancers (Basel).* **14**, 5520.
91. Kierans S.J., Taylor C.T. (2021) Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J. Physiol.* **599**, 23–37.
92. Fu W., Hall M.N. (2020) Regulation of MTORC2 signaling. *Genes (Basel).* **11**, 1–19.

93. Huu T.N., Park J., Zhang Y., Park I., Yoon H.J., Woo H.A., Lee S.R. (2021) Redox regulation of PTEN by peroxiredoxins. *Antioxidants*. **10**, 1–14.
94. Wang Y., Zhang X., ling B., He C., Xia Q., Chen F., Miyamori I., Yang Z., Fan C. (2013) Molecular detection of trisomy 21 by bicolor competitive fluorescent PCR. *J. Clin. Lab. Anal.* **27**, 245–248.
95. Olthof P.B., Reiniers M.J., Dirkes M.C., Van Gulik T.M., Heger M., Van Golen R.F. (2015) Protective mechanisms of hypothermia in liver surgery and transplantation. *Mol. Med.* **21**, 833–846.
96. Jaeschke H., Woolbright B.L. (2012) Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant. Rev.* **26**, 103–114.
97. Deng H., Han H.S., Cheng D., Sun G.H., Yenari M.A. (2003) Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke*. **34**, 2495–2501.
98. Sangaletti R., Tamames I., Yahn S.L., Choi J.S., Lee J.K., King C., Rajguru S.M. (2023) Mild therapeutic hypothermia protects against inflammatory and proapoptotic processes in the rat model of cochlear implant trauma. *Hear Res.* **428**, 108680.
99. Yanamoto H., Hong S.C., Soleau S., Kassell N.F., Lee K.S. (1996) Mild postischemic hypothermia limits cerebral injury following transient focal ischemia in rat neocortex. *Brain Res.* **718**, 207–211.
100. Polderman K.H. (2008) Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet*. **371**, 1955–1969.
101. Chen-Yoshikawa T.F. (2021) Ischemia–reperfusion injury in lung transplantation. *Cells*. **10**, 1333.
102. Edelman J.J.B., Seco M., Dunne B., Matzelle S.J., Murphy M., Joshi P., Yan T.D., Wilson M.K., Bannon P.G., Vallely M.P., Passage J. (2013) Custodiol for myocardial protection and preservation: a systematic review. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **2**, 717–728.
103. Kurtz C.C., Lindell S.L., Mangino M.J., Carey H.V. (2006) Hibernation confers resistance to intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol.* **291**, 895–901.
104. Dark J. (2005) Annual lipid cycles in hibernators: Integration of physiology and behavior. *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 469–497.
105. Andrews M.T. (2007) Advances in molecular biology of hibernation in mammals. *BioEssays*. **29**, 431–440.
106. Zingarelli B., Hake P.W., O'Connor M., Burroughs T.J., Wong H.R., Solomkin J.S., Lentsch A.B. (2009) Lung injury after hemorrhage is age dependent: role of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Crit. Care Med.* **37**, 1978–1987.
107. Plotnikov E.Y. (2021) Ischemic preconditioning of the kidney. *Bull. Exp. Biol. Med.* **171**, 567–571.
108. Kloner R.A., Jennings R.B. (2001) Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications. Part 1. *Circulation*. **104**, 2981–2989.
109. Yoon Y.E., Lee K.S., Choi K.H., Kim K.H., Yang S.C., Han W.K. (2015) Preconditioning strategies for kidney ischemia reperfusion injury: implications of the “time-window” in remote ischemic preconditioning. *PLoS One*. **10**, e0124130.
110. Lang J.A., Kim J. (2022) Remote ischaemic preconditioning – translating cardiovascular benefits to humans. *J. Physiol.* **600**, 3053–3067.
111. Zhao Z.Q., Corvera J.S., Halkos M.E., Kerendi F., Wang N.P., Guyton R.A., Vinten-Johansen J. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. – Heart Circ. Physiol.* **285**, 579–588.
112. Sengul D. (2021) Connection of reactive oxygen species as an essential actor for the mechanism of phenomena; ischemic preconditioning and postconditioning: come to age or ripening? *North Clin. Istanbul*. **8**, 644–649.
113. Khan H., Kashyap A., Kaur A., Singh T.G. (2020) Pharmacological postconditioning: a molecular aspect in ischemic injury. *J. Pharm. Pharmacol.* **72**, 1513–1527.
114. Terada L.S., Guidot D.M., Leff J.A., Willingham I.R., Hanley M.E., Piermattei D., Repine J.E. (1992) Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 3362–3366.
115. Cantu-Medellin N., Kelley E.E. (2013) Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: a process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* **1**, 353–358.
116. Bredemeier M., Lopes L.M., Eisenreich M.A., Hickmann S., Bongiorno G.K., D’Avila R., Morsch A.L.B., da Silva Stein F., Campos G.G.D. (2018) Xanthine oxidase inhibitors for prevention of cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc. Disord.* **18**, 1–11.
117. Rastogi R., Geng X., Li F., Ding Y. (2017) NOX activation by subunit interaction and underlying mechanisms in disease. *Front. Cell Neurosci.* **10**, 1–13.
118. Brandes R.P., Weissmann N., Schröder K. (2014) Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radic. Biol. Med.* **76**, 208–226.
119. Waghela B.N., Vaidya F.U., Agrawal Y., Santra M.K., Mishra V., Pathak C. (2021) Molecular insights of NADPH oxidases and its pathological consequences. *Cell Biochem. Funct.* **39**, 218–234.
120. Csányi G., Cifuentes-Pagano E., Al Ghouleh I., Ranayhossaini D.J., Egaña L., Lopes L.R., Jackson H.M., Kelley E.E., Pagano P.J. (2011) Nox2 B-loop peptide, Nox2ds, specifically inhibits Nox2 oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1116–1125.
121. Altenhöfer S., Radermacher K.A., Kleikers P.W.M., Wingler K., Schmidt H.H.H.W. (2015) Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mecha-

- nisms for target engagement. *Antioxid. Redox Signal.* **23**, 406–427.
122. Kaludercic N., Mialeto-Perez J., Paolocci N., Parini A., Di Lisa F. (2014) Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **73**, 34–42.
 123. Duicu O.M., Lighezan R., Sturza A., Ceausu R.A., Borza C., Vaduva A., Noveanu L., Gaspar M., Ionac A., Feier H., Muntean D.M., Mornos C. (2015) Monoamine oxidases as potential contributors to oxidative stress in diabetes: time for a study in patients undergoing heart surgery. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 515437.
 124. Duarte P., Cuadrado A., León R. (2021) Monoamine oxidase inhibitors: from classic to new clinical approaches. *Handb Exp. Pharmacol.* **264**, 229–259.
 125. Stein A., Bailey S.M. (2013) Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Redox Biol.* **1**, 32.
 126. Kamoun P., Belardinelli M.-C., Chabli A., Lallouchi K., Chadeaux-Vekemans B. (2003) Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* **116A**, 310–311.
 127. Szabo C., Ransy C., Módos K., Andriamihaja M., Murghes B., Coletta C., Olah G., Yanagi K., Bouillaud F. (2014) Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2099.
 128. Wu D., Wang J., Li H., Xue M., Ji A., Li Y. (2015) Role of hydrogen sulfide in ischemia-reperfusion injury. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2015**, 1–16.
 129. Szabo C., Papapetropoulos A. (2017) International union of basic and clinical pharmacology. CII: pharmacological modulation of H₂S levels: H₂S donors and H₂S biosynthesis inhibitors. *Pharmacol. Rev.* **69**, 497–564.
 130. Meng W., Pei Z., Feng Y., Zhao J., Chen Y., Shi W., Xu Q., Lin F., Sun M., Xiao K. (2017) Neglected role of hydrogen sulfide in sulfur mustard poisoning: Keap1 S-sulfhydration and subsequent Nrf2 pathway activation. *Sci. Rep.* **7**, 9433.
 131. Jiang B., Tang G., Cao K., Wu L., Wang R. (2010) Molecular mechanism for H₂S-induced activation of K(ATP) channels. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1167–1178.
 132. Ge S.N., Zhao M.M., Wu D.D., Chen Y., Wang Y., Zhu J.H., Cai W.J., Zhu Y.Z., Zhu Y.C. (2014) Hydrogen sulfide targets EGFR Cys797/Cys798 residues to induce Na(+)/K(+)-ATPase endocytosis and inhibition in renal tubular epithelial cells and increase sodium excretion in chronic salt-loaded rats. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 2061–2082.
 133. Tao B.B., Liu S.Y., Zhang C.C., Fu W., Cai W.J., Wang Y., Shen Q., Wang M.J., Chen Y., Zhang L.J., Zhu Y.Z., Zhu Y.C. (2013) VEGFR2 functions as an H₂S-targeting receptor protein kinase with its novel Cys1045-Cys1024 disulfide bond serving as a specific molecular switch for hydrogen sulfide actions in vascular endothelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 448–464.
 134. Kai S., Tanaka T., Daijo H., Harada H., Kishimoto S., Suzuki K., Takabuchi S., Takenaga K., Fukuda K., Hirota K. (2012) Hydrogen sulfide inhibits hypoxia-but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von Hippel-Lindau-and mitochondria-dependent manner. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 203–216.
 135. Wang D., Ma Y., Li Z., Kang K., Sun X., Pan S., Wang J., Pan H., Liu L., Liang D., Jiang H. (2012) The role of AKT1 and autophagy in the protective effect of hydrogen sulphide against hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Autophagy.* **8**, 954–962.
 136. Wolfschmitt E.M., Hogg M., Vogt J.A., Zink F., Wachter U., Hezel F., Zhang X., Hoffmann A., Gröger M., Hartmann C., Gässler H., Datzmann T., Merz T., Hellmann A., Kranz C., Calzia E., Radermacher P., Messerer D.A.C. (2023) The effect of sodium thiosulfate on immune cell metabolism during porcine hemorrhage and resuscitation. *Front. Immunol.* **14**, 1–16.
 137. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* **94**, 909–950.
 138. Kent A.C., El Baradie K.B.Y., Hamrick M.W. (2021) Targeting the mitochondrial permeability transition pore to prevent age-associated cell damage and neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, 6626484.
 139. Белослудцев К.Н., Дубинин М.В., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. (2019) Транспорт ионов Ca²⁺ митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки. *Биохимия.* **84**, 759–775.
 140. Briston T., Selwood D.L., Szabadkai G., Duchon M.R. (2019) Mitochondrial permeability transition: a molecular lesion with multiple drug targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 50–70.
 141. Piot C., Croisille P., Staat P., Thibault H., Rioufol G., Mewton N., Elbelghiti R., Cung T.T., Bonnefoy E., Angoulvant D., Macia C., Raczka F., Sportouch C., Gahide G., Finet G., André-Fouët X., Revel D., Kirkorian G., Monassier J.-P., Derumeaux G., Ovize M. (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **359**, 473–481.
 142. Rottenberg H., Hoek J.B. (2021) The mitochondrial permeability transition: nexus of aging, disease and longevity. *Cells.* **10**, 1–23.
 143. Zweier J.L., Flaherty J.T., Weisfeldt M.L. (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 1404–1407.
 144. Шарапов М.Г., Гудков С.В., Ланкин В.З. (2021) Гидропероксид-восстанавливающие ферментные системы в регуляции свободнорадикальных процессов. *Биохимия.* **86**, 1479–1501.

145. Гудков С.В., Попова Н.Р., Брусков В.И. (2015) Радиозащитные вещества: история, тенденции и перспективы. *Биофизика*. **60**, 801–811.
146. Orhan G., Yapici N., Yuksel M., Sargin M., Şenay Ş., Yalçın A.S., Aykaç Z., Aka S.A. (2006) Effects of N-acetylcysteine on myocardial ischemia-reperfusion injury in bypass surgery. *Heart Vessels*. **21**, 42–47.
147. Prabhu A., Sujatha D.I., Kanagarajan N., Vijayalakshmi M.A., Ninan B. (2009) Effect of N-acetylcysteine in attenuating ischemic reperfusion injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Ann. Vasc. Surg.* **23**, 645–651.
148. Karmanova E.E., Chernikov A.V., Popova N.R., Sharapov M.G., Ivanov V.E., Bruskov V.I. (2023) Metformin mitigates radiation toxicity exerting antioxidant and genoprotective properties. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. AOP*, 1–12.
149. Mohsin A.A., Chen Q., Quan N., Rousselle T., Mac-eyka M.W., Samidurai A., Thompson J., Hu Y., Li J., Lesnefsky E.J. (2019) Mitochondrial complex I inhibition by metformin limits reperfusion injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **369**, 282–290.
150. Bu Y., Peng M., Tang X., Xu X., Wu Y., Chen A.F., Yang X. (2022) Protective effects of metformin in various cardiovascular diseases: clinical evidence and AMPK-dependent mechanisms. *J. Cell. Mol. Med.* **26**, 4886–4903.
151. Liu W., Wang L., Liu C., Dai Z., Li T., Tang B. (2022) Edaravone ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by downregulating ferroptosis via the Nrf2/FPN pathway in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **45**, 1269–1275.
152. Bailly C. (2019) Potential use of edaravone to reduce specific side effects of chemo-, radio- and immunotherapy of cancers. *Int. Immunopharmacol.* **77**, 105967.
153. Kassab A.A., Aboregela A.M., Shalaby A.M. (2020) Edaravone attenuates lung injury in a hind limb ischemia-reperfusion rat model: a histological, immunohistochemical and biochemical study. *Ann. Anat.* **228**, 151433.
154. Chen C., Li M., Lin L., Chen S., Chen Y., Hong L. (2021) Clinical effects and safety of edaravone in treatment of acute ischaemic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Clin. Pharm. Ther.* **46**, 907–917.
155. Fock E.M., Parnova R.G. (2021) Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants against inflammatory response to lipopolysaccharide challenge: a review. *Pharmaceutics*. **13**, 1–24.
156. Skulachev V.P. (2013) Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441**, 275–279.
157. Plotnikov E.Y., Chupyrkina A.A., Jankauskas S.S., Pevzner I.B., Silachev D.N., Skulachev V.P., Zorov D.B. (2011) Mechanisms of nephroprotective effect of mitochondria-targeted antioxidants under rhabdomyolysis and ischemia/reperfusion. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis. Dis.* **1812**, 77–86.
158. Silachev D.N., Isaev N.K., Pevzner I.B., Zorova L.D., Stelmashook E.V., Novikova S.V., Plotnikov E.Y., Skulachev V.P., Zorov D.B. (2012) The mitochondria-targeted antioxidants and remote kidney preconditioning ameliorate brain damage through kidney-to-brain cross-talk. *PLoS One*. **7**, e51553.
159. Plotnikov E.Y., Zorov D.B. (2019) Pros and cons of use of mitochondria-targeted antioxidants. *Antioxidants*. **8**, 4–9.
160. Venardos K., Kaye D. (2007) Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr. Med. Chem.* **14**, 1539–1549.
161. Turovsky E.A., Mal'tseva V.N., Sarimov R.M., Simakin A.V., Gudkov S.V., Plotnikov E.Y. (2022) Features of the cytoprotective effect of selenium nanoparticles on primary cortical neurons and astrocytes during oxygen-glucose deprivation and reoxygenation. *Sci. Rep.* **12**, 1710.
162. Schanne G., Zoumpoulaki M., Gazzah G., Vincent A., Preud'Homme H., Lobinski R., Demignot S., Seksik P., Delsuc N., Policar C. (2022) Inertness of superoxide dismutase mimics Mn(ii) complexes based on an open-chain ligand, bioactivity, and detection in intestinal epithelial cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2022**, 3858122.
163. Batinic-Haberle I., Tovmasyan A., Spasojevic I. (2015) An educational overview of the chemistry, biochemistry and therapeutic aspects of Mn porphyrins – from superoxide dismutation to H₂O₂-driven pathways. *Redox Biol.* **5**, 43–65.
164. Ching H.Y.V., Kenkel I., Delsuc N., Mathieu E., Ivanović-Burmazović I., Policar C. (2016) Bioinspired superoxide-dismutase mimics: the effects of functionalization with cationic polyarginine peptides. *J. Inorg. Biochem.* **160**, 172–179.
165. Policar C., Bouvet J., Bertrand H.C., Delsuc N. (2022) SOD mimics: from the tool box of the chemists to cellular studies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **67**, 102109.
166. Wang J., Wang P., Dong C., Zhao Y., Zhou J., Yuan C., Zou L. (2020) Mechanisms of ebselen as a therapeutic and its pharmacology applications. *Future Med. Chem.* **12**, 2123–2142.
167. Azad G.K., Tomar R.S. (2014) Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 4865–4879.
168. Santi C., Scimmi C., Sancineto L. (2021) Ebselen and analogues: pharmacological properties and synthetic strategies for their preparation. *Molecules*. **26**, 4230.
169. Ge X., Cao Z., Chu L. (2022) The antioxidant effect of the metal and metal-oxide nanoparticles. *Antioxidants*. **11**, 791.
170. Friedel F.C., Lieb D., Ivanović-Burmazović I. (2012) Comparative studies on manganese-based SOD mimetics, including the phosphate effect, by using global spectral analysis. *J. Inorg. Biochem.* **109**, 26–32.
171. Yoshikawa T., Naito Y., Ueda S., Oyamada H., Takemura T., Yoshida N., Sugino S., Kondo M. (1990) Role of oxygen-derived free radicals in the

