

Том 89, Номер 5

ISSN 0320-9725

Май 2024



БИОХИМИЯ



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 5, 2024

Молекулярные механизмы иммунитета (специальный выпуск)

Приглашённый редактор академик С.А. Недоспасов

CAR за пределами классических CAR-T: особенности функционирования и перспективы использования (обзор)	
<i>Е.П. Минина, Д.В. Дианов, С.А. Шитиков, А.В. Боголюбова</i>	733
Пептидные блокаторы индуцированных взаимодействий сигнальных белков: текущее состояние и перспективы развития (обзор)	
<i>В.Ю. Тоцаков</i>	755
Нарушения толерантности иммунной системы в отношении аутологичных ИПСК и их дифференцированных производных (обзор)	
<i>М.Е. Богомякова, А.Н. Богомазова, М.А. Лагарькова</i>	772
Взаимосвязь метаболических изменений и функций макрофагов в гомеостазе и при воспалении (обзор)	
<i>Т.Р. Юракова, Е.А. Горшкова, М.А. Носенко, М.С. Друцкая</i>	794
Сенесцентные макрофаги, ассоциированные с опухолью, их маркеры и роль в микроокружении опухоли (обзор)	
<i>Т.В. Пухальская, Т.Р. Юракова, Д.А. Богданова, О.Н. Демидов</i>	818
Обратная генетика в приложении к иммунобиологии фактора некроза опухолей – многофункционального цитокина (мини-обзор)	
<i>С.А. Недоспасов, А.А. Круглов, А.В. Туманов, М.С. Друцкая, И.В. Астраханцева, Д.В. Купраш</i>	833
Антигенное картирование SARS-CoV-2 (обзор)	
<i>Е.А. Астахова, А.А. Морозов, Ю.Д. Вавилова, А.В. Филатов</i>	843
Особенности гуморального и клеточного иммунного ответа на S- и N-белки вируса SARS-CoV-2	
<i>З.Э. Афридонова, А.П. Топтыгина, И.С. Михайлов</i>	854
Молекулярные изменения иммунологических характеристик мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга при лимфоидной неоплазии	
<i>Н.А. Петинати, А.В. Садовская, Н.В. Сац, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, Е.А. Фастова, А.У. Магомедова, А.Н. Васильева, О.А. Алешина, Г.П. Арапиди, В. Шендер, И.П. Смирнов, О.В. Побегуц, М.А. Лагарькова, Н.И. Дризе, Е.Н. Паровичникова</i>	866
Микроглия и дендритные клетки как источник IL-6 в мышинной модели рассеянного склероза	
<i>В.С. Гоголева, К.Т. Нгуен, М.С. Друцкая</i>	887

Ассоциированный с фосфатазой CD45 лимфоцитарный фосфопротеин LPAР регулирует её стабильность <i>Н.А. Круглова, Д.В. Мазуров, А.В. Филатов</i>	897
Количественный анализ фагоцитоза в цельной крови с применением двойного окрашивания и визуализации <i>Е.В. Лысакова, А.Н. Шумеев, С.А. Чувпило, В.С. Лактюшкин, Н.А. Арсентьева, М.Ю. Бобров, С.А. Рыбцов</i>	908
Удлинение линкерных последовательностей между антиген-узнающими модулями обеспечивает более эффективную наработку биспецифичных наноантител в периплазме <i>E. coli</i> <i>С.В. Тиллиб, О.С. Горяйнова</i>	920
Оценка антифибротических свойств вертепорфина в составе коллагенового носителя <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> <i>О.С. Роговая, Д.С. Аболин, О.Л. Черкашина, А.Д. Смыслов, Е.А. Воротеляк, Е.П. Калабушева</i>	929

РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

Рациональная разработка лекарств, направленных на рецепторы, сопряженные с G-белком: поиск и скрининг лигандов (обзор) <i>А.П. Лугинина, А.Н. Хныкин, П.А. Хорн, О.В. Моисеева, Н.А. Сафронова, В.А. Поспелов, Д.Е. Дашевский, А.С. Белоусов, В.И. Борщевский, А.В. Мишин</i>	945
--	-----

CONTENTS

Vol. 89, Issue 5, 2024

Molecular Mechanisms of Immunity (Special Issue)

Guest Editor Sergey A. Nedospasov

CAR Beyond the Classical CAR-T: Functional Features and Application Prospects (Review) <i>E. P. Minina, D. V. Dianov, S. A. Sheetikov, and A. V. Bogolyubova</i>	733
Peptide Inhibitors of the Induced Signaling Protein Interactions: The Current State and Perspectives (Review) <i>V. Y. Toshchakov</i>	755
Dysregulation of Immune Tolerance to Autologous iPSCs and Their Differentiated Derivatives (Review) <i>M. E. Bogomiakova, A. N. Bogomazova, and M. A. Lagarkova</i>	772
Metabolic Changes and Functional Activity of Macrophages in Homeostasis and in Inflammation (Review) <i>T. R. Yurakova, E. A. Gorshkova, M. A. Nosenko, and M. S. Drutskaya</i>	794
Tumor-Associated Senescent Macrophages, Their Markers and Their Role in the Tumor Microenvironment (Review) <i>T. V. Pukhalskaia, T. R. Yrakova, D. A. Bogdanova, and O. N. Demidov</i>	818
Reverse Genetics Applied to Immunobiology of Tumor Necrosis Factor, a Multifunctional Cytokine (Mini-Review) <i>S. A. Nedospasov, A. A. Kruglov, A. V. Tumanov, M. S. Drutskaya, I. V. Astrakhantseva, and D. V. Kuprash</i>	833
Antigenic Cartography of SARS-CoV-2 (Review) <i>E. A. Astakhova, A. A. Morozov, J. D. Vavilova, and A. V. Filatov</i>	843
Features of the Humoral and Cellular Immune Response to S- and N-Proteins of the SARS-CoV-2 VIRUS <i>Z. E. Afridonova, A. P. Toptygina, and I. S. Mikhaylov</i>	854
Molecular Changes in Immunological Characteristics of Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Lymphoid Neoplasia <i>N. A. Petinati, A. V. Sadovskaya, N. V. Sats, N. M. Kapranov, Yu. O. Davydova, E. A. Fastova, A. U. Magomedova, A. N. Vasilyeva, O. A. Aleshina, G. P. Arapidi, V. O. Shender, I. P. Smirnov, O. V. Pobeguts, M. A. Lagarkova, N. I. Drize, and E. N. Parovichnikova</i>	866
Microglia and Dendritic Cells as a Source of IL-6 in a Mouse Model of Multiple Sclerosis <i>V. S. Gogoleva, Q. Chi Nguyen, and M. S. Drutskaya</i>	887

Lymphocyte Phosphatase-Associated Phosphoprotein (LPAP) as CD45 Protein Stability Regulator <i>N. A. Kruglova, D. V. Mazurov, and A. V. Filatov</i>	897
Quantitative Analysis of Phagocytosis in Whole Blood Using Double Staining and Visualization <i>E. V. Lysakova, A. N. Shumeev, S. A. Chuvpilo, V. S. Laktyushkin, N. A. Arsentieva, M. Yu. Bobrov, and S. A. Rybtsov</i>	908
Extending Linker Sequences Between Antigen-Recognition Modules Provides More Effective Production of Bispecific Nanoantibodies in the Periplasma of <i>E. coli</i> <i>S. V. Tillib and O. S. Goryainova</i>	920
<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> Evaluation of Antifibrotic Properties of Verteporfin as a Composition of a Collagen Scaffold <i>O. S. Rogovaya, D. S. Abolin, O. L. Cherkashina, A. D. Smyslov, E. A. Vorotelyak, and E. P. Kalabusheva</i>	929

REGULAR ARTICLES

Rational Drug Design Targeting G-Protein-Coupled Receptors: Ligand Search and Screening (Review) <i>A. P. Luginina, A. N. Khnykin, P. A. Khorn, O. V. Moiseeva, N. A. Safronova, V. A. Pospelov, D. E. Dashevskii, A. S. Belousov, V. I. Borshchevskiy, and A. V. Mishin</i>	945
---	-----

CAR ЗА ПРЕДЕЛАМИ КЛАССИЧЕСКИХ CAR-T: ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Обзор

© 2024 Е.П. Минина, Д.В. Дианов, С.А. Шитиков, А.В. Боголюбова*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России,
125167 Москва, Россия; электронная почта: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

Поступила в редакцию 14.08.2023

После доработки 23.11.2023

Принята к публикации 02.12.2023

Химерный антигенный рецептор (CAR) представляет собой генно-инженерный рецептор, распознающий антиген и вследствие этого запускающий сигнальный каскад в клетке. В распознавании и проведении сигнала участвуют домены CAR, происходящие от разных белков, поэтому CAR имеют смешанный доменный состав. Т-Клетки, несущие CAR к опухолеассоциированным антигенам, легли в основу CAR-T-терапии – нового подхода к терапии злокачественных новообразований. Несмотря на то что CAR-T-терапия показала высокую эффективность в лечении онкогематологических заболеваний, этот подход имеет ряд недостатков, которые, потенциально, могут быть устранены при использовании в качестве эффекторных клеток других типов лейкоцитов. На данный момент экспрессия CAR, приводящая к появлению или усилению цитотоксических свойств, показана для широкого спектра клеток как адаптивного, так и врожденного иммунитета. В этом обзоре будут рассмотрены особенности функционирования CAR в разных типах клеток иммунной системы. Особое внимание будет уделено результатам доклинических и клинических исследований эффективности и безопасности потенциальных CAR-клеточных продуктов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: химерный антигенный рецептор, иммунотерапия, клеточная терапия, CAR, CAR-T, CAR-NK.

DOI: 10.31857/S0320972524050019 EDN: YPHDBX

ВВЕДЕНИЕ

Химерный рецептор, состоящий из варибельного иммуноглобулинового домена и константных участков Т-клеточного рецептора (ТКР), был впервые создан в 1987 г. [1]. В этом исследовании химерный рецептор, распознающий бактериальный антиген фосфорилхолин, был экспрессирован на Т-лимфобластных клетках линии EL4. Первые Т-лимфоциты, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR),

были получены в 1993 г. [2]. CAR, созданный в этом исследовании, распознает 2,4,6-тринитрофенол и относится к числу рецепторов первого поколения. Он состоит из внеклеточного антигенраспознающего одноцепочечного варибельного фрагмента scFv (single-chain variable fragment), который соединен трансмембранным участком с внутриклеточным сигнальным доменом CD3ζ, входящим в состав эндогенного ТКР [3]. CAR-T-клетки, экспрессирующие рецептор первого поколения, оказались недостаточно эффективными в уничтожении

Принятые сокращения: РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»; СВИ – синдром выброса цитокинов; ТКР – Т-клеточный рецептор; CAR – химерный антигенный рецептор; CAR-M – макрофаги, экспрессирующие CAR; CBSCR – химерные В-клеточные рецепторы; CIK – цитокин-индуцированные киллеры; DC – дендритные клетки; DN Т-клетки – двойные негативные Т-клетки; iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; FDA – Управление по надзору за продуктами и лекарствами; GD2 – дисialogанглиозид; MAIT – ассоциированные со слизистыми инвариантные Т-клетки; MHC – главный комплекс гистосовместимости; NK – естественные киллеры; NKT-клетки – естественные киллерные Т-клетки; iNKT – инвариантные NKT-клетки; NSCAR – несигнализирующий CAR; Treg – Т-регуляторные клетки.