- pathogenesis of gastric mucosal lesions in rats. *J. Clin. Gastroenterol.* **12** (Suppl 1), S65–S71.
172. Ambrosio G., Flaherty J.T. (1992) Effects of the superoxide radical scavenger superoxide dismutase, and of the hydroxyl radical scavenger mannitol, on reperfusion injury in isolated rabbit hearts. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **6**, 623–632.
 173. Morpurgo E., Cadrobbi R., Morpurgo M., Rigotti P., Schiavon F., Schiavon O., Caliceti P., Ancona E., Veronese F.M. (1996) Protective effect of superoxide dismutase and polyethylene glycol-linked superoxide dismutase against renal warm ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* **62**, 1221–1223.
 174. Kinouchi H., Epstein C.J., Mizui T., Carlson E., Chen S.F., Chan P.H. (1991) Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 11158–11162.
 175. Valdivia A., Pérez-Álvarez S., Aroca-Aguilar J.D., Ikuta I., Jordán J. (2009) Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *J. Physiol. Biochem.* **65**, 195–208.
 176. Giardino R., Giavaresi G., Fini M., Torricelli P., Guzzardella G.A. (2002) The role of different chemical modifications of superoxide dismutase in preventing a prolonged muscular ischemia/reperfusion injury. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **30**, 189–198.
 177. Galinanes M., Qiu Y., Ezrin A., Hearse D.J. (1992) PEG-SOD and myocardial protection. Studies in the blood- and crystalloid-perfused rabbit and rat hearts. *Circulation.* **86**, 672–682.
 178. Muizelaar J.P. (1993) Cerebral ischemia-reperfusion injury after severe head injury and its possible treatment with polyethyleneglycol-superoxide dismutase. *Ann. Emerg. Med.* **22**, 1014–1021.
 179. Jiang Y., Arounleut P., Rheiner S., Bae Y., Kabanov A.V., Milligan C., Manickam D.S. (2016) SOD1 nanozyme with reduced toxicity and MPS accumulation. *J. Control. Release.* **231**, 38–49.
 180. Cosenza C., Wu G.H., Tusio P.J., Cramer D.V., Makowka L. (1993) Protective effect of polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase for cold ischemia-reperfusion damage in isolated pig livers. *Transplant. Proc.* **25**, 1881–1882.
 181. Pisani A., Sabbatini M., Riccio E., Rossano R., Andreucci M., Capasso C., De Luca V., Carginale V., Bizzarri M., Borrelli A., Schiattarella A., Santangelo M., Mancini A. (2014) Effect of a recombinant manganese superoxide dismutase on prevention of contrast-induced acute kidney injury. *Clin. Exp. Nephrol.* **18**, 424–431.
 182. Bonetta R. (2018) Potential therapeutic applications of MnSODs and SOD-mimetics. *Chem. – A Eur. J.* **24**, 5032–5041.
 183. Ambrosio G., Weisfeldt M.L., Jacobus W.E., Flaherty J.T. (1987) Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury: reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. *Circulation.* **75**, 282–291.
 184. Maksimenko A.V., Vavaev A.V. (2012) Antioxidant enzymes as potential targets in cardioprotection and treatment of cardiovascular diseases. enzyme antioxidants: the next stage of pharmacological counterwork to the oxidative stress. *Heart Int.* **7**, hi.2012.e3.
 185. Шарапов М.Г., Гудков С.В., Ланкин В.З., Новоселов В.И. (2021) Роль глутатионпероксидаз и пероксиредоксинов при свободнорадикальных патологиях. *Биохимия.* **86**, 1635–1653.
 186. Sharapov M.G., Goncharov R.G., Parfenyuk S.B., Glushkova O.V., Novoselov V.I. (2022) The role of phospholipase activity of peroxiredoxin 6 in its transmembrane transport and protective properties. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15265.
 187. Шарапов М.Г., Новоселов В.И., Равин В.К. (2016) Получение химерного фермента, совмещающего активность супероксиддисмутазы и пероксидазы. *Биохимия.* **81**, 571–579.
 188. Карадулева Е.В., Мубаракшина Э.К., Шарапов М.Г., Волкова А.Е., Пименов О.Ю., Равин В.К., Кокос Ю.М., Новоселов В.И. (2015) Кардиопротективный эффект модифицированных пероксиредоксинов при ретроградной перфузии изолированного сердца крысы в условиях окислительного стресса. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **160**, 584–588.
 189. Грудинин Н.В., Богданов В.К., Шарапов М.Г., Буненков Н.С., Можейко Н.П., Гончаров Р.Г., Фесенко Е.Е., Новоселов В.И. (2020) Применение пероксиредоксина для preconditionирования трансплантата сердца крысы. *Вестн. трансплантологии и искусственных органов.* **22**, 158–164.
 190. Палутин О.А., Шарапов М.Г., Темнов А.А., Новоселов В.И. (2015) Нефропротективный эффект экзогенных ферментов-антиоксидантов при ишемически-реперфузионном повреждении ткани почки. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **160**, 305–310.
 191. Goncharov R.G., Rogov K.A., Temnov A.A., Novoselov V.I., Sharapov M.G. (2019) Protective role of exogenous recombinant peroxiredoxin 6 under ischemia-reperfusion injury of kidney. *Cell Tissue Res.* **378**, 319–332.
 192. Sharapov M.G., Goncharov R.G., Filkov G.I., Trofimenko A.V., Boyarintsev V.V., Novoselov V.I. (2020) Comparative study of protective action of exogenous 2-Cys peroxiredoxins (Prx1 and Prx2) under renal ischemia-reperfusion injury. *Antioxidants.* **9**, 1–23.
 193. Gordeeva A.E., Temnov A.A., Charnagalov A.A., Sharapov M.G., Fesenko E.E., Novoselov V.I. (2015) Protective effect of peroxiredoxin 6 in ischemia/reperfusion-induced damage of small intestine. *Dig. Dis. Sci.* **60**, 3610–3619.
 194. Шарапов М.Г., Гордеева А.Е., Гончаров Р.Г., Тихонова И.В., Равин В.К., Темнов А.А., Фесенко Е.Е., Новоселов В.И. (2017) Влияние экзогенного пероксиредоксина 6 на состояние мезентеральных сосу-

- дов и тонкого кишечника при ишемически-реперфузионном поражении. *Биофизика*. **62**, 1208–1220.
195. Новоселов В.И., Равин В.К., Шарапов М.Г., Софин А.Д., Кукушкин Н.И., Фесенко Е.Е. (2011) Модифицированные пероксиредоксины как прототипы лекарственных препаратов мощного антиоксидантного действия. *Биофизика*. **56**, 873–880.
 196. Simone E.A., Dziubla T.D., Arguiri E., Vardon V., Shuvaev V.V., Christofidou-Solomidou M., Muzykantov V.R. (2009) Loading PEG-catalase into filamentous and spherical polymer nanocarriers. *Pharm. Res.* **26**, 250–260.
 197. Li Z., Wang F., Roy S., Sen C.K., Guan J. (2009) Injectable, highly flexible, and thermosensitive hydrogels capable of delivering superoxide dismutase. *Biomacromolecules*. **10**, 3306–3316.
 198. Gil D., Rodriguez J., Ward B., Vertegel A., Ivanov V., Reukov V. (2017) Antioxidant activity of SOD and catalase conjugated with nanocrystalline ceria. *Bioengineering*. **4**, 18.
 199. Lacramioara L., Diaconu A., Butnaru M., Verestiuc L. (2016) Biocompatible SPIONs with superoxid dismutase/catalase immobilized for cardiovascular applications. *IFMBE Proc.* **55**, 323–326.

Ischemia-Reperfusion Injury: Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Methods of Their Correction

R. G. Goncharov¹ and M. G. Sharapov^{1, *}

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*e-mail: sharapov.mg@yandex.ru

Ischemia-reperfusion is a cascade of complex and interrelated pathological processes underlying many human diseases, including such socially significant as stroke, myocardial infarction, acute renal failure, etc. The present review considers modern ideas about the main biochemical and signal-regulatory processes occurring in the cell under conditions of ischemia-reperfusion. Both generally accepted and newly developed ways of ischemia-reperfusion lesion correction aimed at different chains of this pathological process are considered.

Keywords: ischemia-reperfusion, oxidative stress, intracellular signaling, HIF, NRF2, NF- κ B, PI3K/AKT/mTOR, hypothermia, oxidase inhibitors, H₂S, antioxidants, selenium, mimetics, antioxidant enzymes

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.23;577.121.7

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА И РОЛЬ РЕДОКС-ФАКТОРОВ В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ ПОКОЯ И ПРОЛИФЕРАЦИИ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. М. В. Калашникова^а, Н. С. Полякова^а, А. В. Белявский^{а, *}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: abelyavs@yahoo.com

Поступила в редакцию 26.04.2023 г.

После доработки 13.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Клеточный метаболизм относится к ключевым регуляторам поддержания гомеостатических стволовых клеток (ГСК). Анаэробный гликолиз используется как основной источник энергии у покоящихся ГСК. При экспансии и дифференцировке в условиях стационарного гемопоэза энергетические потребности активированных ГСК многократно возрастают. Для удовлетворения увеличившихся запросов клетки переходят к митохондриальному окислительному фосфорилированию, при этом возрастает производство активных форм кислорода (АФК). В обзоре рассмотрены молекулярные механизмы поддержания гликолиза в ГСК, а также факторы, определяющие увеличение метаболической активности и переход к митохондриальному биогенезу при активации ГСК. Мы останавливаемся на роли белков HIF (hypoxia-inducible factor) как ключевых медиаторов клеточного ответа на гипоксию, а также рассматриваем явление экстрафизиологического кислородного шока/стресса (ERHOSS), приводящего к форсированной дифференцировке ГСК, и методы его преодоления. Наконец, обсуждается роль окисления жирных кислот (FAO) в гемопоэзе. Понимание метаболических потребностей нормальных ГСК и предшественников имеет решающее значение для разработки новых методов лечения заболеваний, связанных с кроветворной и иммунной системами.

Ключевые слова: кроветворение, гемопоэтические стволовые клетки, анаэробный гликолиз, стрессовый гемопоэз, митохондриальный биогенез, окисление жирных кислот, HIF, окислительный стресс, редокс-факторы, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S0026898423060095, EDN: REJDYZ

ВВЕДЕНИЕ

Кроветворение — один из наиболее важных механизмов гомеостаза у животных, характеризующийся высокой эффективностью. Например, у человека производится ежедневно до одного триллиона новых клеток крови [1, 2]; при этом кроветворение обладает высокой адаптивностью и способностью тонко реагировать на изменения окружающей среды и физиологического состояния организма. Главная составляющая кроветво-

рения и важнейший резерв организма — способные к самообновлению и мультипотентной дифференцировке гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Число этих клеток чрезвычайно мало — около одного миллиона ГСК поддерживает образование зрелых клеток крови на протяжении жизни [3]. Поскольку ГСК в норме находятся в состоянии покоя и крайне редко вступают в клеточный цикл [4, 5], поддержание гомеостатического кроветворения происходит в основном благодаря размножению более дифференцированных коммитированных стволовых клеток и клеток-предшественников [6, 7]. Однако такие клетки не относятся к долгоживущим и имеют ограниченный потенциал самообновления. Соответственно нормальный гемопоэз является поликлональным, то есть представляет собой последовательную смену большого числа клонов [8].

Поддержание гомеостаза для ГСК особенно важно, поскольку эти клетки, по сравнению, например, с гемопоэтическими предшественниками, сверхчувствительны к изменению условий.

Сокращения. АФК — активные формы кислорода; ГПК — гемопоэтические прогениторные клетки; ГСК — гемопоэтические стволовые клетки; МСК — мезенхимальные стволовые клетки; ERHOSS (extra physiologic oxygen shock/stress) — экстрафизиологический кислородный шок/стресс; FAO (fatty acid oxidation) — окисление жирных кислот; FFA (free fatty acids) — свободные жирные кислоты; FIH (factor inhibiting HIF) — фактор, ингибирующий HIF; HIF (hypoxia-inducible factor) — индуцируемый гипоксией фактор; OXPHOS (oxidative phosphorylation) — окислительное фосфорилирование; PDK (pyruvate dehydrogenase kinase) — киназа пируватдегидрогеназы; PHD (prolyl hydroxylases) — пролилгидроксилазы.

Уязвимость этих клеток по отношению к неблагоприятным факторам может сопровождаться потерей основных функций и гибелью [9]. Регуляция решений относительно сохранения состояния покоя, выхода в клеточный цикл и дифференцировки, а также точная настройка по отношению к внутренним и внешним условиям, безусловно, относятся к главным составляющим самоподдержания ГСК [10–14].

Недавно показано, что клеточный метаболизм играет важную регуляторную роль в биологии ГСК. Находясь подавляющую часть времени в фазе G_0 клеточного цикла [4, 5], ГСК нуждаются в относительно низком притоке энергии, который вполне может восполняться за счет анаэробного гликолиза [15, 16]. В то же время для пролиферации клеткам требуется накопление значительного количества макромолекул для дочерних клеток и, следовательно, значительно больше энергии. В связи с этим переход ГСК из покоящегося состояния в активированное сопровождается преимущественным использованием более энергетически продуктивного окислительного фосфорилирования (OXPHOS). Если основной путь гликолиза на одну молекулу глюкозы генерирует 2 молекулы АТФ, то при OXPHOS — 36 молекул. Для пролиферации и биосинтеза аминокислот, нуклеотидов и липидов, помимо АТФ, необходим биосинтез анаболических углеводов, который в основном происходит с участием промежуточных продуктов цикла Кребса [17].

В обзоре проанализированы молекулярные механизмы, связанные с ролью метаболизма и редокс-регуляции в гемопоэзе и биологии ГСК. Понимание этих механизмов имеет важное значение как с фундаментальной точки зрения, так и в прикладном аспекте, в частности для разработки условий экспансии ГСК *ex vivo* и регуляции их пластичности с целью получения новых терапевтических клеточных препаратов.

HIF ФАКТОРЫ – ГЛАВНЫЕ СЕНСОРЫ ГИПОКСИИ

Поддержание кислородного гомеостаза в клетках — одно из важнейших условий нормального протекания биологических процессов, нарушение которого приводит к серьезным адаптационным реакциям. Так, снижение уровня кислорода в первую очередь приводит к значительным изменениям в транскрипции генных ансамблей, связанных с ответом на гипоксию. Факторы, индуцируемые гипоксией (HIFs, hypoxia-inducible factors), при этом составляют главный элемент каскада, регулирующего этот ответ [18–20]. HIFs представляют собой гетеродимеры, которые состоят из двух субъединиц: чувствительной к уровню кислорода α -субъединицы и конститутивно экспрессируемой β -субъединицы, представляю-

щей собой ядерный транслокатор арилуглеводородного рецептора (ARNT) [21, 22]. Как HIF- α , так и HIF- β характеризуются наличием отвечающего за олигомеризацию мотива “спираль–петля–спираль” (bHLH), свойственного многим факторам транскрипции, а также сигнала ядерной локализации (NLS) [23]. Специфический для семейства димерных эукариотических факторов транскрипции домен Per/ARNT/Sim (PAS-домен) также общий для обеих субъединиц. N-концевой домен в составе субъединиц отвечает за связывание ДНК, а домены трансактивации на C-конце индуцируют экспрессию генов [24, 25].

В аэробных условиях происходит гидроксилирование двух пролильных остатков HIF- α пролилгидроксилазами (PHD). После этого происходит связывание HIF- α с комплексом белка фон Гиппеля–Линдау (pVHL) и убиквитинлигазы E3, что приводит к убиквитинированию HIF- α и его деградации в протеасомах [26]. Белки PHD имеют различную внутриклеточную локализацию: PHD1 находится в ядре, PHD2 — в цитоплазме, PHD3 — и в ядре, и в цитоплазме [27]. Кроме того, их функции тоже различаются: PHD2 считается главным регулятором уровня HIF- α , в то время как PHD1 и PHD3 участвуют в дополнительной регуляции уровней HIF-1 α и HIF-2 α [28]. Еще один важный регулятор HIF, чувствительный к кислороду, — фактор, ингибирующий HIF (FIH). Взаимодействуя с кислородом, FIH участвует в гидроксилировании остатка Asn HIF- α , тем самым предотвращая рекрутирование CREB-связывающего белка (CBP)/коактиваторов p300 и подавляя транскрипционную активность HIF [29]. Если PHDs контролируют стабильность HIFs и их уровень, то FIH регулирует транскрипционную активность HIFs. Таким образом реализуется двойной контроль активности HIFs. Однако FIH проявляет свою активность и при более низких концентрациях кислорода по сравнению с PHDs и способен ингибировать активность сохранившегося в условиях умеренной гипоксии HIF [30]. Наоборот, инактивация FIH сопровождается рекрутированием CBP/p300 и повышением транскрипционной активности HIF [31, 32].

В ряде работ показано, что регуляция стабильности и транскрипционной активности HIF- α опосредуется не только гидроксилированием, но и другими посттрансляционными модификациями. Kietzmann и соавт. [33] показали, что в регуляции стабильности, транскрипционной активности и ядерной локализации HIF- α важную роль играет его фосфорилирование. Фосфорилирование различных остатков HIF- α достаточно распространено и опосредуется такими киназами, как гликогенсинтаза-3 (GSK-3) [34, 35], Polo-подобная киназа-3 (PLK3) [36–38], циклинзависимые киназы (CDK) [39, 40] и протеинкиназа A (PKA) [41, 42]. Не менее важную роль в регуляции

HIF- α играет ацетилирование. Jeong и соавт. [43] выявили важную роль ARD1-опосредованного ацетилирования в обеспечении взаимодействия HIF-1 α и pVHL в убиквитинировании HIF-1 α .

ГСК ИСПОЛЬЗУЮТ АНАЭРОБНЫЙ ГЛИКОЛИЗ В КОСТНОМОЗГОВОЙ НИШЕ

На протяжении жизни как ГСК, так и гемопоэтические прогениторные клетки (ГПК) локализованы, главным образом, в костном мозге [44]. Здесь они находятся под контролем костномозговой ниши, пребывая в тесном контакте с мезенхимальными стромальными клетками и эндотелием, остеобластами, адипоцитами и другими типами клеток, определяющими гомеостаз [45]. В костномозговой нише ГСК и ГПК находятся в условиях низкого содержания кислорода: от 1 до 4% [46–48]. Стоит отметить, что значения местного парциального давления кислорода (pO_2) в костном мозге живых мышей довольно низкие. Так, используя технологию прижизненной двухфотонной фосфоресцентной микроскопии, J. Spencer и соавт. [15] определили, что уровень pO_2 в костном мозге животных не превышает 32 мм рт.ст., в то время как в венах находится в диапазоне 30–40 мм рт.ст. Авторы работы отмечают неоднородность местного pO_2 , обусловленную различной плотностью кровеносных сосудов на разном удалении от кости (латеральный градиент). Так, около эндостальной поверхности кости содержание мелких артерий наибольшее и эта область наименее гипоксична. Небольшие сосуды, расположенные близко к кости, оказались нестипозитивными и уровень pO_2 в таких сосудах, против ожиданий, оказался выше, чем в нестипнегативных. Здесь стоит отметить, что нестин экспрессируется мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) костного мозга, способствующими поддержанию и определяющими нишу покоящихся ГСК [49, 50].

Важные данные относительно специфики энергетического обмена ГСК получены в исследовании, проведенном T. Simsek и соавт. [16], где с помощью проточной цитометрии определен метаболический фенотип мышечных ГСК. В клетках оценивали флуоресценцию эндогенного восстановленного никотинамидадениннуклеотида (NADH) как показателя уровня митохондриального дыхания. В области клеток с низким митохондриальным потенциалом находилось около 80% длительно репопулирующих ГСК (ДР-ГСК), фенотипически определяемых поверхностными маркерами: Lin[–], Sca-1⁺, C-Kit⁺, CD34[–], Flk2[–]. Для ДР-ГСК мышей характерен низкий уровень митохондриального дыхания и АТФ и повышенный уровень лактата — продукта анаэробного метаболизма глюкозы (гликолиза);

около 89% этих клеток экспрессирует Hif-1 α . Повышенная экспрессия этого фактора выявлена и в других исследованиях [16, 51]. На основании этих данных можно предполагать, что большая часть ГСК для “удовлетворения энергетических потребностей” использует цитоплазматический гликолиз вместо митохондриального ОХРНOS. Метаболический фенотип ГСК, как описано более подробно ниже, связан с активацией гена *Hif1a* как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях.

Важно отметить, что метаболический профиль ГСК отличается от более дифференцированных клеток [51–53]. Так, выявлено, что ГСК обладают повышенной пируваткиназной активностью и накапливают большое количество фруктозо-1,6-бисфосфата, что подтверждает предположение о том, что метаболизм ГСК реализуется через активный гликолиз. Данные о том, что ГСК содержат высокие уровни пирувата — продукта заключительной АТФ-генерирующей части гликолизного пути — при низком уровне субстрата — фосфоенолпирувата, — также свидетельствуют в пользу высказанной гипотезы [52].

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ БИОГЕНЕЗ ПРОИСХОДИТ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ, НО НЕ ПРИ САМООБНОВЛЕНИИ ГСК

Выяснение метаболических механизмов перехода покоящихся ГСК в дифференцировку относится к важным вопросам клеточной биологии. Как отмечено выше, ГСК, вступив на путь дифференцировки, начинают в значительной степени использовать механизм ОХРНOS, что приводит к всплеску митохондриального метаболизма. Возможно, этот механизм получил развитие в ГСК из-за повышенной потребности в энергии для быстрой пролиферации и дифференцировки в ответ на экзогенный стресс.

Как показано в двух работах 2013 года [52, 54], в находящихся в состоянии покоя ГСК митохондриальная активность минимизирована. Зависимость покоящихся ГСК от митохондриальной функции невысока и позволяет поддерживать низкие уровни активных форм кислорода (АФК), так как эти клетки уязвимы для окислительного стресса [17, 55]. Как сказано выше, такие покоящиеся ГСК обладают повышенной способностью к долговременной реконституции как в первичных, так и во вторичных трансплантатах, по сравнению с ГСК с высоким мембранным потенциалом митохондрий. В связи с тем, что митохондрии ГСК практически неактивны [56], уровень АФК, связанный с митохондриальной активностью, ниже в ГСК, чем у более дифференцированных предшественников [57, 58].

Действительно, в гетерогенных размножающихся культурах ГСК *ex vivo* самообновляющиеся клетки сохраняют низкую митохондриальную активность, что резко контрастирует с дифференцирующимися клетками, в которых происходит активация митохондрий. Интересно, что в условиях культивирования, обычно способствующих дифференцировке, химическое разобщение электронтранспортной цепи стимулирует самообновление ГСК, при этом происходит обратимое уменьшение митохондриальной массы за счет аутофагии. Таким образом, изменение метаболической программы ГСК сильно влияет на выбор между самообновлением и дифференцировкой, что вряд ли можно рассматривать как простое следствие перехода из покоящегося состояния в активированное [59]. Кроме того, во время активации остаются ГСК, у которых выход в цикл не начинается, причем существование такого покоящегося пула необходимо для поддержания самообновления и восполнения ГСК без истощения.

С другой стороны, во время стрессового кроветворения метаболизм ГСК быстро переключается с преимущественного использования механизма гликолиза на OXPHOS, тем самым обеспечивая экспансию, необходимую для ответа и преодоления стресса. К наиболее распространенным триггерам стрессового кроветворения относятся инфекция, вирусная или бактериальная, что широко используют для создания экспериментальных моделей ответа системы кроветворения на стресс [60].

РОЛЬ ФАКТОРОВ HIF-1 α И HIF-2 α В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА ГСК В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Значительную роль в поддержании стационарного состояния ГСК играют подробно описанные выше гетеродимерные факторы HIF-1 и HIF-2 — ключевые медиаторы клеточного ответа на гипоксию [18, 51, 61]. Метаболический фенотип ГСК связан с повышением уровня и активацией HIF-1 α . Оказалось, что дефицит HIF-1 не влияет на стационарное кроветворение, хотя при конкурентной трансплантации ГСК, полученных от мышей с делецией гена *Hif1a* и от нормальных мышей, через 4 месяца количество ГСК от донора с делецией уменьшается [51]. Чрезмерная стабилизация HIF-1 α за счет биаллельной потери VHL, негативного регулятора HIF-1 α , подавляет выход ГСК и предшественников в клеточный цикл, но приводит к нарушению способности к репопуляции при трансплантации. Моноаллельная потеря VHL также способствует состоянию покоя ГСК, однако при этом улучшается приживление костного мозга во время трансплантации [51]. Таким образом, тонкая настройка уровня HIF-1 α необходима для поддержания ГСК.

В исследованиях А. Guitart и соавт. [62] и М. Vukovic и соавт. [63] показано, что для поддержания ГСК совсем не обязательны субъединицы HIF. Продемонстрировано, что ГСК мышей с дефицитом Hif-2 α поддерживают стационарное кроветворение и эффективно восстанавливают гемопоэз при серийных трансплантациях в первичного реципиента. При нарушении гемопоэза, вызванным введением 5-фторурацила, дефицитные по Hif-1 α ГСК также способны к восстановлению [63].

С другой стороны, показано, что делеция *Meis1*, гена транскрипционного активатора HIF-1, приводила к выходу ГСК из состояния покоя и нарушению репопуляции костного мозга после трансплантации [64]. В результате делеции *Meis1* происходило подавление экспрессии как HIF-1 α , так и HIF-2 α . Как следствие, ГСК переходили на митохондриальный метаболизм, сопровождающийся повышенной продукцией АФК и заканчивающийся апоптозом. Эффект нокаута *Meis1* на ГСК вызван воздействием АФК, что подтверждено положительным эффектом антиоксиданта N-ацетилцистеина на мышей *Meis1*^{-/-} [64].

Кроме того, делеция гена *Hif1a* в ГСК мышей приводила к снижению гликолиза и усилению митохондриального метаболизма, в результате чего наступало истощение ГСК [52]. По-видимому, Hif-1 α необходим для функционирования стволовых клеток в гемопоэтической системе. Механизм действия Hif-1 α заключается в стимуляции экспрессии киназ пируватдегидрогеназы: Pdk2 и Pdk4, — которые инактивируют пируватдегидрогеназный комплекс и тем самым блокируют попадание пирувата в цикл трикарбоновых кислот, что приводит к подавлению митохондриального дыхания [52, 53].

РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОЛИЗА ЧЕРЕЗ ФУНКЦИИ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Повышенная экспрессия Pdk в ГСК под действием Hif1- α приводит к подавлению поступления гликолитических метаболитов в митохондрии. Сверхэкспрессия *Pdk* в дефектных по гликолизу ГСК мышей останавливала клеточный цикл и восстанавливала естественный обмен и способность к трансплантации. Делеция генов *Pdk2* и *Pdk4* вызывала обратный эффект, снижая гликолиз, покоящееся состояние и способность к трансплантации ГСК. Более того, обработка ГСК миметиком Pdk повышала их выживаемость и трансплантационный потенциал [52].

Стоит отметить, что влияние делеции генов *Pdk2* и *Pdk4* может быть связано с тем, что гликолитический метаболический статус — контрольная точка клеточного цикла, которая модулирует состояние покоя ГСК и потенциал стволовых

клеток [65]. Обнаружено, что делеция гена, кодирующего изоформу М2 пируваткиназы (Pkm2), снижала уровни промежуточных метаболитических продуктов, негативно влияя на функции ГПК мышей. Именно поэтому дефицит Pkm2 не влияет на кроветворение в стабильных условиях, но ухудшает гемопоэз после трансплантации. Делеция гена лактатдегидрогеназы А (*Ldha*) приводила к повышению уровня пирувата в цикле трикарбоновых кислот, а также к усилению митохондриальной активности и продукции АФК, что значительно снижало репопуляционный потенциал как ГСК, так и ГПК. Все эти данные следует рассматривать как еще одно свидетельство существования в ГСК сложной регуляторной сети, связывающей анаэробный и аэробный метаболизм [65].

РОЛЬ NRF В ПОДДЕРЖАНИИ БАЛАНСА МЕЖДУ ПОКОЯЩИМИСЯ И АКТИВНЫМИ ГСК

При активации ГСК изменяется предпочтение вида энергетического обмена: вместо гликолиза, поддерживающего низкий уровень АФК, преимущественно используется ОХРНОС, сопряженный с увеличением продукции АФК. Уровень последних регулируется в частности за счет действия антиоксидантной системы, а именно следующих ферментов: супероксиддисмутазы-2 (SOD2), микросомальной глутатион-S-трансферазы-1 (MGST1) и ядерного фактора-2 эритроидного происхождения (NRF2) [66].

Система, включающая Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1; Keap1) и Nrf2, представляет собой защитный механизм против влияния вредных факторов, в частности окислительного стресса и электрофильных токсинов [67]. Nrf2 — ключевой фактор, активирующий транскрипцию ряда цитопротекторных генов, кодирующих антиоксидантные белки и ферменты детоксикации. Keap1 — репрессор Nrf2, отвечающий на окислительно-восстановительные (redox) изменения в клетке [68]. В нормальных условиях Nrf2 полиубиквитинируется белковым комплексом Keap1 и расщепляется в протеасомах. В условиях стресса, индуцирующих окислительно-восстановительные нарушения, Keap1 инактивируется, в результате чего Nrf2 стабилизируется и активирует транскрипцию цитопротекторных генов [69, 70].

При изучении влияния активности Nrf2 на ДР-ГСК [71] обнаружено, что постоянная активация Nrf2 в результате дефицита *Keap1* не изменяет уровень ДР-ГСК, но негативно влияет на их состояние покоя при стабильном кроветворении. Конститутивная активация Nrf2 уменьшает способность ДР-ГСК к репопуляции клеток костного мозга после трансплантации. Следовательно,

Keap1 регулирует активность Nrf2 и влияет на вход ГСК в клеточный цикл и дифференцировку, обеспечивая регенеративный ответ ГСК на стресс, например в случае кровопотери.

ЭКСТРАФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ КИСЛОРОДНЫЙ ШОК/СТРЕСС В БИОЛОГИИ ГСК

Несмотря на то, что ГСК в организме существуют фактически в условиях гипоксии, которые необходимы для сохранения состояния покоя этих клеток, до недавнего времени практически все манипуляции с ГСК проводили в условиях атмосферного уровня кислорода.

Считалось, что относительно кратковременное пребывание ГСК в условиях нормоксии/физиологической гипероксии не вызывает изменений в свойствах этих клеток либо эти изменения обратимы и не оказывают долговременного действия на функции ГСК. Теперь становится понятным, что эти постулаты были ошибочными. Не так давно показано, что даже кратковременное воздействие атмосферного кислорода вызывает дифференцировку ГСК, приводящую к уменьшению их количества с одновременным увеличением числа ГПК [72]. Это явление получило название “экстрафизиологический кислородный шок/стресс” (Extra Physiologic Oxygen Shock/Stress; EPHOSS). Механизм действия EPHOSS обусловлен индукцией продукции митохондриальных АФК, что сопряжено с открытием переходной поры митохондриальной проницаемости (mitochondrial permeability transition pore; MPTP).

Так, еще в 2005 году С. Baines и др. [73] обнаружили, что делеция гена циклофилина D (*CypD*) предотвращала индукцию MPTP. Авторы исследовали влияние этой делеции на способность защищать ГСК от EPHOSS и повышать их выход из костного мозга мышей. Так, показано, что после сбора и обработки клеток костного мозга мышей в атмосферных условиях число фенотипически и функционально определяемых ГСК значительно больше у *CypD*-негативных, чем у *CypD*-позитивных мышей. При долговременной репопуляции в дефектных по *CypD* ГСК продукция АФК была значимо снижена. В результате проведенных исследований выявлено, что открытие MPTP индуцируют факторы *CypD* и p53, а также экспрессия Hif-1α и микроРНК miR-210 [72, 74].

Н. Broxmeyer и др. [74] пришли к выводу, что сбор и работа с ГСК костного мозга в условиях гипоксии (3% O₂) значительно повышает количество долговременно репопулирующих ГСК костного мозга мышей (до 5 раз) и выживание животных после трансплантации. Таким образом, для снижения дифференцировки и потерь ГСК при

их выделении следует снижать уровень ERHOS и проводить сбор и обработку костного мозга в условиях гипоксии. Повышение выхода ГСК и сохранение их функциональной активности при работе в условиях пониженного (физиологического) уровня кислорода показано также для ГСК из костного мозга и пуповинной крови человека [75], для мобилизованных ГСК периферической крови [76] и даже для ГСК мышей, нокаутных по *Fanca* и *Fancc*, костный мозг которых дефицитен по ГСК и ГПК [77].

А. Aljoufi и др. [78], исследуя Tet2 (ten-eleven translocation 2) — α -кетоглутарат, железо- и кислородзависимую диоксигеназу, катализирующую превращение 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин, — обнаружили, что делеция *Tet2* в ГСК приводила к нечувствительности ГСК и ГПК к изменению уровня кислорода при выделении из костного мозга [78]. Использование физиологических уровней кислорода при работе с клетками костного мозга также позволило выявить, что Ca^{2+} /кальмодулинзависимая киназа киназы-2 (*Camkk2*) — первичный внутриклеточный рецептор Ca^{2+} — регулирует переход ГСК в ГПК, при этом нокаутные по *Camkk2* клетки были достаточно устойчивы к воздействию ERHOS [79]. Интересно, что выделение и манипуляции с клетками костного мозга старых мышей в среде 3%-ного кислорода обеспечивают более высокий выход ГСК по сравнению с молодыми мышами при атмосферном уровне кислорода. Более того, соотношение миелоидно-лимфоидной дифференцировки клеток, полученных от старых животных в условиях внешней гипоксии, сравнялось с таковым для клеток от молодых мышей, собранных как в нормальной, так и гипоксической атмосфере [80].

Несмотря на явные преимущества, с точки зрения сохранения физиологии и свойств ГСК, манипуляции с этими клетками в гипоксических условиях представляют большую сложность и, кроме того, дорогостоящи. Условия гипоксии можно смоделировать, используя ингибитор СурД циклоспорин А, который препятствует индукции МРТР [75]. Использование циклоспорина тоже сопряжено с определенными трудностями, так как это соединение токсично действует на клетки при длительном контакте. В связи с этим опробованы другие способы сбора ГСК — с использованием комбинации ингибиторов эпигенетических ферментов и сочетания антиоксидантов N-ацетилцистеина и 2-фосфат-L-аскорбиновой кислоты [81]. Их применение позволило значительно увеличить выход клеток при выделении, улучшить приживаемости при трансплантации и снизить содержание ГПК. Конечно, интересно проверить новые сочетания антиоксидантов и других факторов для выявления вариантов,

наиболее подходящих для сохранения свойств и функции ГСК при работе в стандартных атмосферных условиях.