* Адресат для корреспонденции.

злокачественных клеток, так как, несмотря на выраженные цитотоксические свойства, быстро переходили в истощенное состояние [4]. В 2002 г. были получены CAR второго поколения, в которых между сигнальным и трансмембранным доменом находился костимуляторный домен CD28 [5]. CAR-T-клетки второго поколения, направленные против антигена CD19, показали свою эффективность в распознавании и элиминации В-клеточных опухолей в мышинной модели [6]. С тех пор активно ведутся разработки CAR-T-лимфоцитов, направленных на различные опухолеассоциированные антигены.

Особенно эффективно подход CAR-T показал себя в терапии онкогематологических заболеваний. По состоянию на 2023 г., Управление по надзору за продуктами и лекарствами (Food and Drug Administration, FDA) одобрило шесть CAR-T-клеточных терапевтических препаратов, направленных на лечение В-клеточных неоплазий [7]. На дан-

ный момент продукты CAR-T, успешно прошедшие клинические испытания и одобренные FDA, основаны на CAR второго поколения, содержащих в качестве костимуляторных доменов сигнальные домены CD28 или 4-1BB. Тем не менее на стадии клинических исследований и разработок находятся различные варианты CAR-T-терапии, химерный рецептор в которых состоит из различных иммуномодулирующих доменов. В частности, созданы рецепторы CAR третьего поколения, содержащие два костимуляторных домена, однако их применение в клинике ограничено выраженными побочными эффектами. В случае химерных рецепторов четвертого поколения CAR-T-клетки, помимо CAR, экспрессируют цитокины, которые увеличивают персистенцию CAR-T-клеток в опухолевом микроокружении [8].

Несмотря на значительные успехи CAR-T-терапии в лечении онкогематологических заболеваний, у этого подхода есть ряд недостатков.

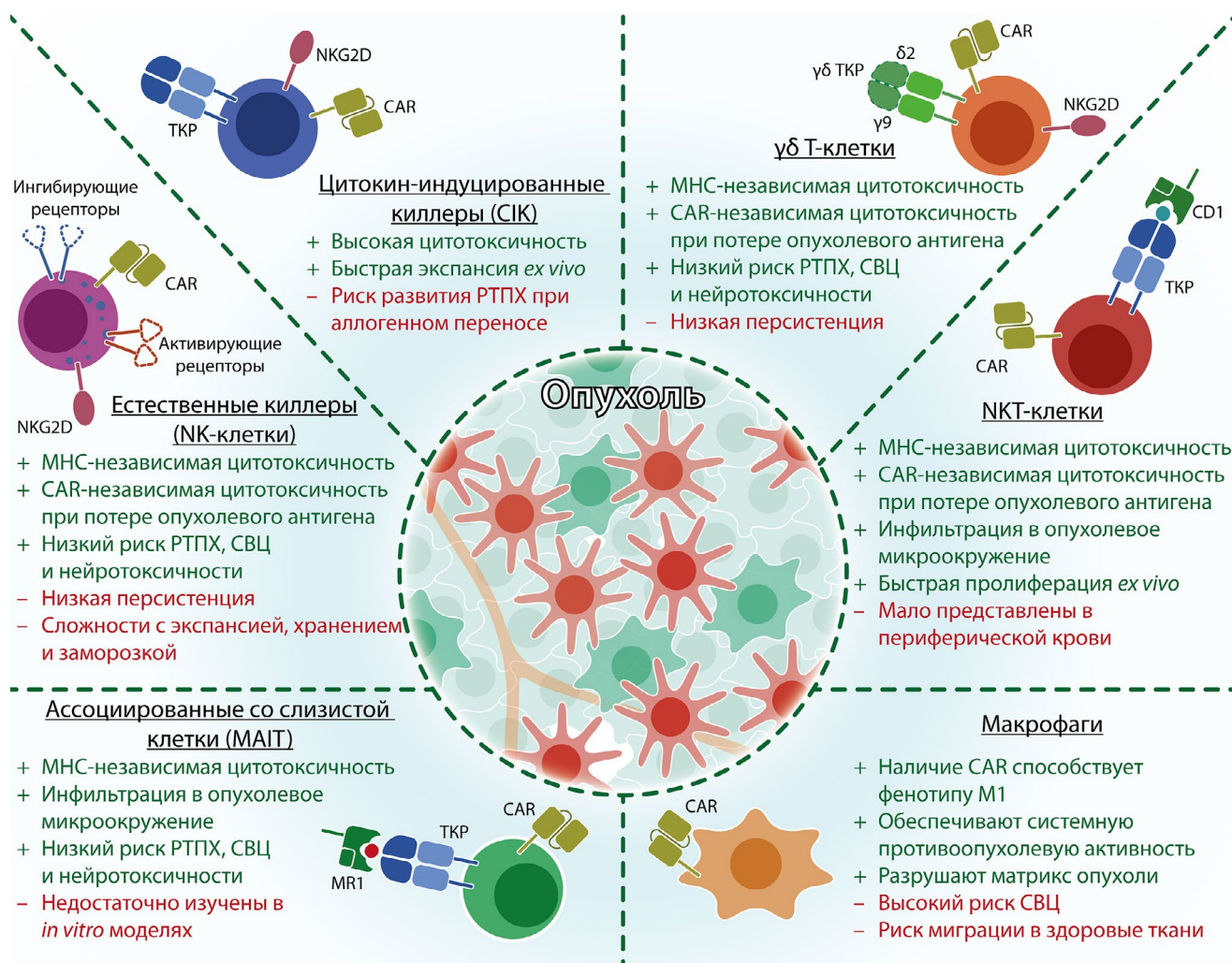


Рис. 1. Преимущества и недостатки использования различных типов клеток при создании клеточных продуктов, несущих CAR. ТКР – Т-клеточный рецептор; CAR – химерный антигенный рецептор; NKG2D – активирующий рецептор; MR1 – неканонический главный комплекс гистосовместимости, близкий к I классу; CD1 – неканонический главный комплекс гистосовместимости, близкий к I классу

Терапия становится неэффективной при утрате злокачественными клетками опухолевого антигена, на который были нацелены химерные рецепторы [8]. Кроме того, в случае солидных опухолей CAR-T-клетки зачастую не могут инфильтрировать опухоль и распознать антиген. Более того, на цитотоксическую функцию CAR-T-клеток значительно влияет иммуносупрессивное опухолевое микроокружение, поэтому в настоящее время прогресс в терапии солидных опухолей с помощью подхода CAR-T ограничен [9]. Наконец, выделение провоспалительных цитокинов активированными CAR-T-клетками может приводить к тяжелым побочным эффектам, таким как синдром выброса цитокинов (СВЦ) и нейротоксичность [10]. В целом, и СВЦ, и нейротоксичность обусловлены быстрой активацией и пролиферацией Т-клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины. Как правило, подобный ответ развивается в течение недели после введения CAR-T-клеток. Предполагается, что чрезмерное выделение провоспалительных цитокинов повышает проницаемость капилляров в головном мозге, что может привести к тяжелым неврологическим симптомам и даже смерти. Тем не менее молекулярные механизмы нейротоксичности, развивающейся в результате CAR-T-терапии, окончательно не выяснены [10]. Нередко тяжелые побочные эффекты CAR-T-терапии обусловлены недостаточной регуляцией активности CAR-T-клеток, которые иногда могут активироваться даже при отсутствии антигенного стимула [11].

Для преодоления указанных трудностей ведется разработка новых стратегий для создания CAR-T-клеток [12, 13]. Кроме того, активно исследуется возможность применения других, отличных от Т-клеток, лейкоцитов в роли клеток, несущих CAR (рис. 1). На сегодняшний день клетки, экспрессирующие CAR, были получены из $\gamma\delta$ Т-клеток, регуляторных Т-клеток, ассоциированных со слизистыми инвариантных Т-клеток (MAIT), двойных негативных (DN) Т-клеток, естественных киллеров (NK), естественных киллерных Т-клеток (NKT-клеток), цитокин-индуцированных киллеров (CIK), макрофагов, дендритных клеток (DC) и даже В-лимфоцитов.

Доклинические исследования показали, что у многих альтернативных иммунных CAR-клеток при высокой противоопухолевой активности многие недостатки CAR-T выражены в меньшей степени либо полностью отсутствуют. Тем не менее на текущий момент такие CAR-клетки недостаточно изучены: лишь для нескольких препаратов такого рода запущены клинические испытания, находящиеся на I/II фазах, или доступны данные доклинических исследований, остальные варианты терапии находятся на стадии разработки. В этом обзоре будут подробно освещены особен-

ности функционирования CAR в разных группах иммунных клеток, а также результаты имеющихся доклинических и клинических исследований.

CAR В ИММУННЫХ КЛЕТКАХ РАЗНЫХ ТИПОВ

Ниже будут рассмотрены особенности разных типов иммунных клеток, которые могут быть использованы в разработке новых подходов CAR-опосредованной иммунотерапии. Также будут освещены актуальные результаты доклинических и, при наличии, клинических исследований по экспрессии и эффективности CAR в разных типах иммунных клеток.

Естественные киллеры или NK-клетки (от natural killers) относятся к числу клеток врожденного иммунитета лимфоидного ряда. На долю NK-клеток приходится около 10% лимфоцитов периферической крови [14]. В отличие от Т-лимфоцитов, они распознают злокачественные и инфицированные клетки организма с помощью множества неполиморфных активирующих и ингибирующих рецепторов, и направленность ответа NK-клетки в каждом случае – это результат баланса сигналов. Если по совокупности сигналы от активирующих рецепторов перевешивают таковые от ингибирующих рецепторов, то NK-клетка лизует клетку-мишень. NK-Клетки экспрессируют на своей поверхности множество активирующих и ингибирующих рецепторов, важнейшими среди которых являются рецепторы, распознающие главный комплекс гистосовместимости (main histocompatibility complex) МНС I и МНС I-подобные молекулы. Те клетки организма, которые экспонируют эти молекулы, воспринимаются NK-клетками как здоровые [15]. Отметим, что эритроциты не несут на своей поверхности ни активирующих, ни ингибирующих лигандов для рецепторов NK-клеток, и потому не распознаются ими как мишень. Помимо МНС, NK-клетки могут узнавать и другие лиганды на поверхности клеток, в частности, маркеры стресса MICA, MICB и UL16BP1 благодаря специальным рецепторам, к числу которых относится, например, рецептор NKG2D, присутствующий также на поверхности $\gamma\delta$ Т-клеток [16]. Кроме того, благодаря экспрессии Fc γ RIIIa NK-клетки могут распознавать и убивать клетки, опсонизированные антителами [17].