ОТ ПОКОЯ К ПРОЛИФЕРАЦИИ: МЕХАНИЗМЫ ТОНКОЙ НАСТРОЙКИ МЕТАБОЛИЗМА

Значительную роль в переходе ГСК от состояния покоя к пролиферации играет ответ на несвернутые белки в митохондриях (mitochondrial unfolded protein response, UPRmt). М. Mohrin и соавт. [82] привели доказательства того, что UPRmt активируется при переключении метаболизма ГСК из покоящегося состояния в активное. После стимуляции ГСК цитокинами или полицитидиловой кислотой клетки начинали активно размножаться, что сопровождалось увеличением митохондриальной массы, повышением экспрессии генов OXPHOS и транскрипцией генов протеаз и шаперонов митохондрий. Авторы пришли к выводу, что с помощью UPRmt сохранность митохондрий активно контролируется в фазе G_0/G_1 клеточного цикла, что необходимо для обеспечения метаболической готовности ГСК перед началом пролиферации. При переходе от покоя к пролиферации дисрегуляция UPRmt приводит к гибели, нарушению самообновления и уменьшению популяции ГСК [83, 84]. Один из факторов индукции UPRmt — повышенная экспрессия NAD-зависимой деацетилазы сиртуин-7 (SIRT7). SIRT7 относится к ключевым компонентам UPRmt, так как подавляет митохондриальный биогенез, что способствует сохранению пула ГСК при стрессе [85]. SIRT7 снижает стресс, вызываемый несвернутыми белками в митохондриях, за счет подавления в них активности NRF1 и трансляции, снижает активность митохондрий и пролиферацию клеток, тем самым увеличивая время, необходимое для восстановления последних. С возрастом SIRT7 инактивируется, что приводит к усилению влияния стресса через несвернутые белки в митохондриях и снижению функциональности ГСК [83].

Интересные результаты получены при делеции гена *Tsc1* комплекса туберозного склероза (TSC) [86]. TSC негативно регулирует mTORC1 (mTOR complex 1) — ключевой регулятор клеточного метаболизма. Так, делеция *Tsc1* в ГСК переводила клетки из состояния покоя в пролиферацию, сопровождающуюся усилением митохондриального биогенеза и повышением уровня АФК. Проведенные конкурентные и серийные трансплантации костного мозга показали, что в ГСК, дефицитных по *Tsc1*, значительно снижена скорость процессов гемопоэза и самообновления; при этом лечение *in vivo* антагонистом АФК рапамицином останавливало размножение ГСК и восстанавливало их функции. Таким образом,

путь TSC1–mTOR поддерживает ГСК в покоем состоянии за счет подавления продукции АФК. Негативный эффект активированных АФК на сохранение метаболически активных ГСК объясняется связью между фундаментальными свойствами стволовых клеток и состоянием покоя [86].

Не так давно была опубликована работа [87], в которой показано, что локус *Dlk1–Gtl2* играет критическую роль в сохранении ДР-ГСК. Этот локус импринтинга млекопитающих продуцирует множество некодирующих РНК (ncРНК) из хромосомного аллеля, унаследованного от матери. Транскриптомный анализ 17 типов гемопоэтических клеток показал, что ncРНК, экспрессируемые локусом *Dlk1–Gtl2*, представлены как в ГСК в составе эмбриональной печени, так в популяции ДР-ГСК взрослых и необходимы для поддержания функциональности ГСК. В этом случае весь путь PI3K–mTOR подавляется мега-кластером микроРНК в локусе *Dlk1–Gtl2*, что приводит к подавлению митохондриального биогенеза и защищает ДР-ГСК от чрезмерной продукции АФК.

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ГСК ПРИ СТРЕССЕ КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ

К важным вопросам регуляции системы гемопоэза относится выяснение механизмов ее ответа на инфекции и воспаление. В случае инфекции многократно увеличивается оборот нейтрофилов и других иммунных клеток. В ответ на возросшие требования по защите организма система кроветворения реагирует быстрым переключением со стационарного кроветворения на экстренный гранулопоэз. Этот переход включает взаимодействие как гемопоэтических, так и некроветворных клеток микроокружения костного мозга, включая в том числе обмен цитокинами и факторами роста [88, 89]. Так, во время воспалительных состояний стромальные клетки костного мозга поддерживают возросшую потребность в кроветворении, предотвращая истощение ГСК [90]. Еще до того, как ГСК активируют митохондриальный биогенез в ответ на бактериальную инфекцию, стромальные клетки костного мозга передают им часть своих митохондрий [91]. Увеличение митохондриальной массы в ГСК и ГПК через 2 ч после заражения не сопровождалось увеличением митохондриального транскрипционного фактора А (TFAM), что говорит об отсутствии перехода к митохондриальному биогенезу. Процесс передачи митохондрий из стромальных клеток в ГСК регулируется супероксидом и позволяет быстро реализовать переход от гликолитического состояния покоя к OXPHOS, обеспечивая гранулоцитарный ответ в случае заражения. Стоит еще раз отметить, что энергетические по-

требности ГСК во время дифференцировки и экспансии в результате инфекции огромны и требуют быстрого и эффективного производства энергии. Во время дифференцировки ГСК покидают гипоксическую нишу и в процессе циркуляции могут перемещаться в зоны костного мозга с более высоким уровнем кислорода. В результате этого ГПК начинают использовать OXPHOS для выработки АТФ [92].

Очевидно, что переход от стационарного кроветворения к экстренному “предъявляет” определенные метаболические требования к кроветворной системе. В условиях стрессового кроветворения основным источником АТФ для некоторых иммунных клеток может быть гликолиз. Во время стресса кислотность костного мозга повышается из-за увеличения продукции лактата как побочного продукта гликолиза [93]. И наоборот, введение мышам молочной кислоты стимулировало эритропоэз в костном мозге. Также в костном мозге находится большое количество триглицеридсодержащих адипоцитов, способных высвобождать свободные жирные кислоты и глицерин в ответ на стресс [94]. Показано, что в процессе активации иммунные клетки могут использовать как OXPHOS, так и гликолиз [95]. Так, нейтрофилы, макрофаги M1 (классически активированные) и активированные дендритные клетки предпочитают гликолиз, Т-клетки используют как гликолиз, так и OXPHOS, в то время как макрофаги M2 (альтернативно активированные), регуляторные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти — механизм OXPHOS [95].

Дать ответ на вопрос, почему при стрессовом гемопоэзе клетки используют как гликолиз, так и OXPHOS, позволяет тот факт, что при гликолизе АТФ генерируется быстрее, чем при OXPHOS [96], хотя выход АТФ (количество АТФ на моль субстрата) при OXPHOS намного выше. Таким образом, оба метаболических пути могут быть энергетически выгодными при экспансии клеток.

РОЛЬ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ГЕМОПОЭЗЕ

Известно, что окисление жирных кислот (Fatty Acid Oxidation; FAO) в процессе кроветворения используется в качестве источника энергии как ГСК, так и более специализированными клетками-предшественниками. Механизм FAO важен для поддержания стволовых клеток в недифференцированном состоянии. Учитывая сложность биохимических путей и реакций, происходящих в митохондриях, можно прийти к предположению о существовании множества метаболических контрольных точек, которые регулируют судьбу клетки. К. Ito и др. [97] показали, что процесс FAO в митохондриях, опосредованный осью промиелоцитарный лейкозный белок (PML)—рецептор- δ активатора пролиферации пероксисом

(PPAR δ), необходим для самообновления ГСК путем стимулирования асимметричного клеточного деления.

Любопытно, что анализ на уровне единичных клеток показал, что FAO играет решающую роль в экспансии ГСК [98]. Однако в целом механизм, с помощью которого FAO способствует самообновлению ГСК, остается неизвестным.

Недавно показано, что ГСК поглощают и метаболизируют свободные жирные кислоты (FFA) при острой бактериальной инфекции. Это способствует переходу ГСК от гликолиза к β -окислению и выходу в клеточный цикл, что имеет решающее значение для ответа на инфекцию [99]. Расщепление жирных кислот с образованием АТФ происходит в основном в митохондриях. Поглощение FFA происходит после увеличения уровня мРНК CD36 – транспортера FFA. Кроме того, установлено, что ГСК, на поверхности которых отсутствуют молекулы CD36, медленно вступают в клеточный цикл и не способны переключаться на FAO [100].

Стоит отметить, что поглощение FFA в настоящее время общепризнано важным процессом, поддерживающим метаболизм как в злокачественных, так и в нормальных клетках. В обычных условиях для покоящихся ГСК характерен высокий уровень FAO, а ингибирование этого процесса приводит к дисфункции клеток [97].

Важно также отметить, что в экспериментах с использованием *Drosophila melanogaster* в качестве модельной системы кроветворения показано, что FAO в митохондриях имеет решающее значение для дифференцировки прогениторных клеток крови, которая становится невозможной в отсутствие FAO [101]. Таким образом, ГСК, как и многие другие виды клеток, зависят от FAO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования последних десятилетий существенно расширили знания о метаболическом регулировании судьбы ГСК. Используя анаэробный гликолиз для производства энергии, стволовые кроветворные клетки ограничивают ОХРНOS и продукцию АФК, что позволяет им поддерживать состояние покоя, оставаясь в недифференцированном состоянии, а также минимизировать мутации в геноме. Раскрытие механизмов функционирования и роли гетеродимерных факторов HIF-1 и HIF-2 позволило получить новую информацию о регуляции состояния ГСК и ГПК и значении ниши ГСК в этих процессах и, как следствие, сформулировать новые стратегии репрограммирования окислительного метаболизма и модуляции свойств ГСК.

Изучение механизмов EPHOS позволило оценить влияние атмосферного кислорода при

выделении ГСК и выявить связь между гипоксией, SurD и MPTP в передаче сигналов. Понимание влияния EPHOS на состояние выделяемых ГСК и их дальнейшую судьбу привело к пересмотру большого массива данных по свойствам ГСК и их дифференцировке, которые были получены в условиях атмосферных уровней кислорода. Кроме того, учет влияния EPHOS позволит избежать артефактов при выделении ГСК, что особенно актуально для препаратов ГСК из пуповинной крови.

В обзоре также рассмотрена функция FAO и значение этого механизма для пролиферации ГСК и их реакции на стресс. Тем не менее механизмы, задействованные при изменении метаболических путей ГСК при стрессе, остаются не до конца ясными и требуют дополнительных исследований.

Понимание тонких настроек метаболизма ГСК в покое и при входе в клеточный цикл открывает новые возможности для трансплантации гемопоэтических клеток при лечении онкологических заболеваний и разработки препаратов нового поколения для репрограммирования клеток при лечении инфекционных заболеваний, различных патологий и при старении.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ госрегистрации темы – 122092200053-8).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaushansky K. (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.* **354**(19), 2034–2045.
2. Doulatov S., Notta F., Laurenti E., Dick J.E. (2012) Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell.* **10**(2), 120–136.
3. Watson C.J., Papula A.L., Poon G.Y.P., Wong W.H., Young A.L., Druley T.E., Fisher D.S., Blundell J.R. (2020) The evolutionary dynamics and fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Science.* **367**(6485), 1449–1454.
4. Cheshier S.H., Morrison S.J., Liao X., Weissman I.L. (1999) *In vivo* proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**(6), 3120–3125.
5. Cheng T., Rodrigues N., Shen H., Yang Y.G., Dombkowski D., Sykes M., Scadden D.T. (2000) Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21^{cip1/waf1}. *Science.* **287**(5459), 1804–1809.
6. Yamamoto R., Morita Y., Ooehara J., Hamanaka S., Onodera M., Rudolph K.L., Ema H., Nakauchi H.

- (2013) Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*. **154**(5).
7. Höfer T., Rodewald H.R. (2018) Differentiation-based model of hematopoietic stem cell functions and lineage pathways. *Blood*. **132**(11), 1106–1113.
 8. Sun J., Ramos A., Chapman B., Johnnidis J.B., Le L., Ho Y.J., Klein A., Hofmann O., Camargo F.D. (2014) Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature*. **514**(7522), 322–327.
 9. Jang Y.Y., Sharkis S.J. (2007) A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. **110**(8), 3056–3063.
 10. Chen Y., Fang S., Ding Q., Jiang R., He J., Wang Q., Jin Y., Huang X., Liu S., Capitano M.L., Trinh T., Teng Y., Meng Q., Wan J., Broxmeyer H.E., Guo B. (2021) ADGRG1 enriches for functional human hematopoietic stem cells following *ex vivo* expansion-induced mitochondrial oxidative stress. *J. Clin. Invest.* **131**(20).
 11. D'Souza L.C., Kuriakose N., Raghu S.V., Kabekko S.P., Sharma A. (2022) ROS-directed activation of Toll/NF- κ B in the hematopoietic niche triggers benzene-induced emergency hematopoiesis. *Free Radic. Biol. Med.* **193**(Pt. 1), 190–201.
 12. Jakubison B.L., Sarkar T., Gudmundsson K.O., Singh S., Sun L., Morris H.M., Klarmann K.D., Keller J.R. (2022) ID2 and HIF-1 α collaborate to protect quiescent hematopoietic stem cells from activation, differentiation, and exhaustion. *J. Clin. Invest.* **132**(13), e152599.
 13. Guan B., Li C., Yang Y., Lu Y., Sun Y., Su L., Shi G., Bai L., Liu J., Meng A. (2023) Effect of spermidine on radiation-induced long-term bone marrow cell injury. *Int. Immunopharmacol.* **114**, 109557.
 14. Aires R., Porto M.L., de Assis L.M., Pereira P.A.N., Carvalho G.R., Côco L.Z., Vasquez E.C., Pereira T.M.C., Campagnaro B.P., Meyrelles S.S. (2021) DNA damage and aging on hematopoietic stem cells: impact of oxidative stress in ApoE^{-/-} mice. *Exp. Gerontol.* **156**, 111607.
 15. Spencer J.A., Ferraro F., Roussakis E., Klein A., Wu J., Runnels J.M., Zaher W., Mortensen L.J., Alt C., Turcotte R., Yusuf R., Côté D., Vinogradov S.A., Scadden D.T., Lin C.P. (2014) Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*. **508**(7495), 269.
 16. Simsek T., Kocabas F., Zheng J., Deberardinis R.J., Mahmoud A.I., Olson E.N., Schneider J.W., Zhang C.C., Sadek H.A. (2010) The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. **7**(3), 380–390.
 17. Suda T., Takubo K., Semenza G.L. (2011) Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. **9**(4), 298–310.
 18. Semenza G.L. (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med.* **7**(8), 345–350.
 19. Gonzalez-Flores A., Aguilar-Quesada R., Siles E., Pozo S., Rodríguez-Lara M.I., López-Jiménez L., López-Rodríguez M., Peralta-Leal A., Villar D., Martín-Oliva D., Del Peso L., Berra E., Oliver F.J. (2014) Interaction between PARP-1 and HIF-2 α in the hypoxic response. *Oncogene*. **33**(7), 891–898.
 20. Zhang P., Yao Q., Lu L., Li Y., Chen P.J., Duan C. (2014) Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia. *Cell Rep.* **6**(6), 1110–1121.
 21. Semenza G.L., Wang G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* **12**(12), 5447–5454.
 22. Wang G.L., Semenza G.L. (1993) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chemistry*. **268**(29), 21513–21518.
 23. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**(12), 5510–5514.
 24. Semenza G.L. (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* (Bethesda). **19**(4), 176–182.
 25. Schödel J., Ratcliffe P.J. (2019) Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**(10), 641–659.
 26. Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., Von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel–Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. **292**(5516), 468–472.
 27. Schödel J., Klanke B., Weidemann A., Buchholz B., Bernhardt W., Bertog M., Amann K., Korbmayer C., Wiesener M., Warnecke C., Kurtz A., Eckardt K.U., Willam C. (2009) HIF-prolyl hydroxylases in the rat kidney: physiologic expression patterns and regulation in acute kidney injury. *Am. J. Pathol.* **174**(5), 1663–1674.
 28. Appelhoff R.J., Tian Y.M., Raval R.R., Turley H., Harris A.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Gleadle J.M. (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem.* **279**(37), 38458–38465.
 29. Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J., Whitelaw M.L. (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*. **295**(5556), 858–861.
 30. Koivunen P., Hirsilä M., Günzler V., Kivirikko K.I., Myllyharju J. (2004) Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **279**(11), 9899–9904.
 31. Kaelin W.G., Ratcliffe P.J. (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell*. **30**(4), 393–402.

32. Arany Z., Huang L.E., Eckner R., Bhattacharya S., Jiang C., Goldberg M.A., Bunn H.F., Livingston D.M. (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**(23), 12969–12973.
33. Kietzmann T., Mennerich D., Dimova E.Y. (2016) Hypoxia-inducible factors (HIFs) and phosphorylation: impact on stability, localization, and transactivity. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 11.
34. Mottet D., Dumont V., Deccache Y., Demazy C., Ninane N., Raes M., Michiels C. (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase β pathway in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**(33), 31277–31285.
35. Du S.C., Zhu L., Wang Y.X., Liu J., Zhang D., Chen Y.L., Peng Q., Liu W., Liu B. (2019) SENP1-mediated deSUMOylation of USP28 regulated HIF-1 α accumulation and activation during hypoxia response. *Cancer Cell Int.* **19**, 4.
36. Xu D., Yao Y., Lu L., Costa M., Dai W. (2010) Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1 α . *J. Biol. Chem.* **285**(50), 38944–38950.
37. Li C., Park S., Zhang X., Dai W., Xu D. (2017) Mutual regulation between Polo-like kinase 3 and SIAH2 E3 ubiquitin ligase defines a regulatory network that fine-tunes the cellular response to hypoxia and nickel. *J. Biol. Chem.* **292**(27), 11431–11444.
38. Aquino Perez C., Palek M., Stolarova L., von Morgen P., Macurek L. (2020) Phosphorylation of PLK3 is controlled by protein phosphatase 6. *Cells*. **9**(6), 1506.
39. Warfel N.A., Dolloff N.G., Dicker D.T., Malysz J., El-Deiry W.S. (2013) CDK1 stabilizes HIF-1 α via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth. *Cell Cycle*. **12**(23), 3689–3701.
40. Neckers L. (2022) Oxygen-independent, CDK4/CDK6-dependent degradation of hypoxia-inducible factor-1 α takes cancers' breath away. *Oncotarget*. **13**, 16–17.
41. Bullen J.W., Tchernyshyov I., Holewinski R.J., Devine L., Wu F., Venkatraman V., Kass D.L., Cole R.N., Van Eyk J., Semenza G.L. (2016) Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. *Sci. Signal.* **9**(430), ra56.
42. Lucia K., Wu Y., Garcia J.M., Barlier A., Buchfelder M., Saeger W., Renner U., Stalla G.K., Theodoropoulou M. (2020) Hypoxia and the hypoxia inducible factor 1 α activate protein kinase A by repressing RII beta subunit transcription. *Oncogene*. **39**(16), 3367–3380.
43. Jeong J.W., Bae M.K., Ahn M.Y., Kim S.H., Sohn T.K., Bae M.H., Yoo M.A., Song E.J., Lee K.J., Kim K.W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. **111**(5), 709–720.
44. Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W.G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J.Q., Harris S., Wiedemann L.M., Mishina Y., Li L. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. **425**(6960), 836–841.
45. Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., Weber J.M., Olson D.P., Knight M.C., Martin R.P., Schipani E., Divieti P., Bringham F.R., Milner L.A., Kronenberg H.M., Scadden D.T. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. **425**(6960), 841–846.
46. Mohyeldin A., Garzón-Muvdi T., Quiñones-Hinojosa A. (2010) Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. **7**(2), 150–161.
47. Nombela-Arrieta C., Pivarnik G., Winkel B., Canty K.J., Harley B., Mahoney J.E., Park S.Y., Lu J., Protopopov A., Silberstein L.E. (2013) Quantitative imaging of hematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* **15**(5), 533.
48. Parmar K., Mauch P., Vergilio J.A., Sackstein R., Down J.D. (2007) Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**(13), 5431–5436.
49. Kunisaki Y., Bruns I., Scheiermann C., Ahmed J., Pinho S., Zhang D., Mizoguchi T., Wei Q., Lucas D., Ito K., Mar J.C., Bergman A., Frenette P.S. (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. **502**(7473), 637–643.
50. Méndez-Ferrer S., Michurina T. V., Ferraro F., Mazloom A.R., MacArthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N., Frenette P.S. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. **466**(7308), 829–834.
51. Takubo K., Goda N., Yamada W., Iriuchishima H., Ikeda E., Kubota Y., Shima H., Johnson R.S., Hirao A., Suematsu M., Suda T. (2010) Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. **7**(3), 391–402.
52. Takubo K., Nagamatsu G., Kobayashi C.I., Nakamura-Ishizu A., Kobayashi H., Ikeda E., Goda N., Rahimi Y., Johnson R.S., Soga T., Hirao A., Suematsu M., Suda T. (2013) Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. **12**(1), 49–61.
53. Ito K., Suda T. (2014) Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**(4), 243.
54. Yu W.M., Liu X., Shen J., Jovanovic O., Pohl E.E., Gerson S.L., Finkel T., Broxmeyer H.E., Qu C.K. (2013) Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*. **12**(1), 62–74.
55. Ito K., Hirao A., Arai F., Matsuoka S., Takubo K., Hamaguchi I., Nomiyama K., Hosokawa K., Sakurada K., Nakagata N., Ikeda Y., Mak T.W., Suda T. (2004) Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. **431**(7011), 997–1002.
56. Norddahl G.L., Pronk C.J., Wahlestedt M., Sten G., Nygren J.M., Ugale A., Sigvardsson M., Bryder D. (2011) Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes dis-

- tinct from physiological stem cell aging. *Cell Stem Cell*. **8**(5), 499–510.
57. Piccoli C., D'Aprile A., Scrima R., Ripoli M., Boffoli D., Tabilio A., Capitanio N. (2007) Role of reactive oxygen species as signal molecules in the pre-commitment phase of adult stem cells. *Ital. J. Biochem.* **56**(4), 295–301.
 58. Inoue S.I., Noda S., Kashima K., Nakada K., Hayashi J.I., Miyoshi H. (2010) Mitochondrial respiration defects modulate differentiation but not proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells. *FEBS Lett.* **584**(15), 3402–3409.
 59. Vannini N., Girotra M., Naveiras O., Nikitin G., Campos V., Giger S., Roch A., Auwerx J., Lutolf M.P. (2016) Specification of haematopoietic stem cell fate via modulation of mitochondrial activity. *Nat. Commun.* **7**, 13125.
 60. Mistry J.J., Bowles K., Rushworth S.A. (2023) HSC-derived fatty acid oxidation in steady-state and stressed hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **117**, 1–8.
 61. Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L., Dang C.V. (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**(3), 177–185.
 62. Guitart A.V., Subramani C., Armesilla-Diaz A., Smith G., Sepulveda C., Gezer D., Vukovic M., Dunn K., Pollard P., Holyoake T.L., Enver T., Ratcliffe P.J., Kranc K.R. (2013) Hif-2 α is not essential for cell-autonomous hematopoietic stem cell maintenance. *Blood*. **122**(10), 1741–1745.
 63. Vukovic M., Sepulveda C., Subramani C., Guitart A.V., Mohr J., Allen L., Panagopoulou T.I., Paris J., Lawson H., Villacreses A., Armesilla-Diaz A., Gezer D., Holyoake T.L., Ratcliffe P.J., Kranc K.R. (2016) Adult hematopoietic stem cells lacking Hif-1 α self-renew normally. *Blood*. **127**(23), 2841–2846.
 64. Kocabas F., Zheng J., Thet S., Copeland N.G., Jenkins N.A., DeBerardinis R.J., Zhang C., Sadek H.A. (2012) Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood*. **120**(25), 4963–4972.
 65. Wang Y.H., Israelsen W.J., Lee D., Yu V.W.C., Jeanson N.T., Clish C.B., Cantley L.C., Vander Heiden M.G., Scadden D.T. (2014) Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell*. **158**(6), 1309–1323.
 66. Morganti C., Cabezas-Wallscheid N., Ito K. (2022) Metabolic regulation of hematopoietic stem cells. *Hemasphere*. **6**(7), e740.
 67. Motohashi H., Yamamoto M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.* **10**(11), 549–557.
 68. Okawa H., Motohashi H., Kobayashi A., Aburatani H., Kensler T.W., Yamamoto M. (2006) Hepatocyte-specific deletion of the *Keap1* gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**(1), 79–88.
 69. Goto M., Kitamura H., Alam M.M., Ota N., Haseba T., Akimoto T., Shimizu A., Takano-Yamamoto T., Yamamoto M., Motohashi H. (2015) Alcohol dehydrogenase 3 contributes to the protection of liver from non-alcoholic steatohepatitis. *Genes Cells*. **20**(6), 464–480.
 70. Honkura Y., Matsuo H., Murakami S., Sakiyama M., Mizutani K., Shiotani A., Yamamoto M., Morita I., Shinomiya N., Kawase T., Katori Y., Motohashi H. (2016) NRF2 is a key target for prevention of noise-induced hearing loss by reducing oxidative damage of cochlea. *Sci. Rep.* **6**, 19329.
 71. Murakami S., Suzuki T., Harigae H., Romeo P.-H., Yamamoto M., Motohashi H. (2017) NRF2 activation impairs quiescence and bone marrow reconstitution capacity of hematopoietic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **37**(19), e00086–17.
 72. Mantel C.R., O'Leary H.A., Chitteti B.R., Huang X., Cooper S., Hangoc G., Brustovetsky N., Srouf E.F., Lee M.R., Messina-Graham S., Haas D.M., Falah N., Kapur R., Pelus L.M., Bardeesy N., Fitamant J., Ivan M., Kim K.S., Broxmeyer H.E. (2015) Enhancing hematopoietic stem cell transplantation efficacy by mitigating oxygen shock. *Cell*. **161**(7), 1553–1565.
 73. Baines C.P., Kaiser R.A., Purcell N.H., Blair N.S., Osinska H., Hambleton M.A., Brunskill E.W., Sayen M.R., Gottlieb R.A., Dorn G.W., Bobbins J., Molkentin J.D. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. **434**(7033), 658–662.
 74. Broxmeyer H.E., O'Leary H.A., Huang X., Mantel C. (2015) The importance of hypoxia and extra physiologic oxygen shock/stress for collection and processing of stem and progenitor cells to understand true physiology/pathology of these cells *ex vivo*. *Curr. Opin. Hematol.* **22**(4), 273–278.
<https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000144>
 75. Broxmeyer H.E. (2016) Enhancing the efficacy of engraftment of cord blood for hematopoietic cell transplantation. *Transfus. Apher. Sci.* **54**(3), 364.
 76. Aljoufi A., Cooper S., Broxmeyer H.E. (2020) Collection and processing of mobilized mouse peripheral blood at lowered oxygen tension yields enhanced numbers of hematopoietic stem cells. *Stem Cell Rev. Rep.* **16**(5), 946.
 77. Broxmeyer H.E., Capitanio M.L., Cooper S., Potchanant E.S., Clapp D.W. (2021) Numbers of long-term hematopoietic stem cells from bone marrow of *fanca* and *fancc* knockout mice can be greatly enhanced by their collection and processing in physioxia conditions. *Blood Cells Mol. Dis.* **86**, 102492.
 78. Aljoufi A., Zhang C., Ropa J., Chang W., Palam L.R., Cooper S., Ramdas B., Capitanio M.L., Broxmeyer H.E., Kapur R. (2022) Physioxia-induced downregulation of *Tet2* in hematopoietic stem cells contributes to enhanced self-renewal. *Blood*. **140**(11), 1263–1277.
 79. Broxmeyer H.E., Ropa J., Capitanio M.L., Cooper S., Racioppi L., Sankar U. (2022) CaMKK2 knockout bone marrow cells collected/processed in low oxygen (Physioxia) suggests CaMKK2 as a hematopoietic stem to progenitor differentiation fate determinant. *Stem Cell Rev. Rep.* **18**(7), 2513.

80. Capitano M.L., Mohamad S.F., Cooper S., Guo B., Huang X., Gunawan A.M., Sampson C., Ropa J., Srour E.F., Orschell C.M., Broxmeyer H.E. (2021) Mitigating oxygen stress enhances aged mouse hematopoietic stem cell numbers and function. *J. Clin. Invest.* **131**(1), e140177.
81. Cai Q., Capitano M., Huang X., Guo B., Cooper S., Broxmeyer H.E. (2018) Combinations of antioxidants and/or of epigenetic enzyme inhibitors allow for enhanced collection of mouse bone marrow hematopoietic stem cells in ambient air. *Blood Cells Mol. Dis.* **71**, 23.
82. Mohrin M., Widjaja A., Liu Y., Luo H., Chen D. (2018) The mitochondrial unfolded protein response is activated upon hematopoietic stem cell exit from quiescence. *Aging Cell.* **17**(3), e12756.
83. Mohrin M., Shin J., Liu Y., Brown K., Luo H., Xi Y., Haynes C.M., Chen D. (2015) Stem cell aging. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science.* **347**(6228), 1374.
84. Zhang H., Ryu D., Wu Y., Gariani K., Wang X., Luan P., D'Amico D., Ropelle E.R., Lutolf M.P., Aebersold R., Schoonjans K., Menzies K.J., Auwerx J. (2016) NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science.* **352**(6292), 1436–1443.
85. Naka K., Muraguchi T., Hoshii T., Hirao A. (2008) Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* **10**(11), 1883–1894.
86. Chen C., Liu Y., Liu R., Ikenoue T., Guan K.L., Liu Y., Zheng P. (2008) TSC–mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J. Exp. Med.* **205**(10), 2397–2408.
87. Qian P., He X.C., Paulson A., Li Z., Tao F., Perry J.M., Guo F., Zhao M., Zhi L., Venkatraman A., Haug J.S., Parmely T., Li H., Dobrowsky R.T., Ding W.X., Kono T., Ferguson-Smith A.C., Li L. (2016) The *Dlk1–Gtl2* locus preserves LT-HSC function by inhibiting the PI3K–mTOR pathway to restrict mitochondrial metabolism. *Cell Stem Cell.* **18**(2), 214–228.
88. Boettcher S., Manz M.G. (2017) Regulation of inflammation- and infection-driven hematopoiesis. *Trends Immunol.* **38**(5), 345–357.
89. Silberstein L., Goncalves K.A., Kharchenko P. V., Turcotte R., Kfoury Y., Mercier F., Baryawno N., Severe N., Bachand J., Spencer J.A., Papazian A., Lee D., Chitteti B.R., Srour E.F., Hoggatt J., Tate T., Lo Celso C., Ono N., Nutt S., Heino J., Sipilä K., Shioda T., Osawa M., Lin C.P., Hu G.F., Scadden D.T. (2016) Proximity-based differential single-cell analysis of the niche to identify stem/progenitor cell regulators. *Cell Stem Cell.* **19**(4), 530–543.
90. Ziegler P., Boettcher S., Takizawa H., Manz M.G., Brummendorf T.H. (2016) LPS-stimulated human bone marrow stroma cells support myeloid cell development and progenitor cell maintenance. *Ann. Hematol.* **95**(2), 173–178.
91. Mistry J.J., Marlein C.R., Moore J.A., Hellmich C., Wojtowicz E.E., Smith J.G.W., Macaulay I., Sun Y., Morfakis A., Patterson A., Horton R.H., Divekar D., Morris C.J., Haestier A., Palma F. Di, Beraza N., Bowles K.M., Rushworth S.A. (2019) ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**(49), 24610–24619.
92. Kiel M.J., Yilmaz Ö.H., Iwashita T., Yilmaz O.H., Terhorst C., Morrison S.J. (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* **121**(7), 1109–1121.
93. Luo S.T., Zhang D.M., Qin Q., Lu L., Luo M., Guo F.C., Shi H.S., Jiang L., Shao B., Li M., Yang H.S., Wei Y.Q. (2017) The promotion of erythropoiesis via the regulation of reactive oxygen species by lactic acid. *Sci. Rep.* **7**(1), 38105.
94. Horton E.S., Beisel W.R. (1994) The metabolic responses to stress and physical activity. In: *Food Components to Enhance Performance: An Evaluation of Potential Performance-Enhancing Food Components for Operational Rations*. Ed. Marriott B.M. Washington: Natl. Acad. Press, p. 529.
95. Pearce E.L., Pearce E.J. (2013) Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity.* **38**(4), 633–643.
96. Pfeiffer T., Schuster S., Bonhoeffer S. (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science.* **292**(5516), 504–507.
97. Ito K., Carracedo A., Weiss D., Arai F., Ala U., Avigan D.E., Schafer Z.T., Evans R.M., Suda T., Lee C.H., Pandolfi P.P. (2012) A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Med.* **18**(9), 1350–1358.
98. Ito K., Turcotte R., Cui J., Zimmerman S.E., Pinho S., Mizoguchi T., Arai F., Runnels J.M., Alt C., Teruya-Feldstein J., Mar J.C., Singh R., Suda T., Lin C.P., Frenette P.S., Ito K. (2016) Self-renewal of a purified Tie2⁺ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science.* **354**(6316), 1156.
99. Mistry J.J., Hellmich C., Moore J.A., Jibril A., Macaulay I., Moreno-Gonzalez M., Di Palma F., Beraza N., Bowles K.M., Rushworth S.A. (2021) Free fatty-acid transport via CD36 drives β -oxidation-mediated hematopoietic stem cell response to infection. *Nat. Commun.* **12**(1), 7130.
100. Takakuwa T., Nakashima Y., Koh H., Nakane T., Nakamae H., Hino M. (2019) Short-term fasting induces cell cycle arrest in immature hematopoietic cells and increases the number of naïve T cells in the bone marrow of mice. *Acta Haematol.* **141**(3), 189–198.
101. Tiwari S.K., Toshniwal A.G., Mandal S., Mandal L. (2020) Fatty acid β -oxidation is required for the differentiation of larval hematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Elife.* **9**, e53247.

Regulation of Metabolism and the Role of Redox Factors in the Energy Control of Quiescence and Proliferation of Hematopoietic Cells

M. V. Kalashnikova¹, N. S. Polyakova¹, and A. V. Belyavsky¹, *

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: abelyavs@yahoo.com*

One of the key regulators of hematopoietic stem cell (HSC) maintenance is cellular metabolism. Resting HSCs use anaerobic glycolysis as the main source of energy. During expansion and differentiation under conditions of steady state hematopoiesis, the energy needs of activated HSC increase many fold. To meet the increased demands, cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation, which is accompanied by the increase in reactive oxygen species (ROS) production. Here, the molecular mechanisms maintaining glycolysis in HSCs as well as the factors determining the increase in metabolic activity and the transition to mitochondrial biogenesis during HSC activation are considered. We focus on the role of HIF (hypoxia-inducible factor) proteins as key mediators of the cellular response to hypoxia, and also consider the phenomenon of extraphysiological oxygen shock (EPHOSS), leading to the forced differentiation of HSCs as well as methods of overcoming it. Finally, the role of fatty acid oxidation (FAO) in hematopoiesis is discussed. Understanding the metabolic needs of normal HSCs and precursors is crucial for the development of new treatments for diseases related to the hematopoietic and immune systems.

Keywords: hematopoiesis, hematopoietic stem cells, anaerobic glycolysis, stress hematopoiesis, mitochondrial biogenesis, fatty acid oxidation, HIF, oxidative stress, redox factors, reactive oxygen species

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.2

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТРЕСС ЭРИТРОЦИТОВ ИНДУЦИРУЕТ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА

© 2023 г. П. И. Зарипов^{a, b}, Ю. Д. Кулешова^a, Ю. М. Полуэктов^{a, c}, С. В. Сидоренко^b, О. К. Кван^c,
Г. В. Максимов^b, В. А. Митькевич^a, А. А. Макаров^a, И. Ю. Петрушанко^a, *

^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^bБиологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^cНациональный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко,
Москва, 125047 Россия

*e-mail: irina-pva@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2023 г.