Цитотоксические функции NK-клеток реализуются благодаря формированию иммунологического синапса между NK-клеткой и клеткой-мишенью и последующей секреции литических гранул с гранзимом. Кроме литических гранул, NK-клетка может убивать клетку-мишень с помощью FasL и TRAIL, запуская ее программируемую гибель.

Наконец, активированные NK-клетки выделяют ряд провоспалительных цитокинов, в частности интерферона γ (IFN γ) и фактора некроза опухолей (TNF) [14].

Выраженные цитотоксические свойства, а также отсутствие, в отличие от Т-клеток, необходимости в представлении антигенов в контексте МНС для распознавания клеток-мишеней способствовали развитию противораковой терапии, основанной на генетически модифицированных NK-клетках, в том числе экспрессирующих CAR. В большинстве имеющихся исследований NK-клетки были трансдуцированы конструктами CAR, изначально разработанными для CAR-T-терапии. Помимо костимуляторных доменов CD28 и 4-1BB, некоторые из экспрессируемых в NK-клетках CAR содержат костимуляторный домен 2B4 (рис. 2). Исходно рецептор 2B4 относится к числу активирующих рецепторов NK-клеток семейства SLAM (signaling lymphocytic activation molecule). Важно отметить, что конструкты CAR, изначально созданные для экспрессии в Т-клетках, функционируют в NK-клетках благодаря общности сигнальных путей, контролирующей активацию клеток обеих групп. В частности, передача сигнала от некоторых активирующих рецепторов NK-клеток происходит при участии CD3 ζ – сигнального домена CAR, предназначенных для Т-клеток [18]. Отмечено, что NK-клетки, трансдуцированные CAR второго поколения с 2B4, направленным против CD5, отличаются от NK-клеток с CAR, содержащим CD28, повышенной цитотоксической активностью в отношении злокачественных клеток, быстрой пролиферацией и усиленной продукцией цитокинов [19]. Кроме

того, в роли сигнального домена в составе CAR для NK-клеток, помимо домена CD3 ζ , используют домены DAP10 и DAP12. Эти домены задействованы в передаче сигнала от ряда активирующих рецепторов NK-клеток. Показано, что конструкты с доменом CD3 ζ превосходят таковые с DAP10 по силе индуцируемой противоопухолевой активности, но уступают конструктам с DAP12 [20, 21]. Cifaldi et al. [22] предложили использовать DNAM-1 в составе химерного рецептора, адаптированного под NK-клетки. DNAM-1 распознает лиганды PVR и нектин-2, присутствующие на инфицированных вирусами и многих злокачественных клетках. Рецепторы, включающие, помимо DNAM-1, домены 2B4 и CD3 ζ , дополнительно активируют NK-клетки.

Стоит подчеркнуть, что NK-клетки, трансдуцированные CAR, потенциально, могут проявлять цитотоксическую активность в отношении злокачественных клеток и CAR-независимым образом благодаря собственным активирующим рецепторам, а также способности к распознаванию клеток, опсонизированных антителами [20, 23]. Наличие CAR-независимой противоопухолевой активности может дополнительно усиливать эффективность CAR-NK-терапии. Более того, разнообразие активирующих рецепторов позволяет CAR-NK распознавать и уничтожать опухолевые клетки с измененным фенотипом, выжившие после продолжительного лечения [24]. Было показано, что под действием экзогенных IL-12 и IL-18 NK-клетки приобретают фенотип, подобный клеткам памяти. Такие клетки уже показали свою эффективность на первых этапах испытаний на пациентах с рецидивирующим или резистентным острым

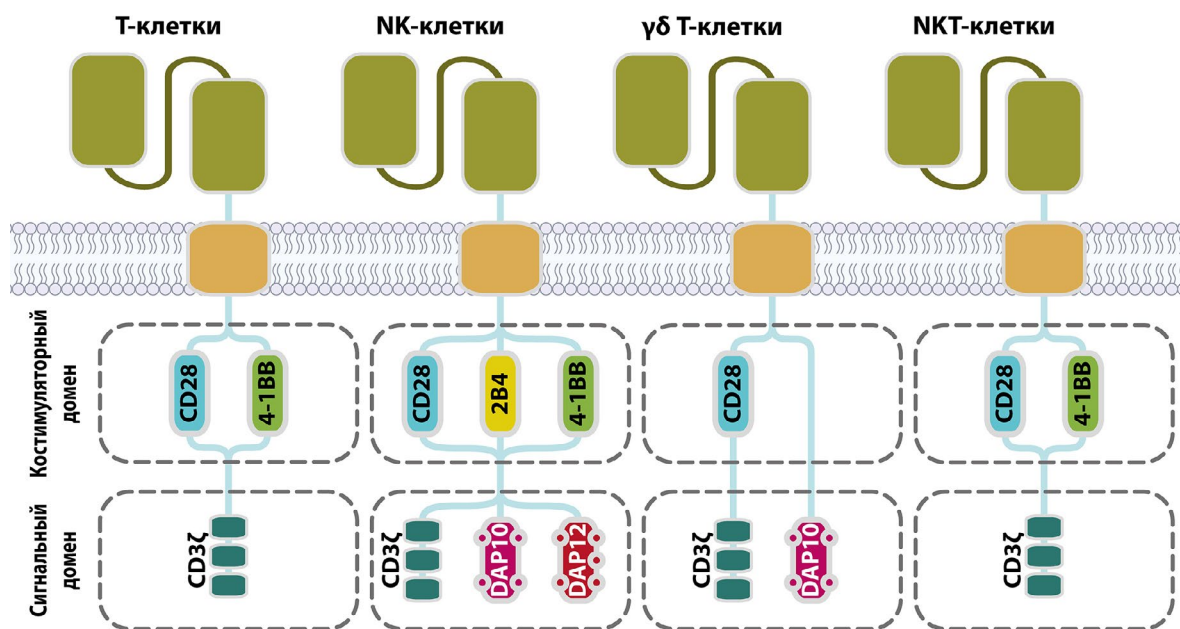


Рис. 2. Структура CAR, используемых при создании клеточного продукта из клеток различных типов. NK-Клетки – естественные киллеры, NKT-клетки – естественные киллерные Т-клетки

миелоидным лейкозом. Дополнительная экспрессия в них CAR, направленного против нуклеофозмина 1 (NPM1), увеличила эффективность терапии и снизила частоту побочных эффектов [25]. Повышенная чувствительность NK-клеток к активным формам кислорода, по сравнению с Т- и В-клетками, может быть устранена за счет экспрессии в них пероксиредоксина-1, что может улучшить персистенцию CAR-NK-клеток в закисленной среде солидных опухолей [26].

Доклинические и клинические исследования показали, что CAR-NK-клетки лишены многих недостатков CAR-T. Поскольку NK-клетки не несут варибельного Т-клеточного рецептора, их адаптивный перенос не приводит к развитию реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [27, 28]. Потенциально, это открывает дорогу к производству готовых («off the shelf») аллогенных клеточных препаратов, подходящих многим пациентам одновременно. Кроме того, перенос CAR-NK практически лишен риска СВИЦ или нейротоксичности [29, 30]. Наконец, в доклинических исследованиях CAR-NK показали себя эффективными не только в случае онкогематологических заболеваний, но и при терапии солидных опухолей [31]. Более того, на данный момент многие разработки CAR-NK-терапии, в том числе и против солидных опухолей, вышли из доклинических в клинические испытания.

В настоящее время зарегистрировано несколько десятков клинических испытаний, посвященных возможности использования CAR-NK-клеток, направленных к разным опухолевым антигенам,

как в виде самостоятельной терапии, так и в комбинации с другими терапевтическими подходами. Например, в одном исследовании испытуемые, наряду с CAR-NK против PD-L1, получают иммуностимулятор N-803, запускающий пролиферацию и активацию NK- и CD8⁺ Т-клеток, и пембролизумаб – моноклональное антитело, ингибирующее PD-1 (NCT04847466). Было показано, что NK-клетки, в которые с помощью электропорации были последовательно введены рецептор хемокина CXCR4 и CAR, направленный против ВСМА, эффективно уничтожают клетки множественной миеломы [32]. Все клинические испытания CAR-NK-терапии в настоящее время находятся на I/II фазах. В ряде зарегистрированных на данный момент испытаний исследуется CAR-NK-терапия онкогематологических заболеваний, таких как множественная миелома (мишень – ВСМА; NCT05008536), В-клеточные лимфомы (мишень – CD19; NCT05379647) и острый лимфобластный лейкоз (мишень – CD19; NCT05563545). Кроме того, ведутся клинические испытания эффективности и безопасности применения CAR-NK при различных солидных опухолях: раке яичников (мишень – клаудин 6; NCT05410717), толстой кишки (мишень – NKGD2L; NCT05213195), поджелудочной железы (мишень – ROBO1; NCT03941457), простаты (мишень – PSMA; NCT03692663) и других. Сведения о клинических испытаниях CAR-NK-клеток, направленных против разных мишеней, представлены в таблице. Успешное прохождение первой фазы в нескольких клинических испытаниях CAR-NK показало высокую

Некоторые зарегистрированные клинические испытания CAR-NK-клеток

Клиническое испытание	Год открытия	Фаза	Заболевание	Мишень
NCT02892695	2016	I/II	лимфомы и лейкозы	CD19
NCT03940833	2019	I/II	множественная миелома	BCMA
NCT02742727	2016	I/II	лимфомы и лейкозы	CD7
NCT02944162	2016	I/II	острый миелоидный лейкоз	CD33
NCT02839954	2016	I/II	солидные опухоли	MUCL
NCT03383978	2017	I	глиобластома	HER2
NCT03415100	2018	I	метастазирующие солидные опухоли	NKG2DL
NCT03941457	2019	I/II	рак поджелудочной железы	ROBO1
NCT03692663	2018	I	рак предстательной железы	PSMA
NCT05410717	2022	I/II	рак яичника	клаудин 6 (CLDN6)
NCT05194709	2021	I	развитые солидные опухоли	5T4
NCT05507593	2022	I	немелкоклеточный рак легкого	DLL3

безопасность этого вида терапии и практически полное отсутствие побочных эффектов [33].

Несмотря на многочисленные достоинства, в данный момент есть некоторые ограничения в использовании терапии CAR-NK. CAR-NK-клетки характеризуются низким уровнем персистенции после адоптивного переноса: если срок жизни CAR-T-клеток в организме пациента может составлять до 10 лет [34], то у CAR-NK-клеток он не превышает нескольких недель [35]. Кроме того, CAR-NK-клетки с трудом поддаются экспансии *ex vivo*, плохо переносят замораживание и хранение [36]. Тем не менее можно надеяться, что указанные сложности технического характера будут преодолены. В частности, было показано, что персистенция CAR-NK-клеток может быть увеличена вдвое за счет нокаута гена *CISH*, кодирующего белок CIS – негативный регулятор сигналинга IL-15. При отсутствии CIS в CAR-NK-клетках активируется секреция IL-15, и поскольку CAR-NK-клетки сами несут на своей поверхности рецепторы IL-15, это способствует аутокринному усилению сигнального пути IL-15. Высокая активность IL-15-опосредованного сигналинга, в свою очередь, способствует экспансии CAR-NK-клеток *ex vivo*, увеличивает персистенцию и повышает противоопухолевые свойства [37]. Вставка в конструктор CAR IL-15, кроме того, может повысить метаболический статус и активировать эффекторные функции CAR-NK-клеток, ослабленных взаимодействием с метаболически активными опухолями [38].

Еще одним фактором, способным снизить эффективность CAR-NK-терапии, является захват терапевтическими CAR-NK-клетками опухолевых антигенов по механизму трогоцитоза. Вследствие захвата опухолевого антигена CAR-NK-клетки сами становятся мишенью терапии и уничтожаются другими NK-клетками по пути фратрицида, а количество опухолевых антигенов на целевых злокачественных клетках падает. Снижению риска фратрицида среди CAR-NK-клеток способствует одновременная экспрессия в них активирующего CAR, направленного против опухолевого антигена, и ингибирующего CAR, распознающего специфичные для NK-клеток антигены [39].

γδ Т-клетки. Примерно 3,7% циркулирующих в кровотоке Т-клеток несут на поверхности ТКР, образованный γ- и δ-цепями [40, 41]. Такие «неклассические» (в противовес «классическим» αβ Т-клеткам) γδ Т-клетки значительно отличаются от αβ Т-клеток, несущих ТКР из цепей α и β и составляющих преобладающую популяцию Т-клеток кровотока. Так, распознавание антигенов αβ Т-клетками возможно, только если антиген представлен в контексте МНС. γδ Т-клетки не требуют участия классических молекул МНС в распознавании антигенов, и это обстоятельство зна-

чительно расширяет возможности для переноса γδ Т-клеток между разными организмами и существенно снижает вероятность развития осложнений, таких как РТПХ. Относительно безопасный адоптивный перенос γδ Т-клеток возможен еще и потому, что репертуары γ- и δ-цепей значительно менее разнообразны в популяции по сравнению с репертуарами цепей α и β. γδ Т-клетки, как правило, распознают общие для разных людей молекулярные сигнатуры, свидетельствующие о развитии инфекционного процесса или появлении злокачественных клеток, поэтому их нередко сближают с клетками врожденного иммунитета. На клетки врожденного иммунитета γδ Т-клетки похожи экспрессией Toll-подобных рецепторов и рецепторов, близких к активирующим рецепторам NK-клеток, в частности, уже упоминавшегося NKG2D [42]. Однако γδ Т-клетки способны и к формированию иммунологической памяти, что заставляет причислять их к компонентам адаптивного иммунитета [43]. Отмечается, γδ Т-клетки могут дифференцироваться в Th-подобные клетки и продуцировать широкий спектр цитокинов [44].

Большинство γδ Т-клеток крови относится к числу Vγ9Vδ2 Т-клеток. В состав ТКР этих клеток входят сегменты Vγ9 и Vδ2, относящиеся к цепям γ и δ соответственно. Vγ9Vδ2 Т-клетки распознают фосфоантигены, поэтому для экспансии Vγ9Vδ2 Т-клеток *ex vivo* используют их синтетические аналоги, такие как золедроновая кислота [45]. γδ Т-клетки, имеющие сегмент Vδ1 в составе ТКР, локализованы преимущественно в слизистых оболочках [23].

Роль γδ Т-клеток в обеспечении противоопухолевой защиты впервые была показана у мышей, лишенных γδ Т-клеток. Под воздействием химических мутагенов у таких мышей наблюдается раннее развитие плоскоклеточного рака кожи [46]. Впоследствии важная роль γδ Т-клеток в работе противоопухолевого иммунитета была продемонстрирована на разных моделях опухолевого роста. В частности, было показано, что уровень инфильтрации злокачественных опухолей γδ Т-клетками коррелирует с хорошим прогнозом в случае многих видов рака, например меланомы [47] и рака желудка [48]. Считается, что активность γδ Т-клеток в отношении злокачественных клеток обеспечивается их цитотоксическими свойствами, а также продукцией IFNγ и TNF [33]. Цитотоксичность γδ Т-клеток обусловлена действием перфорина и гранзимов, кроме того, клетки способны к антителозависимой клеточной цитотоксичности. Противоопухолевая активность присуща как Vγ9Vδ2, так и Vδ1 Т-клеткам [45, 48, 49].

Стоит отметить, что γδ Т-клетки не во всех случаях оказывают противоопухолевое действие: они могут проявлять и проопухолевые свойства.

Как правило, проопухолевое действие $\gamma\delta$ Т-клеток обусловлено продукцией ими интерлейкина 17 (IL-17) и ряда других цитокинов. Например, при раке поджелудочной железы $\gamma\delta$ Т-клетки могут подавлять активность $\alpha\beta$ Т-клеток, выделяя IL-10 и IL-17 и способствуя повышению уровня экспрессии PD-L1 в клетках опухоли [50].

Выраженная собственная противоопухолевая активность вкупе с высокой безопасностью адоптивного переноса делает $\gamma\delta$ Т-клетки перспективным инструментом в иммунотерапии онкологических заболеваний. Перенос пациенту немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток после экспансии *ex vivo* оказался безопасным, но неэффективным [45], поэтому в последнее время активно исследуется возможность усиления противоопухолевой активности $\gamma\delta$ Т-клеток посредством экспрессии в них CAR. Показано, что CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки, направленные против CD19, эффективно распознают и уничтожают малигнизированные клетки, в том числе утратившие CD19, причем цитотоксические свойства CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток усиливаются после их обработки золедроновой кислотой [51, 52]. Способность CAR- $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов убивать злокачественные клетки крови, утратившие антиген, обусловлена высокой неспецифической цитотоксичностью $\gamma\delta$ Т-клеток по отношению к клеткам лейкоза, которая дополнительно усиливается под действием золедроновой кислоты в ходе экспансии CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток *ex vivo*. Сохранение цитотоксических свойств в отношении злокачественных клеток крови, потерявших антиген, дает CAR- $\gamma\delta$ Т-клеткам важное преимущество [52].

CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть эффективны и против солидных опухолей. Так, продемонстрировано, что CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки, направленные на антиген нейробластомы дисиаialogанглиозид (GD2), не только лизируют злокачественные клетки, но и презентруют антигены $\alpha\beta$ Т-клеткам, активируя их в условиях *in vitro*. Возможно, CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки могут эффективно представлять антигены и активировать $\alpha\beta$ Т-клетки *in vivo*, однако для прояснения этого вопроса необходимы дальнейшие эксперименты [23].

Большинство CAR, которые на данный момент удалось успешно экспрессировать в $\gamma\delta$ Т-клетках, относятся к числу рецепторов второго поколения и содержат домены CD28 и CD3 ζ в качестве костимуляторного и сигнального доменов соответственно [23] (рис. 2). В одном исследовании в $\gamma\delta$ Т-клетки была внесена генетическая конструкция CAR первого поколения, имеющего единственный внутриклеточный домен DAP10 и распознающего GD2 [53]. Отметим, что в $\gamma\delta$ Т-клетках экспрессируются такие костимулирующие молекулы, как CD28, CD27 и 4-1BB, которые способствуют активации этих клеток при передаче сигналов от CAR [54].

В ряде исследований в $\gamma\delta$ Т-клетках была создана система комбинаторного распознавания антигена, функционирующая как логические операторы. Например, Fisher et al. [53] получили CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки, у которых упомянутый DAP10-CAR распознает GD2, а $\gamma\delta$ -ТКР связывается с фосфоантигенами, которые экспрессируются злокачественными клетками и почти не экспрессируются нормальными клетками. Активация таких CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток достигается только при взаимодействии с клетками-мишенями, экспонирующими оба антигена, которые распознаются CAR и ТКР, что снижает вероятность уничтожения нецелевых клеток.

Fleischer et al. [53] получили $\gamma\delta$ Т-клетки, экспрессирующие несигнализирующий CAR (NSCAR), лишенный внутриклеточных активационных доменов, и потому не способный запускать цитотоксическую реакцию при распознавании антигена. $\gamma\delta$ Т-клетки, экспрессирующие NSCAR, могут с его помощью распознавать опухолевые антигены CD19 и CD5 и благодаря этому взаимодействию сближаться со злокачественными клетками в пространстве. Тем не менее для прямой противоопухолевой активности необходима эндогенная МНС-независимая цитотоксичность $\gamma\delta$ Т-клеток. Показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки, экспрессирующие NSCAR, отличаются более выраженной цитотоксичностью в отношении клеток В- и Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза соответственно по сравнению с $\gamma\delta$ Т-клетками, экспрессирующими CAR против тех же антигенов (CD19 и CD5). Примечательно, что в случае $\alpha\beta$ Т-клеток экспрессия NSCAR вместо CAR не привела к значимому усилению цитотоксических свойств, из чего можно сделать вывод, что молекулярные механизмы, которые лежат в основе увеличения противоопухолевой активности $\gamma\delta$ Т-клеток при экспрессии NSCAR, фундаментально отличаются от таковых у $\alpha\beta$ Т-клеток [55].

В настоящее время проходит несколько клинических испытаний, посвященных возможностям использования CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток в иммунотерапии онкологических заболеваний, а именно: острого миелоидного лейкоза (мишени – CD33, CD123; NCT03885076, NCT04796441), рецидивирующего или резистентного CD7⁺ Т-клеточного лейкоза (мишень – CD7; NCT04702841), различных В-клеточных онкогематологических заболеваний (мишени – CD20, CD19; NCT04735471, NCT02656147, NCT04911478), а также рецидивирующих или резистентных солидных опухолей различного генеза (мишень – NKG2DL; NCT04107142, NCT05302037). На данный момент все перечисленные клинические испытания находятся на I фазе, поэтому судить о клинической эффективности CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток пока преждевременно. Предполагается, что терапия на основе CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток будет иметь преимущество, по сравнению с традиционной

CAR-T-терапией, в плане пониженного риска развития таких побочных эффектов, как СВИЦ и нейротоксичность [49]. Стоит отметить, что исследования функционирования CAR- $\gamma\delta$ T-клеток *in vivo* показали, что эти клетки могут лишь недолго персистировать в организме [52], что может быть существенным ограничением их применения в клинике.