После доработки 14.07.2023 г.

Принята к публикации 14.07.2023 г.

Метаболический стресс, вызванный недостатком глюкозы, существенно влияет на состояние эритроцитов, в которых гликолиз является основным путем производства АТФ. Гипогликемия может быть как физиологической, возникающей при голодании и больших физических нагрузках, так и патологической, сопровождающей ряд заболеваний, таких как сахарный диабет. В данной работе нами охарактеризовано состояние изолированных эритроцитов при метаболическом стрессе, вызванном отсутствием глюкозы. Установлено, что 24 ч инкубации эритроцитов в безглюкозной среде, имитирующей плазму крови, приводит к снижению уровня АТФ в 2 раза относительно соответствующего временного контроля. По-видимому, наблюдаемое при этом увеличение размера клеток и повышение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ связано с нарушением работы ионных транспортеров из-за падения концентрации АТФ. При недостатке глюкозы в среде в изолированных эритроцитах не изменялся уровень ни ионов Ca^{2+} , ни активных форм кислорода (АФК), ни оксида азота (NO), в то время как уровень основного низкомолекулярного тиола клеток глутатиона (GSH) снижался почти в 2 раза. Выявлено, что метаболический стресс изолированных эритроцитов, несмотря на отсутствие роста АФК, индуцирует глутатионилирование гемоглобина. Это связано с недостатком АТФ, что приводит к снижению уровня восстановленного GSH за счет ингибирования его синтеза, а также, вероятно, со снижением концентрации NADPH, необходимого для восстановления окисленного глутатиона (GSSG) и для деглутатионилирования белков. Таким образом, метаболический стресс эритроцитов индуцирует глутатионилирование гемоглобина, не связанное с ростом АФК. Этот процесс может иметь важное физиологическое значение, так как глутатионилирование гемоглобина изменяет его сродство к кислороду.

Ключевые слова: эритроциты, метаболический стресс, глутатионилирование гемоглобина, редокс-статус эритроцитов, глутатион

DOI: 10.31857/S0026898423060241, **EDN:** SMPPEE

ВВЕДЕНИЕ

Эритроциты — самые многочисленные клетки крови, обеспечивающие снабжение всех органов и тканей кислородом, который переносится основным белком эритроцитов гемоглобином. Продолжительность жизни и функциональная активность эритроцитов определяется условиями их созревания в красном костном мозге, а также различными стрессовыми факторами и составляет в среднем около 115 дней [1]. Вследствие отсутствия органелл и рибосом эритроцит имеет ограниченный и невосполняемый запас белков [1–3], окислительное повреждение которых приводит к изменению функционирования и старению эритроцита [4].

Перемещаясь по кровотоку, эритроциты испытывают механический, осмотический и метаболический стресс. Последний во многом обусловлен прохождением клеток через органы и ткани с различным содержанием кислорода и доступностью питательных веществ, что в свою очередь влияет на редокс-статус эритроцитов и их способность восполнять уровень АТФ. Выраженность стресса определяется функциональным состоянием организма. Метаболический стресс в эритроцитах возникает при дефиците АТФ и NADPH вследствие снижения уровня глюкозы в крови при голодании или метаболических нарушениях [5]. Так, например, сахарный диабет (СД) типа 1 и 2

приводит к сверхфизиологическим колебаниям уровня глюкозы, а заболевания дыхательной системы (например, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма, фиброз легких) приводят к формированию дыхательной недостаточности, метаболического ацидоза и хронической гипоксии [6, 7]. Пожилые люди с диабетом имеют более высокий риск гипогликемии из-за возрастного нарушения целого ряда адаптивных физиологических реакций [8]. Хроническая гипогликемия повышает риск когнитивной дисфункции и сердечно-сосудистых заболеваний. Частота возникновения гипогликемических эпизодов коррелирует с длительностью заболевания СД и продолжительностью лечения инсулином [9]. Для того, чтобы предотвратить или уменьшить влияние гипогликемии на функциональное состояние эритроцитов, необходимо понимать, к каким изменениям состояния эритроцитов приводит данный фактор.

Из-за отсутствия митохондрий эритроцитам недоступен аэробный путь получения АТФ с помощью дыхания [10], и в зрелых эритроцитах гликолиз является единственным источником АТФ. На синтез АТФ посредством гликолиза затрачивается около 90% поступающей в эритроциты глюкозы, а оставшиеся 10% направляется по пентозофосфатному пути, в котором происходит образование NADPH [11]. При активном расходовании NADPH концентрация NADP^+ в цитозоле эритроцитов растет, в результате чего активируется пентозофосфатный путь, позволяющий восстановить окисленный NADPH. Дефицит АТФ приводит к нарушению функции трансмембранных ионных насосов (Na^+/K^+ -АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы), обеспечивающих поддержание ионного градиента, а также синтеза восстановленного глутатиона (GSH), являющегося важным звеном антиоксидантной защиты; метаболизма пуринов и пиримидинов; поддержания железа гемоглобина в восстановленном состоянии (Fe^{2+}); защиты клеточных белков от окислительного повреждения; сохранения асимметрии мембранных фосфолипидов [10, 12]. Неспособность эритроцитов обеспечить свои энергетические потребности при гипогликемии приводит к нарушению работы антиоксидантной системы, повреждению ограниченного запаса белков, ускорению процессов старения и преждевременному гемолизу [13].

Процессы формирования активных форм кислорода (АФК) в эритроцитах до конца не изучены, однако известно, что аутоокисление гемоглобина приводит к продукции супероксид-аниона. Дисфункция ионных транспортеров, перегрузка кальцием, а также формирование АФК эндотелиальными клетками приводят к окислительному стрессу в эритроцитах, что в свою очередь индуцирует перекисное окисление липидов и окислитель-

ное повреждение белков [14]. Антиоксидантная система эритроцитов состоит из ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), катализа, пероксиредоксин-2, глутаредоксин, глутатионпероксидаза, NADPH, и пула восстановленного GSH [4] — основного низкомолекулярного тиола клеток млекопитающих [15]. При развитии окислительного стресса GSH взаимодействует с АФК и окисленными до SOH тиоловыми группами белков, что приводит к существенному снижению отношения восстановленного глутатиона к окисленному глутатиону (GSH/GSSG) и инициирует запуск глутатионилирования тиоловых групп белков [16]. Глутатионилирование тиоловых групп не только предотвращает их необратимое окисление, но и в ряде случаев изменяет функциональную активность белка [17, 18]. При нормализации редокс-статуса, а именно восстановлении уровня NADPH, глутаредоксин осуществляет деглутатионилирование SH-групп белков [16]. Гемоглобин также способен подвергаться глутатионилированию, которое считается одним из маркеров окислительного стресса эритроцитов [19]. В настоящее время имеющиеся в литературе данные о влиянии депривации глюкозы на состояние эритроцитов в организме [20, 21] и изолированных эритроцитов [22, 23] несколько противоречивы, поэтому вопрос о влиянии глюкозного голодания на редокс-статус изолированных эритроцитов и редокс-зависимые модификации гемоглобина остается открытым.

Понимание ключевых механизмов повреждения и адаптации эритроцитов при метаболическом стрессе позволит разработать новые подходы для повышения их адаптационной способности при различных патологических состояниях. В данной работе мы охарактеризовали состояние эритроцитов при метаболическом стрессе, индуцированном отсутствием глюкозы, по изменению их размера, уровня АТФ, внутриклеточного редокс-статуса, ионного гомеостаза и степени глутатионилирования гемоглобина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка образцов. Забор образцов проводили во время донации цельной донорской крови из контейнера Бактивам (“Maco Pharma”, Франция) в пробирку с гепарином после поворота — для предотвращения попадания воздуха в адаптер для вакуумных пробирок Вакувам (“Improvacuter”, Россия). Отсутствие воздуха предотвращало активацию клеточного состава, гепарин необходим для антикоагуляции. Для получения эритроцитов кровь центрифугировали, отбирали супернатант и ресуспендировали эритроциты в буфере, имитирующем плазму крови (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 0.75 mM MgSO_4 , 0.015 mM ZnCl_2 , 100 мкМ L-аргинин, 200 мкМ глутамат натрия, 200 мкМ

глицин, 200 мкМ аланин, 600 мкМ глутамин, 20 мМ HEPES-имидазол, pH 7.4), как описано ранее [24]. Процедуру центрифугирования повторяли трижды. В буфер, используемый для ресуспендирования контрольной группы, предварительно добавили 10 мМ глюкозы. Отмытые эритроциты ресуспендировали соответствующим буфером (в объемном соотношении 1 : 2) и инкубировали в буфере с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс) в течение 24 ч при 37°C.

Проточная цитометрия. Методом проточной цитофлуориметрии проведен анализ внутриклеточного редокс-статуса клеток по уровням GSH, АФК и оксида азота (NO), а также определен уровень внутриклеточного кальция (Ca^{2+}). Для окрашивания клеток флуоресцентными красителями 1 мкл суспензии эритроцитов ресуспендировали в 100 мкл буфера, имитирующего плазму крови, с глюкозой (контроль) и без глюкозы (стресс). Содержание низкомолекулярных тиолов оценивали с использованием флуоресцентного красителя монобромбимана (Ex/Em = 392/490 нм; “Thermo Fisher Scientific”, США), который добавляли до конечной концентрации 20 мкМ [24]. Уровень АФК и уровень NO определяли с помощью окрашивания 5 мкМ дигидрородамина 123 (DHR123) (Ex/Em = 507/525 нм; “Thermo Fisher Scientific”) [25] и 5 мкМ DAF-FM DA (Ex/Em = 495/515 нм; “Thermo Fisher Scientific”) [26] соответственно. Внутриклеточный Ca^{2+} определяли окрашиванием клеток 2.5 мкМ Fluo-4 (Ex/Em = 494/506 нм; “Thermo Fisher Scientific”), как описано ранее [27]. После окрашивания клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин при 37°C. Также оценивали среднее значение параметров малоуглового (FSC) и бокового светорассеяния (SSC), характеризующих соответственно размер и форму/гранулярность клеток [28]. Анализ эритроцитов проводили на проточном цитофлуориметре BD LSR-Fortessa™ (“Becton Dickinson”, США).

Атомно-абсорбционная спектроскопия. Методом атомно-абсорбционной спектроскопии оценивали содержание ионов Na^+ и K^+ в контрольных образцах и образцах после стресса, как описано ранее [29]. После завершения эксперимента клетки несколько раз отмывали холодным раствором 0.1 М MgCl_2 путем центрифугирования при 2000 g в течение 10 мин с последующим отбором супернатанта и ресуспендированием клеток в 0.1 М MgCl_2 . После отмывки осажденные клетки ресуспендировали в 5%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ) для осаждения белков [30]. После центрифугирования в течение 10 мин при 13 700 g супернатант собирали и определяли в нем концентрации ионов Na^+ и K^+ на приборе Квант-2М (“КОРТЭК”, Россия) [31]. Осадок растворяли в 0.1 М NaOH и использовали для определения белка по методу Бредфорда. Полученные значе-

ния концентраций Na^+ и K^+ в пробах нормировали на содержание в них белка.

Оценка уровня АТФ. Содержание АТФ в клетках оценивали по уровню флуоресценции на микропланшетном ридере Spark (“Tecan”, Австрия) при помощи набора ATP Assay Kit (“Sigma-Aldrich”, США) [26].

Иммуноблоттинг. Глутатионилирование гемоглобина в клетках оценивали методом иммуноблоттинга. После инкубации клеток в безглюкозной среде или в контрольных условиях эритроциты лизировали путем трехкратного цикла разморозки–заморозки и добавляли буфер для образцов (Tris-Glycine SDS sample-buffer; “Novex”, США) без меркаптоэтанола. Электрофорез проводили в 14%-ном ПААГ. Перед инкубацией в блокирующем буфере (5%-ное молоко) мембраны фиксировали 5%-ным раствором формалина в течение 40 мин (для снижения потерь α - и β -субъединиц гемоглобина, M_r 12–13 кДа). Уровень глутатионилирования гемоглобина оценивали с использованием антител на глутатион в составе белков (MAB5310; “Millipore”, США) в разведении 1 : 1000. Полученный сигнал нормировали на содержание α - и β -субъединиц гемоглобина, которое оценивали с использованием коммерческих антител (ab92492 и ab214049 соответственно; “Abcam”, Великобритания) в разведении 1 : 1000.

Статистическая обработка. Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8. Нормальность распределения данных оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий между двумя группами использовали парный t -критерий Стьюдента для двух зависимых (парных) выборок. При значении $p < 0.05$ различия между средними значениями групп считали достоверными. На графиках приведены средние значения и величина стандартного отклонения, рассчитанные на основании 3–5 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью оценить влияние депривации по глюкозе на энергетический баланс эритроцитов определяли уровень АТФ. Установлено, что инкубация эритроцитов в безглюкозной среде в течение 24 ч приводит к существенному снижению уровня АТФ в клетках – на 47% относительно контроля ($p = 0.0149$) (рис. 1). Известно, что падение уровня АТФ ниже 25% от нормального приводит к разрушению цитоскелета с последующим гемолизом [32]. В условиях проведенного нами эксперимента критического падения внутриклеточного АТФ не зарегистрировано. Таким образом, наблюдаемое через 24 ч депривации по глюкозе снижение содержания АТФ свидетельствует

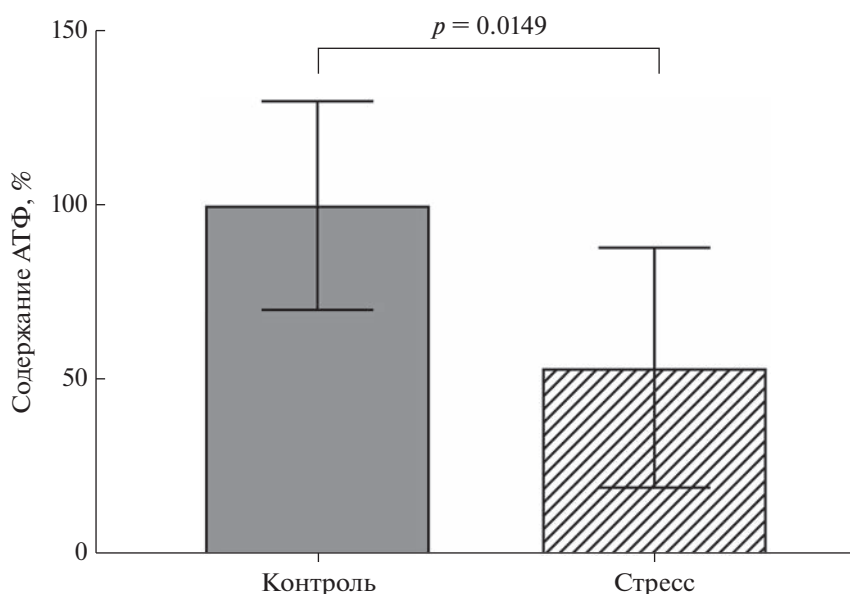


Рис. 1. Содержание АТФ в эритроцитах через 24 ч инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Данные представлены как среднее $\pm$ SD, $n = 3$.

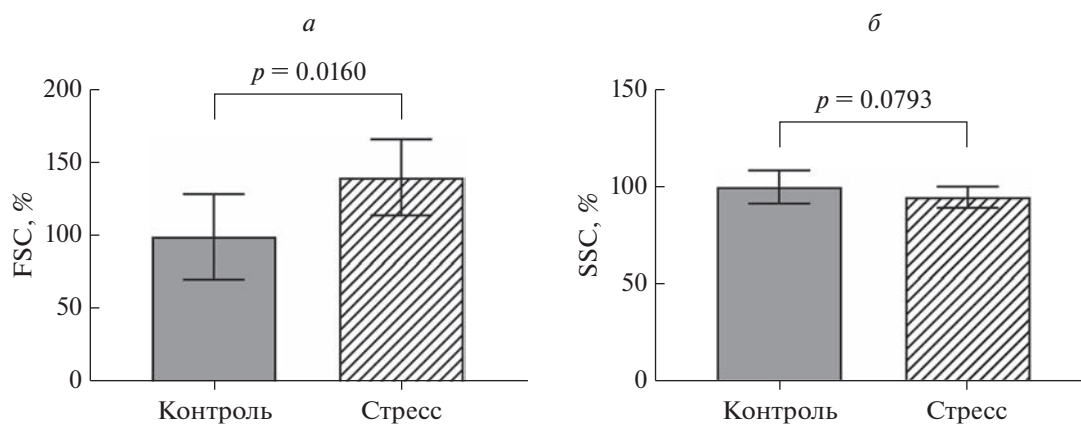


Рис. 2. Изменение параметров малоуглового (FSC) (а) и бокового (SSC) (б) светорассеяния эритроцитов через 24 ч инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Данные представлены как среднее $\pm$ SD, $n = 5$.

об успешной индукции метаболического стресса в эритроцитах.

Как следует из результатов, полученных методом проточной цитометрии, 24-часовая инкубация эритроцитов в безглюкозной среде приводила к росту среднего значения малоуглового рассеяния (FSC), характеризующего размер клеток, на 40% ($p = 0.0160$) (рис. 2а); при этом параметр бокового рассеяния клеток (SSC), характеризующий их гранулярность и форму, практически не изменялся (рис. 2б).

Для того, чтобы выяснить, с чем связано изменение объема клеток, мы оценили внутриклеточ-

ные уровни ионов Na^+ и K^+ . Установлено, что при метаболическом стрессе существенно ($p = 0.0104$) возрастает содержание внутриклеточного Na^+ (рис. 3а). Концентрация K^+ при этом достоверно не меняется, хотя и наблюдается некоторая тенденция к снижению (рис. 3б). Таким образом, увеличение размера клеток связано с нарушением градиента Na^+ и K^+ , что, по-видимому, обусловлено снижением активности Na^+/K^+ -АТФазы.

Как видно из результатов, представленных на рис. 4а, не выявлено значимых отличий в уровне внутриклеточного Ca^{2+} через 24 ч инкубации в безглюкозной среде по сравнению с контролем.

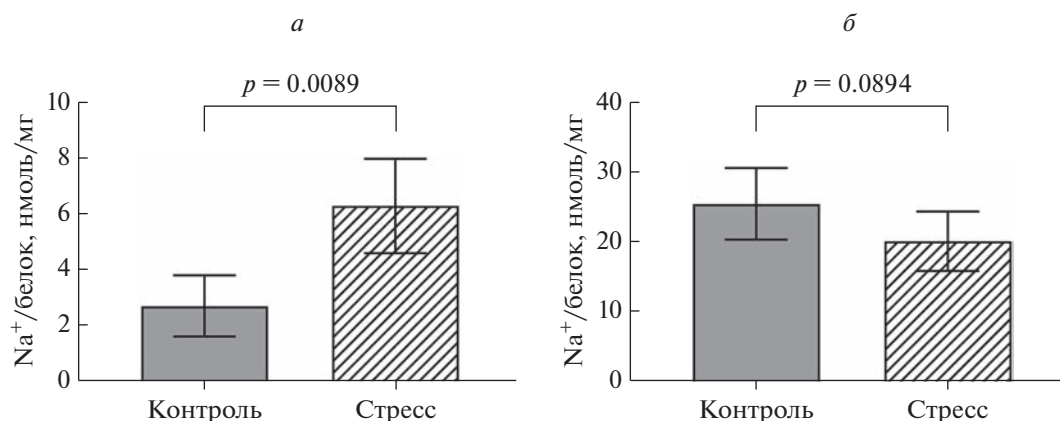


Рис. 3. Содержание в эритроцитах внутриклеточного Na⁺ (а) и K⁺ (б) через 24 ч инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Данные представлены как среднее $\pm$ SD, $n = 3$.

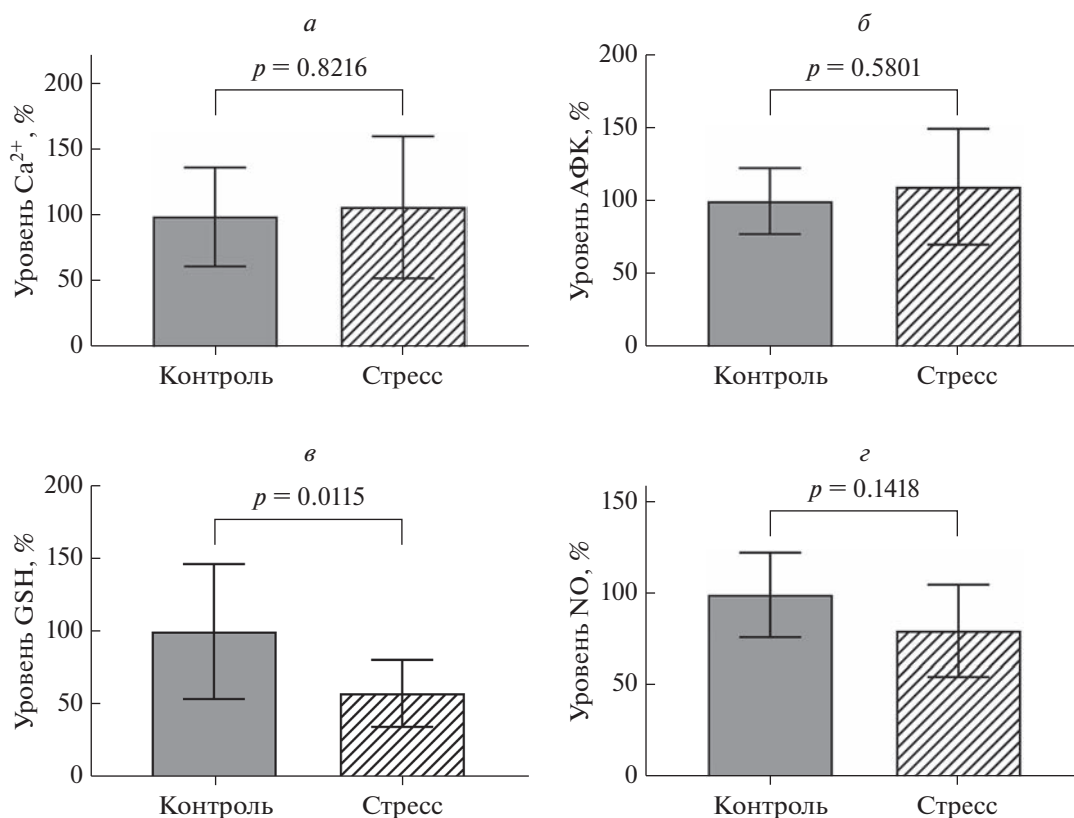


Рис. 4. Уровень Ca²⁺ (а), АФК (б), GSH (в), NO (г) в эритроцитах через 24 ч инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в контроле. Данные представлены как среднее $\pm$ SD, $n = 5$.

Влияние метаболического стресса на редокс-статус эритроцитов оценивали по изменению уровня АФК, GSH и NO при инкубации в условиях депривации глюкозы. Выявлено, что через 24 ч глюкозного голодания уровень АФК не изменялся (рис. 4б), что свидетельствует об отсутствии окислительного стресса. Несмотря на это, наблюдалось значительное, на 42% ($p = 0.0115$), снижение

уровня GSH (рис. 4в). Уровень NO при этом достоверно не изменялся ($p = 0.1418$), хотя тенденция к снижению просматривалась (рис. 4г).

С целью оценить, как метаболический стресс влияет на состояние основного белка эритроцитов — гемоглобина, мы определили степень его глутатионилирования. Согласно результатам им-

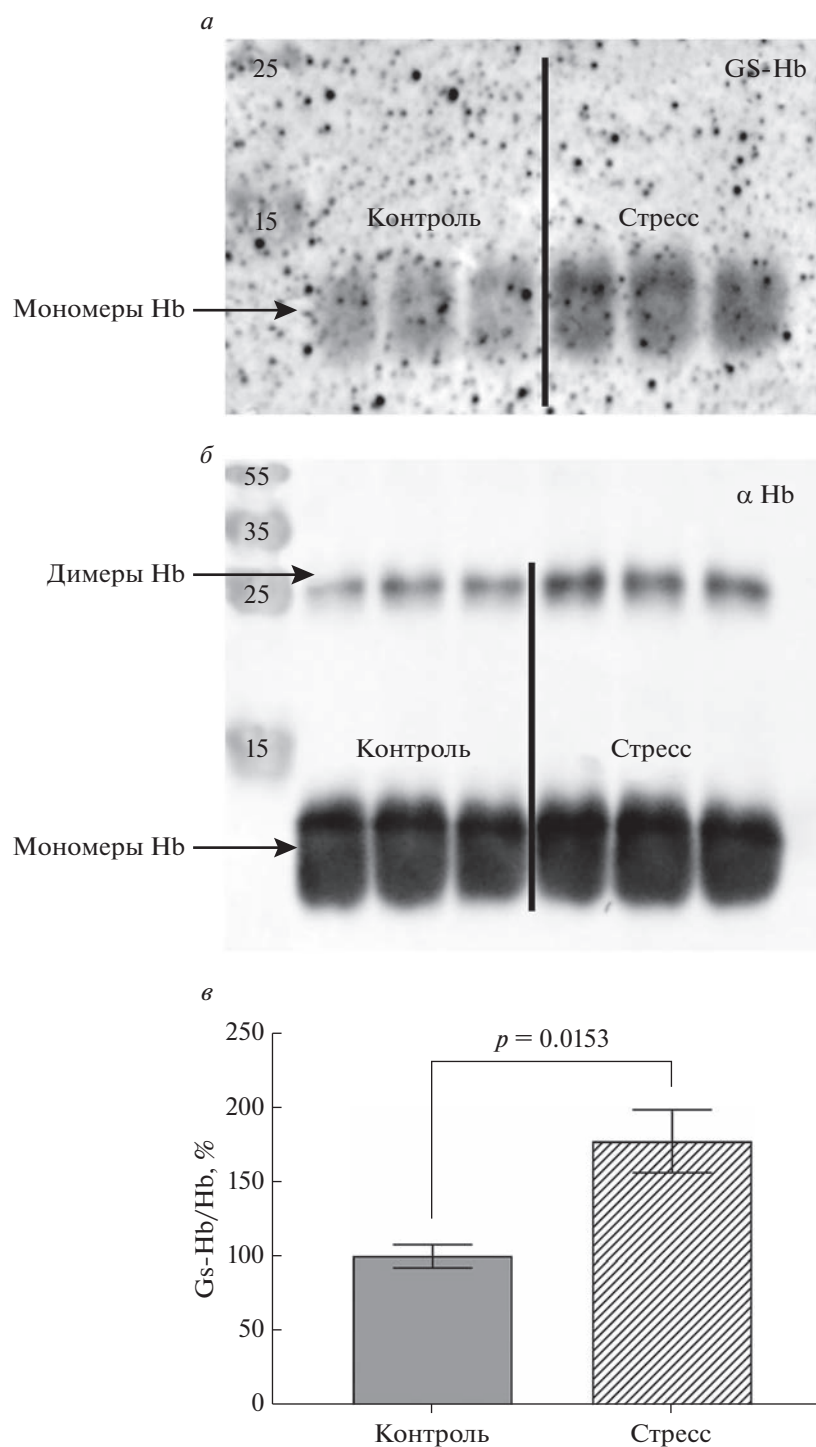


Рис. 5. Уровень глутатионирования гемоглобина (Hb) через 24 ч инкубации эритроцитов в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Иммуноблоттинг с антителами против глутатионированного белка (GS-Hb) (a) и α -субъединицы гемоглобина (α -Hb) (б). в – Результаты количественного анализа. За 100% принят уровень глутатионирования Hb в эритроцитах, инкубируемых в присутствии глюкозы (контроль). Данные представлены как среднее $\pm$ SD.

муноблот-анализа, 24-часовой метаболический стресс эритроцитов приводил к значительному, почти в 2 раза, увеличению степени глутатионирования гемоглобина (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании оценили изменения в состоянии эритроцитов и их основного белка — гемоглобина — в условиях метаболиче-

ского стресса, который был вызван отсутствием глюкозы в среде инкубации. В результате 24-часового голодания по глюкозе в эритроцитах в 2 раза снижался уровень АТФ по сравнению с соответствующим временным контролем (рис. 1). Ранее в литературе описано и более существенное (на 80% от начального значения) снижение АТФ при отсутствии глюкозы в среде [22]. Однако необходимо заметить, что авторы, G. Ромео и др. [22], не приводят данные о соответствующем временном контроле, и описанный ими буфер для эритроцитов не содержал не только глюкозы, но и аминокислот, в то время как нами использована среда, имитирующая плазму крови, в состав которой входил ряд необходимых аминокислот.

В организме человека физиологической нормой считается суточная гликемическая вариабельность, подразумевающая поочередную смену пониженного и повышенного уровня глюкозы [33], который варьирует в пределах 3.9–6.1 ммоль/л. Снижение уровня глюкозы ниже 3.9 ммоль/л считается состоянием гипогликемии, хотя первые симптомы начинают проявляться при снижении содержания глюкозы до 3.0 ммоль/л [8, 34]. При некоторых заболеваниях, таких как СД типа I и II [35, 36], поражениях гипофиза [37], патологических состояниях (сепсис [38]), в том числе обусловленных хирургическим вмешательством (бариатрическая хирургия [39]) и несвоевременной коррекцией гипогликемической терапии [40], может развиваться хроническая гипогликемия, которая влечет за собой развитие окислительного стресса, вызывающего сосудистые осложнения, риск тромбозов и эндотелиальную дисфункцию [41].

Гипогликемия, индуцированная введением инсулина здоровым волонтерам, также приводила к быстрому росту АФК как в эндотелиальных клетках [41], так и в эритроцитах [21], такой же эффект вызвала физическая активность пациентов с СД типа 2 [20]; при этом падал уровень тиолов и снижалась активность СОД [21]. Согласно полученным нами данным, инкубация эритроцитов в отсутствие глюкозы в течение 24 ч не приводит к росту АФК (рис. 4б). Это может быть связано с тем, что в организме АФК возрастает вследствие окислительного стресса эндотелиальных клеток, чего в изолированных эритроцитах не происходит.

Несмотря на отсутствие окислительного стресса в изолированных эритроцитах, нехватка глюкозы приводит к значительному снижению уровня GSH (рис. 4в). Это обусловлено как недостатком NADPH, необходимого для восстановления GSSG глутатионредуктазой, так и нарушением синтеза GSH ферментами синтеза глутатиона: γ -глутамилцистеинсинтетазой и глутатионсинтазой, — вызванного дефицитом АТФ [23]. Ранее показано, что нарушение метаболизма глюкозы

через пентозофосфатный путь в эритроцитах быстро приводит к снижению содержания NADPH и GSH [42]. В отсутствие глюкозы в среде происходит ингибирование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD) — основного фермента пентозофосфатного пути, в ходе которого NADP^+ восстанавливается до NADPH. Известно, что снижение активности G6PD вследствие мутаций или при добавлении ингибитора ведет к повышению чувствительности эритроцитов к окислительному стрессу и, как следствие, к их усиленному гемолизу. Это один из механизмов патогенеза гемолитической анемии. В клетках с дефицитом G6PD GSSG не восстанавливается до GSH; а при окислительном стрессе в клетке не происходит восстановления дисульфидных связей в мембранных белках, которое индуцируется присутствием GSH [43]. При анализе метаболомного состава эритроцитов, испытывающих недостаток глюкозы в течение 48 ч, наблюдали снижение общего пула глутатиона, которое происходило на фоне роста внутриклеточных концентраций непосредственных его предшественников — глутамата и цистеина [23]. Это свидетельствует о том, что вследствие недостатка АТФ снижается активность двух АТФ-зависимых ферментов, участвующих в синтезе глутатиона: γ -глутамилцистеинсинтетазы и глутатионсинтазы. Также наблюдается снижение метаболитов гликолиза и увеличение отношения пирувата к лактату, что свидетельствует о нарушении гомеостаза восстановительных эквивалентов [23].

Условия снижения уровней GSH и NADPH благоприятны для глутатионилирования внутриклеточных белков [17]. Нами обнаружено, что индуцированный метаболический стресс вызывает повышение уровня глутатионилирования основного белка эритроцитов — гемоглобина (рис. 5). Это может иметь важное физиологическое значение, поскольку ранее показано, что глутатионилирование гемоглобина приводит к увеличению его сродства к кислороду [44, 45]. Тетрамер гемоглобина, в состав которого входит 2 α - и 2 β -субъединицы, содержит 6 остатков цистеина — по 1 на каждой α -субъединице (Cys104) и по 2 на каждой β -субъединице (Cys93, Cys112) [46]. Каждая из субъединиц имеет гем, обеспечивающий связывание O_2 [47]. В настоящее время доказано глутатионилирование по остаткам Cys93 β [48] и Cys112 β [45], в то время как данные о глутатионилировании Cys104 α противоречивы [49, 50]. Как нами показано ранее, доступность Cys93 β для глутатионилирования гораздо выше в деоксиформе гемоглобина, в то время как Cys112 β доступен для глутатионилирования как в окси-, так и в деоксиформе, а доступность Cys104 α сомнительна [49]. На рис. 6 показаны остатки цистеина на трехмерной модели гемоглобина человека. Следует заметить, что эксперимент проводили в условиях 20%-ного кислорода, при которых весь гемогло-

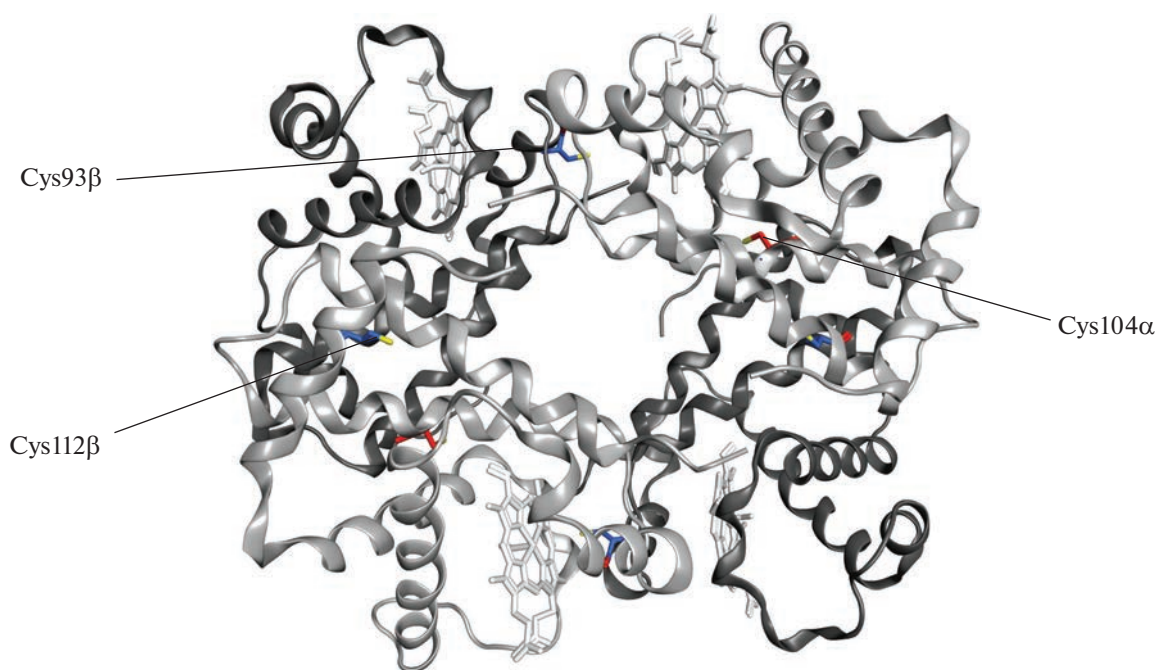


Рис. 6. Структура гемоглобина человека (PDB Асс. No. 1GZX). Темно-серым цветом показаны β -субъединицы молекулы, светло-серым — α -субъединицы. Синим выделены остатки цистеина C93 β и C112 β , которые могут подвергаться глутатионилированию, красным — остаток C104 α , сведения о глутатионилировании которого противоречивы.