NKT-Клетки (от natural killer T cells), как и $\gamma\delta$ T-клетки, объединяют в себе свойства клеток адаптивного и врожденного иммунитета. NKT-Клетки составляют менее 1% от T-клеток крови [56] и экспрессируют $\alpha\beta$ ТКР, а также молекулы, характерные для NK-клеток, такие как CD16 (Fc γ R) и CD56 [57]. В отличие от T-лимфоцитов, NKT-клетки распознают антигены только в контексте CD1d – неклассической молекулы МНС, близкой к МНС I класса. NKT-Клетки принято подразделять на инвариантные NKT-клетки (iNKT), или NKT-клетки I типа, и NKT-клетки II типа. iNKT-Клетки характеризуются ограниченным репертуаром ТКР и распознают α -галактозилцерамид (α -GalCer), а NKT-клетки II типа отличаются более широким репертуаром ТКР и не распознают α -GalCer [58].

Отмечено, что у пациентов с различными злокачественными новообразованиями, в частности, онкогематологическими, зачастую снижается количество NKT-клеток в крови [59], а также нарушаются их функции, например продукция IFN γ [60]. Кроме того, повышенное количество NKT-клеток в периферической крови, как и инфильтрация NKT-клеток в опухоль, как правило, коррелируют с благоприятным прогнозом для пациента [61, 62]. Выраженным противоопухолевым эффектом обладают только iNKT, а NKT-клетки II типа могут даже подавлять иммунный ответ против злокачественных клеток. Цитотоксичность iNKT, опосредованная гранзимами или FasL, активируется в результате распознавания липидного антигена, связанного с CD1d [63]. Помимо прямого лизиса опухолевых клеток, iNKT-клетки могут модулировать активность других иммунных клеток (в частности, DC, NK-, В- и Т-клеток) посредством секреции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, таких как IFN γ , TNE, IL-4, IL-10 и IL-13 [64, 65]. Цитокины, выделяемые iNKT-клетками, могут также влиять на опухолевое микроокружение, непрямым образом воздействуя на противоопухолевый иммунный ответ [64]. Показано, что NKT-клетки с транзиторной экспрессией CAR продуцируют меньше IL-6, чем трансдуцированные CD8 $^{+}$ CAR-T-лимфоциты, и при этом сохраняют цитотоксическую активность. По этой причине предполагается, что риск развития СВИЦ при терапии CAR-NKT будет ниже, чем в случае CAR-T, но для прояснения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования [66].

Ряд свойств NKT-клеток делает их особенно привлекательными эффекторами CAR-терапии. Собственная противоопухолевая активность, включающая не только цитотоксические свойства, но и способность к перестройке опухолевого окружения, может дополнять CAR-опосредованное действие против злокачественных клеток. Поскольку NKT-клетки распознают антигены в контексте неполиморфного CD1d, их аллогенный адаптивный перенос не вызывает РТПХ, благодаря чему становится возможным создание аллогенных CAR-iNKT из клеток здоровых доноров [23]. Кроме того, NKT-клетки способны к быстрой пролиферации *ex vivo*, благодаря чему необходимое для создания клинического продукта количество клеток может быть получено сравнительно легко [56].

В первой работе, посвященной получению CAR-iNKT-клеток, в iNKT-клетках был экспрессирован CAR против антигена нейробластомы GD2 с сигнальными доменами 4-1BB и CD3 ζ (рис. 2). Было показано, что 4-1BB обеспечивает поляризацию CAR-iNKT в фенотип Th1, поэтому CAR-iNKT в условиях *in vivo* эффективно уничтожали клетки нейробластомы, при этом длительно персистируя в организме [67]. Впоследствии было показано, что экспрессия CD62L является маркером повышенной персистенции и противоопухолевой активности NKT-клеток, в том числе несущих CAR. Введение анти-CD19 CAR-NKT-клеток, экспрессирующих CD62L, мышам с В-клеточной лимфомой позволило добиться значительной регрессии заболевания [68]. Исследование эффективности CAR-NKT-клеток, распознающих антиген клеток меланомы хондроитинсульфатпротеогликан 4 (CSPG4), показало, что CAR-NKT уничтожают клетки меланомы *in vitro* не менее эффективно, чем CAR-T [69]. Недавно было объявлено о получении NKT-клеток, экспрессирующих CAR третьего поколения, направленный против глипикана-3 (антигена клеток гепатоцеллюлярной карциномы) и содержащий два костимуляторных домена – CD28 и 4-1BB [70].

Успехи в доклиническом применении CAR-NKT-клеток привели к запуску клинических испытаний CAR-NKT в терапии нейробластомы (мишень – GD2; NCT03294954, NCT02439788), а также рецидивирующей или резистентной В-клеточной лимфомы (мишень – CD19; NCT03774654) и других В-клеточных неоплазий (мишень – CD19; NCT05487651). Малое количество клинических испытаний CAR-NKT на данный момент, вероятно, связано с недостаточным объемом доклинических исследований. Также стоит отметить, что существенным ограничением для получения клинического продукта из CAR-NKT-клеток является малая численность NKT-клеток в периферической крови.

Регуляторные Т-клетки (regulatory T cells, Tregs) – специализированная подгруппа CD4⁺ Т-лимфоцитов, выполняющих иммуносупрессивную функцию. На долю регуляторных Т-клеток приходится от 5 до 10% CD4⁺ Т-клеток в кровотоке [71]. Ингибирующее действие регуляторных Т-клеток на эффекторные Т-клетки или антигенпрезентирующие клетки может быть прямым или косвенным. В первом случае регуляторная Т-клетка воздействует на клетку-мишень с помощью выделения противовоспалительных цитокинов, таких как IL-35, IL-10 или TGF- β , или высвобождения гранзимы из литических гранул, что приводит к гибели мишени. Косвенные механизмы включают воздействие на мишень не самой регуляторной Т-клетки, а других клеток, подвергшихся действию регуляторных Т-клеток [72].

Способность регуляторных Т-клеток ингибировать эффекторные иммунные клетки делает потенциально возможным их использование в терапии заболеваний и состояний, связанных с избыточной иммунной реакцией, например, при трансплантации. Однако первые исследования терапевтических свойств поликлональных регуляторных Т-клеток показали, что их адоптивный перенос индуцирует неспецифическую толерантность, снижает сопротивляемость организма инфекциям и повышает риск развития злокачественных новообразований [73]. Экспрессия CAR дает возможность направить регуляторные Т-клетки прицельно в ткань-мишень, сохраняя исходную ингибирующую активность этих клеток, но в то же время избегая индукции нежелательной иммунологической толерантности. Первые созданные CAR-Treg были предназначены для терапии колита в мышинной модели [74], а вскоре было сообщено о получении первых CAR-Treg человека [75].

В большинстве исследований CAR-Treg, опубликованных на данный момент, регуляторные Т-клетки экспрессируют CAR второго поколения, и в качестве костимуляторного домена выступают CD28 или 4-1BB. Систематический анализ активности CAR второго поколения, направленных против человеческого лейкоцитарного антигена HLA-A2, с различными костимуляторными доменами в регуляторных Т-клетках показал, что в этих клетках лучше всего функционирует CAR с CD28 в своем составе. Дополнительно увеличивает супрессивные свойства таких клеток экспрессия в них IL-10 [76]. Установлено, что, в отличие от классических CAR-T, CAR-Treg с доменом CD28 отличаются лучшей персистенцией, чем с 4-1BB [77, 78]. Кроме того, в настоящее время исследуются регуляторные Т-клетки, экспрессирующие CAR третьего поколения, которые содержат и CD28, и 4-1BB костимуляторные домены [79–81].

За более чем 10 лет, прошедших с момента создания первых CAR-Treg, были получены CAR-Treg разной специфичности, характеризующиеся высокой эффективностью, стабильностью и увеличенной персистенцией в мышинных моделях [82]. Кроме того, по сравнению с CAR-T, CAR-Treg отличаются сниженной потребностью в IL-2 [83]. В мышинных моделях показан эффект CAR-Treg в предотвращении или уменьшении симптомов РТПХ, заболеваний, связанных с чрезмерной активностью иммунной системы, гемофилии и других болезней [73]. На данный момент только одно исследование, посвященное CAR-Treg, перешло на стадию клинических испытаний (NCT04817774). В рамках этого исследования оценивается эффективность и безопасность использования CAR-Treg при пересадке почки. В этом исследовании CAR распознает HLA-A2 в органе-реципиенте, и за счет этого CAR-Treg привлекаются к нему, подавляя иммунный ответ.

Т-Лимфоциты, ассоциированные со слизистыми. Ассоциированные со слизистыми инвариантные Т-клетки (mucosal-associated invariant T cells, MAIT) в качестве антигенов распознают метаболиты витаминов B2 и B9 бактериального происхождения в комплексе с неклассической молекулой MHC MR1 [84]. На долю MAIT может приходиться от 1 до 8% Т-клеток периферической крови [85]; также эти клетки локализуются в слизистых оболочках и лимфоидной ткани. ТКР MAIT состоит из практически неполиморфных цепей α и β , и большая часть MAIT экспрессирует CD8. Эти клетки содержат гранулы с гранзимами и обладают цитотоксическими свойствами [86], а в активированном состоянии секретируют провоспалительные цитокины IFN γ , TNF и IL-17 [87].

MAIT участвуют в защите от инфекций преимущественно бактериальной природы, а также вовлечены в патогенез многих неинфекционных болезней, таких как аутоиммунные заболевания, воспалительное заболевание кишечника, целиакия, а также злокачественные заболевания [84]. Отмечено, что уровень MAIT в кровотоке снижается при раке толстой кишки, причем клетки мигрируют в опухоль и оказывают противоопухолевое цитотоксическое действие, выделяя гранзимы [88]. Уменьшение количества MAIT наблюдается и у пациентов с множественной миеломой [89]. В некоторых случаях MAIT, активно мигрирующие в опухоль, подвергаются иммуносупрессивному влиянию опухолевого микроокружения и утрачивают способность к секреции IFN γ [90].

Тот факт, что MAIT сами по себе активно инфильтрируют опухолевую среду, кроме того, их цитотоксические свойства могут быть использованы в разработке иммунотерапии опухолей. Поскольку MAIT распознают только антигены,

связанные с неклассической молекулой МНС I класса MR1, вероятность развития РТПХ при использовании CAR-MAIT будет ниже, чем в случае цитотоксических CAR-T [23]. Dogan et al. [86] экспрессировали CAR против антигенов CD19 или HER2 в первичных MAIT человека. Полученные CAR-MAIT демонстрировали цитотоксические свойства по отношению к клеткам В-клеточной лимфомы и рака молочной железы соответственно. Показано, что активированные CAR-MAIT по цитотоксичности в отношении клеток-мишеней не уступали CD8⁺ CAR-T-лимфоцитам, однако продуцировали значительно меньше IFN γ и других провоспалительных цитокинов. Последнее наблюдение дает основания полагать, что вероятность развития СВИ и нейротоксичности при введении CAR-MAIT в организм пациента будет ниже, чем в случае CAR-T [87]. Тем не менее для дальнейшей оценки безопасности и противоопухолевых свойств CAR-MAIT необходимы их исследования *in vivo* с использованием лабораторных животных, а также клинические испытания.