бин находится в оксиформе [51]. В этом случае, скорее всего, происходит глутатионилирование остатка Cys112 β .

Необходимо отметить, что значительное повышение степени глутатионилирования гемоглобина описано при диабете, хронической почечной недостаточности и железодефицитной анемии [52]. Причиной возрастания уровня глутатионилирования считают окислительный стресс, развивающийся при этих патологиях. Так, при окислительном стрессе возрастает степень глутатионилирования не только гемоглобина, но и ключевых мембранных белков, а также белков цитоскелета клетки (спектрина, анкирина), что сказывается на реологических свойствах эритроцитов [19]. Несмотря на то, что окислительный стресс относится к одной из наиболее часто встречающихся причин глутатионилирования белков, которое защищает тиоловые группы белков от необратимого окисления и в ряде случаев изменяет их функционирование [17], мы показали, что метаболический стресс в отсутствие роста АФК также может быть индуктором глутатионилирования.

Наблюдаемое нами повышение уровня внутриклеточного Na^+ (рис. 3а), наряду с увеличением среднего размера клеток (рис. 2а), свидетельствует о снижении активности Na^+/K^+ -АТФазы [53] — как следствия падения уровня АТФ (рис. 1). На основании зарегистрированного нами повышения глутатионилированной формы гемоглобина (рис. 5) можно предположить, что в снижение

активности Na^+/K^+ -АТФазы вносит вклад также ее глутатионилирование, которое ингибирует активность фермента [18].

Необходимо также отметить, что гемоглобин может образовывать нековалентный комплекс с глутатионом, высвобождая две из четырех молекул GSH при деоксигенации [49], поэтому снижение уровня глутатиона при метаболическом стрессе влияет на этот процесс и тем самым изменяет адаптационную способность эритроцитов к гипоксии.

Таким образом, метаболический стресс, вызванный недостатком глюкозы, приводит к снижению уровня АТФ и глутатиона, что, несмотря на отсутствие окислительного стресса, индуцирует глутатионилирование гемоглобина. В связи с тем, что глутатионилирование гемоглобина изменяет его сродство к кислороду [44, 45], этот процесс может существенно изменить функциональную активность эритроцитов. На фоне снижения АТФ также нарушается работа ионных транспортеров, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Na^+ и объема эритроцитов. На основании полученных данных можно сделать вывод, что метаболический стресс повышает степень глутатионилирования белков эритроцитов, что может оказывать влияние на функционирование не только гемоглобина, но и других компонентов этих клеток, в частности белков ионного транспорта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00374).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех пациентов получено информированное согласие на проведение медицинского обследования, в том числе взятие образцов крови.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franco R.S. (2012) Measurement of red cell lifespan and aging. *Transfus. Med. Hemotherapy*. **39**, 302–307. <https://doi.org/10.1159/000342232>
2. Moura P.L., Hawley B.R., Mankelov T.J., Griffiths R.E., Dobbe J.G.G., Streekstra G.J., Anstee D.J., Satchwell T.J., Toye A.M. (2018) Non-muscle myosin II drives vesicle loss during human reticulocyte maturation. *Haematologica*. **103**, 1997–2007. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.199083>
3. Ovchinnikova E., Aglialoro F., Von Lindern M., Van Den Akker E. (2018) The shape shifting story of reticulocyte maturation. *Front. Physiol.* **9**, 829. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00829>
4. Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. (2014) Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front. Physiol.* **5**, 84. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>
5. Tang H., Ho H., Wu P., Chen S., Kuypers F.A., Cheng M., Chiu D.T. (2015) Inability to maintain GSH pool in G6PD-deficient red cells causes futile AMPK activation and irreversible metabolic disturbance. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 744–759. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6142>
6. Mamillapalli C., Tentu R., Jain N.K., Bhandari R. (2019) COPD and type 2 diabetes. *Curr. Respir. Med. Rev.* **15**, 112–119. <https://doi.org/10.2174/1573398X15666190211155640>
7. Vasileiadis I., Alevrakos E., Ampelioti S., Vagionas D., Rovina N., Koutsoukou A. (2019) Acid-base disturbances in patients with asthma: a literature review and comments on their pathophysiology. *J. Clin. Med.* **8**, 563. <https://doi.org/10.3390/jcm8040563>
8. Sircar M., Bhatia A., Munshi M. (2016) Review of hypoglycemia in the older adult: clinical implications and management. *Can. J. Diabetes*. **40**, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2015.10.004>
9. UK Hypoglycaemia study group (2007) Risk of hypoglycaemia in types 1 and 2 diabetes: effects of treatment modalities and their duration. *Diabetologia*. **50**, 1140–1147. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0599-y>
10. van Wijk R., van Solinge W.W. (2005) The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*. **106**, 4034–4042. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1622>
11. Pandey K.B., Rizvi S.I. (2011) Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed. Pap.* **155**, 131–136. <https://doi.org/10.5507/bp.2011.027>
12. Miwa S. (1983) Hereditary disorders of red cell enzymes in the emmery-hof pathway. *Am. J. Hematol.* **14**, 381–391. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830140410>
13. Koralkova P., van Solinge W.W., van Wijk R. (2014) Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia – pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int. J. Lab. Hematol.* **36**, 388–397. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12223>
14. Lang F., Abed M., Lang E., Föller M. (2014) Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 138–153. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5747>
15. Gilbert H.F. (2006) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **63**, 69–172.
16. Poluektov Y.M., Petrushanko I.Yu., Undrovinas N.A., Lakunina V.A., Khapchaev A.Y., Kapelko V.I., Abramov A.A., Lakomkin V.L., Novikov M.S., Shirinsky V.P. (2019) Glutathione-related substances maintain cardiomyocyte contractile function in hypoxic conditions. *Sci. Rep.* **9**, 4872. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41266-2>
17. Mielay J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sabens E.A., Shelton M.D. (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1941–1988. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2089>
18. Petrushanko I.Yu., Yakushev S., Mitkevich V.A., Kamanina Y.V., Ziganshin R.H., Meng X., Anashkina A.A., Makhro A., Lopina O.D., Gassmann M. (2012) S-glutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic α subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. *J. Biol. Chem.* **287**, 32195–32205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.391094>
19. Giustarini D., Dalle-Donne I., Milzani A., Braconi D., Santucci A., Rossi R. (2019) Membrane skeletal protein S-glutathionylation in human red blood cells as index of oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 1096–1102. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00408>
20. Brinkmann C., Neumann E., Blossfeld J., Frese S., Orthmann P., Montiel G., Bloch W., Brixius K. (2011) Influence of glycemic status and physical fitness on oxidative stress and the peroxiredoxin system in the erythrocytes of non-insulin-dependent type 2 diabetic men. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. **119**, 559–564. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1279712>
21. Yousefzade G., Nakhaee A. (2012) Insulin-induced hypoglycemia and stress oxidative state in healthy people. *Acta Diabetol.* **49**, 81–85. <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0311-z>
22. Pompeo G., Girasole M., Cricenti A., Boumis G., Belletti A., Amiconi S. (2010) Erythrocyte death *in vitro* induced by starvation in the absence of Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta*. **1798**, 1047–1055. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2010.02.002>
23. Nemkov T., Qadri S.M., Sheffield W.P., D'Alessandro A. (2020) Decoding the metabolic landscape of patho-

- physiological stress-induced cell death in anucleate red blood cells. *Blood Transfus.* **130**, 130–142. <https://doi.org/10.2450/2020.0256-19>
24. Van Cromvoirt A.M., Fenk S., Sadafi A., Melnikova E.V., Lagutkin D.A., Dey K., Petrushanko I.Yu., Hegemann I., Goede J.S., Bogdanova A. (2021) Donor age and red cell age contribute to the variance in lorrca indices in healthy donors for next generation ektacytometry: a pilot study. *Front. Physiol.* **12**, 639722. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.639722>
 25. Petrushanko I., Bogdanov N., Bulygina E., Grenacher B., Leinsoo T., Boldyrev A., Gassmann M., Bogdanova A. (2006) Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, 916–925. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00038.2005>
 26. Petrushanko I.Yu., Bogdanov N.B., Lapina N., Boldyrev A.A., Gassmann M., Bogdanova A.Yu. (2007) Oxygen-induced regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells. *J. Gen. Physiol.* **130**, 389–398. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709783>
 27. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Yu., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. (2013) Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic kasumi-1 cells. *Biochimie.* **95**, 1344–1349. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.02.016>
 28. Yamamoto A., Saito N., Yamauchi Y., Takeda M., Ueki S., Itoga M., Kojima K., Kayaba H. (2014) Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. *SLAS Technol.* **19**, 483–487. <https://doi.org/10.1177/2211068214532254>
 29. Slatinskaya O.V., Zaripov P.I., Brazhe N.A., Petrushanko I.Yu., Maksimov G.V. (2022) Changes in the conformation and distribution of hemoglobin in the erythrocyte upon inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Biophysics.* **67**, 726–733. <https://doi.org/10.1134/S0006350922050189>
 30. Makhro A., Huisjes R., Verhagen L.P., Mañú-Pereira M. del M., Llaudet-Planas E., Petkova-Kirova P., Wang J., Eichler H., Bogdanova A., van Wijk R. (2016) Red cell properties after different modes of blood transportation. *Front. Physiol.* **7**, 288. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00288>
 31. Fedorov D.A., Sidorenko S.V., Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Tverskoi A.M., Abramicheva P.A., Maksimov G.V., Orlov S.N., Lopina O.D., Klimanova E.A. (2021) Na⁺/K⁺ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl. *Heliyon.* **7**, e08088. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08088>
 32. Zhang R., Xiang Y., Ran Q., Deng X., Xiao Y., Xiang L., Li Z. (2014) Involvement of calcium, reactive oxygen species, and ATP in hexavalent chromium-induced damage in red blood cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **34**, 1780–1791. <https://doi.org/10.1159/000366378>
 33. Suh S., Kim J.H. (2015) Glycemic variability: how do we measure it and why is it important? *Diabetes Metab. J.* **39**, 273–282. <https://doi.org/10.4093/dmj.2015.39.4.273>
 34. Cryer P.E., Axelrod L., Grossman A.B., Heller S.R., Montori V.M., Seaquist E.R., Service F.J. (2009) Evaluation and management of adult hypoglycemic disorders: an endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 709–728. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1410>
 35. Szadkowska A., Czyżewska K., Pietrzak I., Mianowska B., Jarosz-Chobot P., Myśliwiec M. (2018) Hypoglycemia unawareness in patients with type 1 diabetes. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* **24**, 126–134. <https://doi.org/10.5114/pedim.2018.80994>
 36. Silbert R., Salcido-Montenegro A., Rodriguez-Gutierrez R., Katabi A., McCoy R.G. (2018) Hypoglycemia among patients with type 2 diabetes: epidemiology, risk factors, and prevention strategies. *Curr. Diab. Rep.* **18**, 53. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1018-0>
 37. Vega-Cano S., Cordero-Vázquez E., Mestre-Torres J. (2021) Hipoglucemia como forma de presentación de infiltración hipofisaria por un linfoma. *Med. Clínica.* **156**, 362–363. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.01.040>
 38. Wang J., Zhu C.-K., Yu J.-Q., Tan R., Yang P.-L. (2021) Hypoglycemia and mortality in sepsis patients: a systematic review and meta-analysis. *Heart Lung.* **50**, 933–940. <https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2021.07.017>
 39. Salehi M., Vella A., McLaughlin T., Patti M.-E. (2018) Hypoglycemia after gastric bypass surgery: current concepts and controversies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 2815–2826. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00528>
 40. Amiel S.A. (2021) The consequences of hypoglycaemia. *Diabetologia.* **64**, 963–970. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05366-3>
 41. Papachristoforou E., Lambadiari V., Maratou E., Makrilakis K. (2020) Association of glycemic indices (hyperglycemia, glucose variability, and hypoglycemia) with oxidative stress and diabetic complications. *J. Diabetes Res.* 2020, 7489795. <https://doi.org/10.1155/2020/7489795>
 42. Rogers T.B., Lokuta A.J. (1994) Angiotensin II signal transduction pathways in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc. Med.* **4**, 110–116. [https://doi.org/10.1016/1050-1738\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/1050-1738(94)90062-0)
 43. Kosower N.S., Zipser Y., Faltin Z. (1982) Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells. relationship to cellular glutathione. *Biochim. Biophys. Acta.* **691**, 345–352. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90424-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90424-2)
 44. Craescu C.T., Poyart C., Schaefferl C., Garel M.-C., Kisterp J., Beuzard Y. (1986) Covalent binding of glutathione to hemoglobin. II. Functional consequences and structural changes reflected in NMR spectra. *J. Biol. Chem.* **261**, 14710–14716.
 45. Metere A., Iorio E., Scorza G., Camerini S., Casella M., Crescenzi M., Minetti M., Pietraforte D. (2014) Carbon monoxide signaling in human red blood cells: evidence for pentose phosphate pathway activation and protein deglutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 403–416. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5102>
 46. Colombo G., Dalle-Donne I., Giustarini D., Gagliano N., Portinaro N., Colombo R., Rossi R., Milzani A. (2010) Cellular redox potential and hemoglobin S-glutathio-

- nylation in human and rat erythrocytes: a comparative study. *Blood Cells. Mol. Dis.* **44**, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.11.005>
47. Perutz M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin: haem–haem interaction and the problem of allostery. *Nature*. **228**, 726–734. <https://doi.org/10.1038/228726a0>
 48. Rubino F.M. (2021) The redox potential of the β -93-cysteine thiol group in human hemoglobin estimated from *in vitro* oxidant challenge experiments. *Molecules*. **26**, 2528. <https://doi.org/10.3390/molecules26092528>
 49. Fenk S., Melnikova E.V., Anashkina A.A., Poluektov Y.M., Zaripov P.I., Mitkevich V.A., Tkachev Y.V., Kaestner L., Minetti G., Mairbäurl H. (2022) Hemoglobin is an oxygen-dependent glutathione buffer adapting the intracellular reduced glutathione levels to oxygen availability. *Redox Biol.* **58**, 102535. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102535>
 50. Chen H.-J.C., Lin W.-P., Chiu S.-D., Fan C.-H. (2014) Multistage mass spectrometric analysis of human hemoglobin glutathionylation: correlation with cigarette smoking. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 864–872. <https://doi.org/10.1021/tx5000359>
 51. Collins J.-A., Rudenski A., Gibson J., Howard L., O'Driscoll R. (2015) Relating oxygen partial pressure, saturation and content: the haemoglobin–oxygen dissociation curve. *Breathe* (Sheff). **11**, 194–201. <https://doi.org/10.1183/20734735.001415>
 52. Ghezzi P. (2013) Protein glutathionylation in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*. **1830**, 3165–3172. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.009>
 53. Radosinska J., Vrbjar N. (2021) Erythrocyte deformability and Na,K-ATPase activity in various pathophysiological situations and their protection by selected nutritional antioxidants in humans. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11924. <https://doi.org/10.3390/ijms222111924>

Metabolic Stress of Red Blood Cells Induces Hemoglobin Glutathionylation

P. I. Zaripov^{1, 2}, Iu. D. Kuleshova¹, Yu. M. Poluektov^{1, 3}, S. V. Sidorenko², O. K. Kvan³, G. V. Maksimov², V. A. Mitkevich¹, A. A. Makarov¹, and I. Yu. Petrushanko^{1, *}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125047 Russia

*e-mail: irina-pva@mail.ru

Metabolic stress caused by a lack of glucose significantly affects the state of red blood cells, where glycolysis is the main pathway for the production of ATP. Hypoglycemia can be both physiological (occurring during fasting and heavy physical exertion) and pathological (accompanying a number of diseases, such as diabetes mellitus). In this study, we have characterized the state of isolated erythrocytes under metabolic stress caused by the absence of glucose. It was established that 24 h of incubation of the erythrocytes in a glucose-free medium simulating blood plasma led to a twofold decrease in the ATP level into them. Besides, the cell sizes as well as intracellular sodium concentration were increased. These findings could be the result of a disruption in ion transporters' functioning because of a decrease in the ATP level. The calcium level remained unchanged. With a lack of glucose in the medium of isolated erythrocytes, there was no increase in ROS and significant change in the level of nitric oxide, while the level of the main low-molecular weight thiol of cells, glutathione (GSH), decreased by almost 2 times. It was found that the metabolic stress of isolated red blood cells induced hemoglobin glutathionylation despite the absence of ROS growth. The reason was the lack of ATP, which led to a decrease in the level of GSH because of the inhibition of its synthesis and probably, by decrease in the NADPH level required for glutathione (GSSG) reduction and protein deglutathionylation. Thus, erythrocyte metabolic stress induced hemoglobin glutathionylation, which is not associated with an increase in ROS. This may have an important physiological significance, since glutathionylation of hemoglobin changes its affinity for oxygen.

Keywords: red blood cells, metabolic stress, hemoglobin glutathionylation, erythrocyte redox status, glutathione