Двойные негативные Т-клетки. DN Т-клетки характеризуются экспрессией CD3 при отсутствии экспрессии как CD4, так и CD8. Для DN Т-клеток также характерна экспрессия CD25 [91], который на высоком уровне экспрессируют Treg. ТКР DN Т-клеток могут быть представлены как $\alpha\beta$ -, так и $\gamma\delta$ -цепями. На долю DN Т-клеток приходится от 3 до 5% Т-клеток крови [92]. DN Т-клетки обладают выраженным супрессивным действием в отношении различных групп иммунных клеток (CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, В-клеток и NK-клеток), которое было отмечено как *in vitro*, так и *in vivo*. Благодаря этому DN Т-клетки играют важную роль в предотвращении РТПХ и поддержании толерантности в отношении алло- или ксенотрансплантата [93–95]. Таким образом, DN Т-клетки можно рассматривать как неканоническую подгруппу Treg.

Несмотря на иммуносупрессивное действие в отношении многих иммунных клеток, DN Т-клетки обладают собственными МНС-независимыми цитотоксическими свойствами. DN Т-клетки могут запускать гибель злокачественных клеток через FasL [96], TRAIL и другие поверхностные белки, ассоциированные с цитотоксичностью [97]. Кроме того, они экспрессируют перфорин и гранзим, а также продуцируют TNF и IFN γ [97]. Помимо МНС-независимой цитотоксичности, DN Т-клетки обладают и другими свойствами, которые делают потенциально возможным их использование в иммунотерапии злокачественных заболеваний: легкость экспансии *ex vivo* [98], отсутствие внеопухолевой цитотоксической активности и сниженный риск отторжения после аллогенного переноса [99].

Возможность экспрессии CAR в DN Т-клетках исследована слабо. В 2022 г. Vasic et al. [99] сооб-

щили о получении DN Т-клеток, несущих CAR против CD19, и сравнили их противоопухолевые свойства с таковыми у традиционных CAR-Т-клеток, также направленных против CD19. Авторы заявили, что CAR-DN Т-клетки по противоопухолевым свойствам как *in vitro*, так и *in vivo* не уступали традиционным CAR-Т-клеткам, однако не вызывали РТПХ [99]. Тем не менее полученные результаты требуют независимого подтверждения в других исследованиях.

Цитокин-индуцированные киллеры (CIK от cytokine induced killers) – гетерогенная группа CD8⁺ Т-клеток, фенотипически и функционально близких к NK-клеткам [100, 101]. CIK происходят из CD3⁺ Т-лимфоцитов, которые в процессе экспансии начинают экспрессировать CD56. Исходно CIK были получены из лимфокин-ассоциированных киллеров (лимфоцитов, приобретающих способность к лизису опухолевых клеток после инкубации с IL-2 [102]) в ходе оптимизации протокола их экспансии. Лимфокин-ассоциированные киллеры (lymphokine associated killer, LAK) были получены еще в 1980-х гг. [103], однако, несмотря на их выраженные цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток, затрудненная экспансия *ex vivo* ограничила возможности их применения. Строго регулируемое по времени добавление к LAK IFN γ , IL-2 и моноклонального антитела к CD3, обладающего митогенным действием, привело к получению CIK [104]. В настоящее время эти клетки можно относительно дешево получить из Т-клеток периферической или пуповинной крови.

Цитотоксическое действие CIK требует участия рецептора NKG2D и проявляется в высвобождении содержимого литических гранул с гранзимом. С помощью NKG2D CIK распознают на поверхности клетки-мишени стресс-индуцируемые молекулы, такие как UL16BP и MICA/MICB [105]. Сигналинг через ТКР также остается возможным, поэтому долгое время использование CIK ограничивалось аутологичной терапией из опасения острой РТПХ. Однако недавно была показана относительная безопасность применения CIK на базе донорских клеток после аллотрансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Предполагается, что это связано с короткой персистенцией терминально дифференцированных CD3⁺ CD56⁺-клеток, а также с пониженной экспрессией некоторых хоминговых рецепторов [106].

Благодаря выраженным цитотоксическим свойствам, способности к быстрой экспансии *ex vivo* и распознаванию опухолевых клеток с помощью NKG2D, а также безопасности при аллогенном адоптивном переносе CIK рассматриваются как перспективные эффекторы CAR-клеточной терапии [107]. В нескольких доклинических исследованиях была показана эффективность CAR-CIK

против гематологических и солидных опухолей. Например, продемонстрировано, что CIK, экспрессирующие CAR против CD19, содержащий домены CD28/4-1BB и CD3 ζ , эффективно уничтожают клетки В-клеточного острого лимфобластного лейкоза [108, 109]. CIK, несущие CAR к соответствующим опухолевым антигенам, эффективно уничтожали клетки рака толстой кишки, острого миелобластного лейкоза, саркомы мягких тканей и других видов опухолей [107]. Для некоторых CAR было отмечено, что их экспрессия в CIK приводит к увеличению продукции IFN γ и TNF по сравнению с CIK, не экспрессирующими CAR [110, 111].

По состоянию на 2022 г. зарегистрировано одно клиническое испытание CAR-CIK, в котором исследуется эффективность и безопасность CD19-CAR-CIK при остром лимфобластном лейкозе (NCT03389035). Таким образом, для получения информации об эффективности CAR-CIK требуется дальнейшее изучение.

Макрофаги. Специализированные фагоцитирующие клетки тканей, макрофаги, интенсивно инфильтрируют строму солидных опухолей и являются важным компонентом опухолевого микроокружения. Распознавая чужеродные агенты с помощью рецепторов врожденного иммунитета, в первую очередь Toll-подобных и NOD-подобных рецепторов, макрофаги активируются и продуцируют провоспалительные цитокины, такие как TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12 и IL-23, которые воздействуют на многие клетки в микроокружении опухоли и, в частности, способствуют противоопухолевой активности Т- и NK-клеток. Описанные макрофаги с провоспалительными свойствами имеют так называемый М1-фенотип. Макрофаги фенотипа М2, напротив, препятствуют воспалению и развитию противоопухолевого Т-клеточного иммунитета и способствуют росту опухоли, продуцируя цитокины IL-4, IL-5 и IL-13. Основная физиологическая роль М2-макрофагов заключается в заживлении ран [112]. Макрофаги, находящиеся в опухолевом микроокружении, известны как ассоциированные с опухолями макрофаги (tumor associated macrophages, TAM). TAM с фенотипом М2 способствуют росту и метастазированию опухоли, а также обладают иммуносупрессивными свойствами [66]. Таким образом, важной задачей противоопухолевой иммунотерапии, действующей TAM, является их поляризация в направлении фенотипа М1, способствующего уничтожению неоплазии.

Способность макрофагов к фагоцитозу может быть усилена за счет экспрессии в них CAR, несущих внутриклеточные домены, которые запускают сигнальные пути активации фагоцитоза. В одном из первых исследований, посвященных CAR-макрофагам (CAR-M), первичные моноциты человека были трансдуцированы CAR против карцино-

эмбрионального антигена (CEA) с CD64 (Fc γ RI) в качестве сигнального домена. Полученные CAR-M обладали противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo*, однако ее молекулярный механизм был неясен [113]. Дальнейшие исследования показали, что экспрессия CAR, содержащих рецептор фагоцитоза Megf10 или Fc γ R в качестве сигнальных доменов, усиливает фагоцитарную активность макрофагов [114, 115]. На интенсивности фагоцитоза положительно сказывается и экспрессия CAR с сигнальным доменом CD3 ζ , гомологичным Fc γ RI.

Продemonстрировано, что макрофаги, экспрессирующие CAR против CD19 с доменами Megf10 или Fc γ R, эффективно уничтожают CD19-положительные опухолевые клетки, причем полный фагоцитоз клеток имеет место лишь в небольшой доле случаев, и большую часть злокачественных клеток макрофаги уничтожают посредством трогоцитоза [116]. Zhang et al. [116] получили макрофаги, экспрессирующие анти-CD19 CAR второго поколения с сигнальным доменом CD3 ζ и костимулирующим доменом 4-1BB, из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). Такие макрофаги фагоцитировали опухолевые клетки в культуре и продуцировали провоспалительные цитокины, однако *in vivo* оказывали лишь минимальный эффект на рост опухоли [117].

Установлено, что сама процедура создания CAR-M запускает их поляризацию в провоспалительные клетки. В частности, показано, что трансдукция аденовирусным вектором, кодирующим CAR, и последующая экспрессия CAR поляризует макрофаги в направлении фенотипа М1, который сохраняется в опухолевом микроокружении [118]. Более того, CAR-M способны к кросс-презентации опухолевых антигенов после фагоцитоза. Установлено, что макрофаги, экспрессирующие CAR против HER2 (антиген клеток рака молочной железы), фагоцитируют опухолевые клетки и презентуют процессированные антигены. Показано, что CAR-M запускают системный противоопухолевый иммунитет [119]. На мышинной модели рака яичника было показано, что однократное введение CAR-M существенно повышает выживаемость и замедляет развитие опухоли, однако у всех мышей в конечном итоге рост опухоли возобновлялся [115]. Тем не менее способность CAR-M превращать микроокружение опухоли в провоспалительную среду делает потенциально возможным их применение в качестве дополнения к CAR-T или другим видам иммунотерапии.

Макрофаги могут продуцировать матриксные металлопротеиназы, которые вызывают значительные перестройки межклеточного матрикса опухоли и влияют на архитектуру новообразования, и это их свойство также может быть использовано в CAR-терапии. Было показано, что экспрессия CAR

со специфичностью к HER2 и с CD147 в качестве трансмембранного и внутриклеточного домена в макрофагах стимулирует секрецию ими матриксных металлопротеиназ. На мышинной модели рака молочной железы было продемонстрировано, что введение указанных CAR-M приводит к перестройке опухолевого матрикса, которая способствует инфильтрации Т-клеток в опухоль. Отмечается, что в крови больных мышей, участвующих в эксперименте, были снижены уровни провоспалительных цитокинов, ассоциированных с СВЦ (IFN γ , TNF и IL-6), в то время как в самой опухоли уровни IL-12 и IFN γ были повышены [120]. Можно предположить, что терапия CAR-M будет сопряжена с пониженным риском развития СВЦ.

Имеющихся на данный момент сведений недостаточно, чтобы делать выводы об эффективности и безопасности CAR-M-терапии для человека. То обстоятельство, что макрофаги являются одним из основных типов клеток, запускающих СВЦ, делает необходимой более детальную проверку безопасности CAR-M. Кроме того, моноциты периферической крови отличаются гетерогенностью, и есть вероятность, что полученные из них CAR-M при системном применении будут чаще перемещаться не в опухоль, а в здоровые ткани [23], что может привести к выраженным побочным эффектам со стороны различных систем органов. На данный момент в клинические испытания вышла только одна разработка CAR-M, направленных против солидных опухолей со сверхэкспрессией HER2 (NCT04660929).

Дендритные клетки. Будучи профессиональными антигенпрезентирующими клетками, DC задействованы как в созревании наивных Т-клеток, так и в реактивации Т-клеток памяти. Во время презентации антигена Т-клеткам DC продуцируют цитокины, модулирующие активность Т-клеток. DC, находясь в микроокружении опухоли, могут как вызывать иммунную толерантность, так и способствовать развитию противоопухолевого иммунного ответа [121, 122]. Кроме того, DC способны к кросс-презентации опухолевых антигенов цитотоксическим CD8⁺ Т-клеткам, тем самым усиливая противоопухолевый ответ [123].

Потенциал DC, экспрессирующих CAR, как способа управления противоопухолевой активностью CAR-T-клеток изучен слабо. Suh et al. [123] исследовали возможность использования DC, экспрессирующих CAR (CAR-DC), для привлечения в опухолевую среду и активации CAR-T-клеток посредством секреции цитокинов. Показано, что экспрессия CAR к CD33 в DC способствует их перемещению в костный мозг у мышей с острым миелоидным лейкозом. Кроме того, у мышей, получивших CAR-DC и CAR-T, также направленных против CD33, значительно повышались уров-

ни IL-12, IFN γ и TNF, кроме того, возросла общая выживаемость по сравнению с мышами, получившими только CAR-T. Таким образом, одновременное введение CAR-DC и CAR-T существенно увеличивает эффективность уничтожения злокачественных клеток [124]. Стоит отметить, что безопасность возможного клинического применения CAR-DC должна быть особенно тщательно изучена, поскольку секретируемый IL-12 в высокой концентрации может обладать системным токсическим действием [125]. На сегодняшний день нет ни одного зарегистрированного клинического испытания, посвященного CAR-DC.

В-Клетки. Помимо Т-клеток и клеток врожденного иммунитета, интерес для CAR-технологии представляют и В-клетки. Благодаря способности дифференцироваться в долгоживущие плазматические клетки, секретирующие антитела, В-лимфоциты могут стать безопасным и контролируемым источником терапевтических моноклональных антител, а экспрессия в них CAR к определенным опухолевым антигенам делает возможной таргетную доставку антител, лишённую побочных эффектов системного введения последних.

Несмотря на привлекательную перспективу, исследования экспрессирующих CAR В-клеток и их терапевтического применения на данный момент ограничены. Возможность лентивирусной трансдукции В-клеток и последующей экспрессии CAR в них была показана в 2018 г., когда был описан пациент с рецидивом В-клеточной лимфомы, возникшей от единственного В-клеточного клона, случайно трансдуцированного CAR [126]. Вскоре Pesch et al. [126] продемонстрировали, что гены, кодирующие химерные В-клеточные рецепторы (CBCR), можно внедрять в В-клетки с помощью геномного редактирования методом CRISPR/Cas9. Структура CBСR, использованного в этой работе, включала трансмембранный участок CD28 и CD79 β , сигнальный домен BCR вместо классического CD3 ζ . Внедрение гена, кодирующего CBСR указанного состава, в первичные В-клетки мыши привело к обильному представлению CBСR на их поверхности и дало им возможность распознавать антигены без участия собственных В-клеточных рецепторов [127]. На данный момент противоопухолевая активность и терапевтическая эффективность В-клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, остается неизвестной, равно как и их безопасность для человека.

ОДНА МИШЕНЬ – НЕСКОЛЬКО ТИПОВ CAR-КЛЕТОК

В первых исследованиях, посвященных противоопухолевому действию лейкоцитов разных типов,

экспрессирующих CAR, в качестве мишеней для химерных рецепторов использовался небольшой набор опухолеассоциированных антигенов, среди которых CD19, GD2 и другие. На сегодняшний день CAR-клетки, эффективно распознающие некоторые опухолевые антигены, были получены из разных типов лейкоцитов. Полученные из разных источников CAR-клетки, распознающие один и тот же опухолевый антиген, потенциально, создают пространство для маневра при выборе оптимальной терапии для каждого пациента, поскольку эффекторные свойства разных групп лейкоцитов отличаются.

Четыре из шести препаратов CAR-T, одобренных FDA на данный момент, направлены против антигена CD19 и предназначены для терапии В-клеточных неоплазий. Несмотря на продемонстрированную высокую эффективность, анти-CD19 CAR-T-терапия дает опасные побочные эффекты, в первую очередь СВИЦ и нейротоксичность, у значимой доли пациентов. Так, применение препарата Axicabtagene ciloleucel, представляющего собой CAR-T-клетки с костимуляторным доменом CD28 и сигнальным доменом CD3 ζ , вызывает СВИЦ у 93% и нейротоксичность – у 67% пациентов [128, 129]. К настоящему моменту CAR-клетки, эффективно распознающие CD19-положительные злокачественные клетки и уничтожающие их, были получены из $\gamma\delta$ Т-клеток [52], MAIT-клеток [87], NKT-клеток [68], NK-клеток [29], DN Т-клеток [100], CIK [108] и макрофагов [114, 115]. Регуляторные Т-клетки, экспрессирующие CD19, были созданы для подавления продукции антител и предотвращения РТПХ [130].

Доклинические исследования, а также исследования на небольших группах пациентов показали, что анти-CD19 CAR-клетки, отличные от цитотоксических Т-клеток, демонстрируют выраженный противоопухолевый эффект при меньшей, чем при CAR-T, частоте побочных эффектов. Однако многие из упомянутых клеточных продуктов пока не вышли на полномасштабные клинические испытания, а те продукты, для которых запущены клинические испытания, на данный момент находятся только на начальных фазах, поэтому делать выводы относительно их безопасности и эффективности преждевременно.

Еще два препарата CAR-T, одобренных FDA, Idecabtagene vicleucel и Ciltacabtagene autoleucel, направлены против антигена BCMA и предназначены для терапии множественной миеломы. Как и в случае с терапией анти-CD19 CAR-T, высокая эффективность этих препаратов сочетается со значительным риском СВИЦ или нейротоксичности: в случае Idecabtagene vicleucel эти риски составляют 76% и 42%, в случае Ciltacabtagene autoleucel – 92% и 20% соответственно [131, 132]. Заявлено о полу-

чении CAR-NK-клеток, нацеленных на распознавание BCMA [133], однако разработка пока не поступила в клинические исследования.

В случае терапии солидных опухолей также существуют примеры получения CAR-клеток из разных лейкоцитов, направленных на один опухолеассоциированный антиген. Так, CAR-клетки, распознающие GD2 (антиген нейробластомы), были получены из $\gamma\delta$ Т-клеток и NKT-клеток. На данный момент на этапе клинических испытаний находятся только CAR-NKT-клетки, распознающие GD2, но и это испытание находится только на первой фазе, поэтому безопасность и эффективность обоих клеточных продуктов еще нуждается в проверке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последние 20 лет ознаменовались громкими успехами подхода CAR-T в терапии онкогематологических заболеваний, и уже шесть CAR-T-препаратов были одобрены FDA для клинического использования. Несмотря на недостатки «традиционных» CAR-T, долгое время исследование возможностей получения CAR-клеток из других лейкоцитов не получало должного внимания. Результаты доклинических исследований эффективности и безопасности CAR-клеток, проведенных на культурах клеток и мышиных моделях, свидетельствуют о потенциальной возможности использования широкого спектра CAR-клеток для терапии онкологических заболеваний у человека, включая солидные опухоли. Систематический обзор накопленных данных по экспрессии в разных группах лейкоцитов CAR к различным мишеням приводится в таблице в статье Qin et al. [33]. Тем не менее на данный момент даже клеточные продукты, которые проходят клинические исследования, находятся только на I/II фазах испытаний, при том что подавляющее большинство разработок терапевтических препаратов на основе CAR-экспрессирующих иммунных клеток пока не продвинулось дальше доклинических исследований.

Хотя альтернативные CAR-клеточные продукты могут обладать важными преимуществами перед традиционными CAR-T, такими как сниженный риск развития СВИЦ и нейротоксичности в ходе терапии, по ряду параметров CAR-T пока остается впереди. Поскольку сигнальные пути, стоящие за активностью CAR, отличаются в разных группах клеток адаптивного и врожденного иммунитета, при создании CAR для экспрессии в иммунных клетках разных типов критически важное значение имеет выбор костимуляторных и сигнальных доменов. Включение в состав CAR домена, который недостаточно функционален в клетках данного типа, может привести к снижению активности CAR

и, как следствие, уменьшению терапевтической эффективности. Например, в случае макрофагов сигнальный домен *Megf10* в составе CAR оказывается эффективнее, чем *CD3ζ*, который оптимально функционирует в Т-клетках. Таким образом, под каждый новый вид клеток, в которых экспрессируют CAR, может потребоваться «адаптация» рецептора и определение доменов, обеспечивающих передачу сигналов от активированного рецептора на необходимом уровне. В случае традиционных CAR-T выбор доменов для включения в состав CAR исследован значительно лучше. Кроме того, некоторые иммунные клетки подвергаются экспансии *ex vivo* с большим трудом, и получение достаточного их количества может потребовать немало времени и средств, что существенно ограничивает возможности получения из них клинически релевантного продукта. Впрочем, в некоторых случаях удается найти альтернативные источники для получения лейкоцитов, которые позволяют по меньшей мере частично решить проблему затрудненной экспансии. Например, CAR-NK-клетки удалось получить из клеточных линий или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [20], а CAR-макрофаги – из моноцитов или iPSC [116]. В то же время такой способ получения клеток может быть связан с потенциальным риском возникновения опухолей из CAR-клеточного продукта в связи с большим онкогенным потенциалом iPSC и, соответственно, требует прицельного изучения с точки зрения безопасности.

Несмотря на существенные ограничения, связанные с созданием CAR-терапии на основе разных типов лейкоцитов, в иммунотерапии солидных опухолей альтернативные CAR-клетки имеют хорошие перспективы. Использование CAR-T в лечении солидных опухолей оказалось в значительной степени неэффективным из-за затрудненной ин-

фильтрации CAR-T-клеток в опухоль, супрессорного влияния опухолевого микроокружения, а также гетерогенности опухолевых антигенов и их частой утраты. Доклинические исследования показали, что многие альтернативные иммунные клетки, экспрессирующие CAR, способны успешно уничтожать солидные опухоли, а некоторые, в частности CAR-M, могут превращать опухолевое микроокружение в воспалительную среду, способствующую элиминации опухоли. Вопрос инфильтрации опухоли иммунными клетками, экспрессирующими CAR, в солидные опухоли также не решен до конца. Возможность эффективного проникновения CAR-клеток в опухоль пока была показана только для NK-клеток и макрофагов [117]. Тем не менее можно предположить, что в комбинации с другими терапевтическими подходами CAR-лейкоциты станут эффективным методом лечения солидных опухолей.

Подводя итог, можно сказать, что CAR-терапия на основе разных типов иммунных клеток уверенно движется в сторону клинического применения. Однако потребуются годы, чтобы альтернативные CAR-клетки стали эффективным, безопасным и широко используемым подходом в терапии онкологических и некоторых других заболеваний.

Вклад авторов. Е.П. Минина и А.В. Боголюбова – концепция обзора; Е.П. Минина – написание текста; С.А. Шитиков – создание иллюстраций; Д.В. Дианов и А.В. Боголюбова – редактирование текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F., and Kurosawa, Y. (1987) Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 960-968.
2. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., and Schindler, D. G. (1993) Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the γ or ζ subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 720-724, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.720>.
3. Sadelain, M., Brentjens, R., and Riviere, I. (2013) The basic principles of chimeric antigen receptor design, *Cancer Discov.*, **3**, 388-398, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>.
4. Gomes-Silva, D., Mukherjee, M., Srinivasan, M., Krenciute, G., Dakhova, O., Zheng, Y., Cabral, J. M. S., Rooney, C. M., Orange, J. S., Brenner, M. K., and Mamonkin, M. (2017) Tonic 4-1BB costimulation in chimeric antigen receptors impedes T cell survival and is vector-dependent, *Cell Rep.*, **21**, 17-26, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.015>.
5. Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Riviere, I., and Sadelain, M. (2002) Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 70-75, <https://doi.org/10.1038/nbt0102-70>.

6. Brentjens, R. J., Latouche, J. B., Santos, E., Marti, F., Gong, M. C., Lyddane, C., King, P. D., Larson, S., Weiss, M., Riviere, I., and Sadelain, M. (2003) Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15, *Nat. Med.*, **9**, 279-286, <https://doi.org/10.1038/nm827>.
7. Список препаратов клеточной и генной терапии, одобренных FDA, URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>.
8. Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M., and Rosenberg, S. A. (2010) Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2, *Mol. Ther.*, **18**, 843-851, <https://doi.org/10.1038/mt.2010.24>.
9. D'Aloia, M. M., Zizzari, I. G., Sacchetti, B., Pierelli, L., and Alimandi, M. (2018) CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors, *Cell Death Dis.*, **9**, 282, <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0278-6>.
10. Larson, R. C., and Maus, M. V. (2021) Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells, *Nat. Rev. Cancer*, **21**, 145-161, <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00323-z>.
11. Long, A. H., Haso, W. M., Shern, J. F., Wanhainen, K. M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J. P., Walker, A. J., Kohler, M. E., Venkateshwara, V. R., Kaplan, R. N., Patterson, G. H., Fry, T. J., Orentas, R. J., and Mackall, C. L. (2015) 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors, *Nat. Med.*, **21**, 581-590, <https://doi.org/10.1038/nm.3838>.
12. Hong, M., Clubb, J. D., and Chen, Y. Y. (2020) Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy, *Cancer Cell*, **38**, 473-488, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.07.005>.
13. Rafiq, S., Hackett, C. S., and Brentjens, R. J. (2020) Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **17**, 147-167, <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0297-y>.
14. Meza Guzman, L. G., Keating, N., and Nicholson, S. E. (2020) Natural killer cells: tumor surveillance and signaling, *Cancers (Basel)*, **12**, <https://doi.org/10.3390/cancers12040952>.
15. Kumar, S. (2018) Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors, *Immunology*, **154**, 383-393, <https://doi.org/10.1111/imm.12921>.
16. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G., and Bryceson, Y. T. (2010) Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition, *Blood*, **115**, 2167-2176, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238469>.
17. Lo Nigro, C., Macagno, M., Sangiolo, D., Bertolaccini, L., Aglietta, M., and Merlano, M. C. (2019) NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives, *Ann. Transl. Med.*, **7**, 105, <https://doi.org/10.21037/atm.2019.01.42>.
18. Тыщук Е. В., Михайлова В. А., Сельков С. А., Соколов Д. И. (2021). Естественные киллеры: происхождение, фенотип, функции, *Медицинская иммунология*, **23**, 1207-1228, <https://doi.org/10.15789/1563-0625-NKC-2330>.
19. Xu, Y., Liu, Q., Zhong, M., Wang, Z., Chen, Z., Zhang, Y., Xing, H., Tian, Z., Tang, K., Liao, X., Rao, Q., Wang, M., and Wang, J. (2019) 2B4 costimulatory domain enhancing cytotoxic ability of anti-CD5 chimeric antigen receptor engineered natural killer cells against T cell malignancies, *J. Hematol. Oncol.*, **12**, 49, <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0732-7>.
20. Xie, G., Dong, H., Liang, Y., Ham, J. D., Rizwan, R., and Chen, J. (2020) CAR-NK cells: a promising cellular immunotherapy for cancer, *EBioMed.*, **59**, 102975, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102975>.
21. Töpfer, K., Cartellieri, M., Michen, S., Wiedemuth, R., Muller, N., Lindemann, D., Bachmann, M., Fussel, M., Schackert, G., and Temme, A. (2015) DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy, *J. Immunol.*, **194**, 3201-3212, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400330>.
22. Cifaldi, L., Melaiu, O., Giovannoni, R., Benvenuto, M., Focaccetti, C., Nardozi, D., Barillari, G., and Bei, R. (2023) DNAM-1 chimeric receptor-engineered NK cells: a new frontier for CAR-NK cell-based immunotherapy, *Front. Immunol.*, **14**, 1197053, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1197053>.
23. Oei, V. Y. S., Siernicka, M., Graczyk-Jarzynka, A., Hoel, H. J., Yang, W., Palacios, D., Almasbak, H., Bajor, M., Clement, D., Brandt, L., Onfelt, B., Goodridge, J., Winiarska, M., Zagodzón, R., Olweus, J., Kyte, J. A., and Malmberg, K. J. (2018) Intrinsic functional potential of NK-cell subsets constrains retargeting driven by chimeric antigen receptors, *Cancer Immunol. Res.*, **6**, 467-480, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0207>.
24. Xia, J., Minamino, S., and Kuwabara, K. (2020) CAR-expressing NK cells for cancer therapy: a new hope, *Biosci. Trends*, **14**, 354-359, <https://doi.org/10.5582/bst.2020.03308>.
25. Dong, H., Ham, J. D., Hu, G., Xie, G., Vergara, J., Liang, Y., Ali, A., Tarannum, M., Donner, H., Baginska, J., Abdulhamid, Y., Dinh, K., Soiffer, R. J., Ritz, J., Glimcher, L. H., Chen, J., and Romee, R. (2022) Memory-like NK cells armed with a neoepitope-specific CAR exhibit potent activity against NPM1 mutated acute myeloid leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2122379119, <https://doi.org/10.1073/pnas.2122379119>.
26. Kłopotowska, M., Bajor, M., Graczyk-Jarzynka, A., Kraft, A., Pilch, Z., Zhylyko, A., Firczuk, M., Baranowska, I., Łazniewski, M., Plewczynski, D., Goral, A., Soroczynska, K., Domagała, J., Marhelava, K., Ślusarczyk, A., Retecki, K., Ramji, K., Krawczyk, M., Temples, M. N., Sharma, B., Lachota, M., Netskar, H., Malmberg, K.-J., Zagodzón, R., and Winiarska, M. (2022) PRDX-1 supports the survival and antitumor activity of primary and CAR-modified NK cells under oxidative stress, *Cancer Immunol. Res.*, **10**, 228-244, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-1023>.

27. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants, *Science*, **295**, 2097-2100, <https://doi.org/10.1126/science.1068440>.
28. Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., McKenna, D., Le, C., Defor, T. E., Burns, L. J., Orchard, P. J., Blazar, B. R., Wagner, J. E., Slungaard, A., Weisdorf, D. J., Okazaki, I. J., and McGlave, P. B. (2005) Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer, *Blood*, **105**, 3051-3057, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2974>.
29. Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H. A., Thompson, P., Basar, R., Nassif Kerbaux, L., Overman, B., Thall, P., Kaplan, M., Nandivada, V., Kaur, I., Nunez Cortes, A., Cao, K., Daher, M., Hosing, C., Cohen, E. N., Kebriaei, P., Mehta, R., Neelapu, S., Nieto, Y., Wang, M., Wierda, W., Keating, M., Champlin, R., Shpall, E., and Rezvani, K. (2020) Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors, *N. Engl. J. Med.*, **382**, 545-553, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>.
30. Xiao, L., Cen, D., Gan, H., Sun, Y., Huang, N., Xiong, H., Jin, Q., Su, L., Liu, X., Wang, K., Yan, G., Dong, T., Wu, S., Zhou, P., Zhang, J., Liang, W., Ren, J., Teng, Y., Chen, C., and Xu, X. H. (2019) Adoptive transfer of NKG2D CAR mRNA-engineered natural killer cells in colorectal cancer patients, *Mol. Ther.*, **27**, 1114-1125, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.03.011>.
31. Wrona, E., Borowiec, M., and Potemski, P. (2021) CAR-NK cells in the treatment of solid tumors, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22115899>.
32. Ng, Y. Y., Du, Z., Zhang, X., Chng, W. J., and Wang, S. (2022) CXCR4 and anti-BCMA CAR co-modified natural killer cells suppress multiple myeloma progression in a xenograft mouse model, *Cancer Gene Ther.*, **29**, 475-483, <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00365-x>.
33. Qin, V. M., D'Souza, C., Neeson, P. J., and Zhu, J. J. (2021) Chimeric antigen receptor beyond CAR-T cells, *Cancers (Basel)*, **13**, <https://doi.org/10.3390/cancers13030404>.
34. Melenhorst, J. J., Chen, G. M., Wang, M., Porter, D. L., Chen, C., Collins, M. A., Gao, P., Bandyopadhyay, S., Sun, H., Zhao, Z., Lundh, S., Pruteanu-Malinici, I., Nobles, C. L., Maji, S., Frey, N. V., Gill, S. I., Loren, A. W., Tian, L., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Ambrose, D. E., Davis, M. M., Fraietta, J. A., Brogdon, J. L., Young, R. M., Chew, A., Levine, B. L., Siegel, D. L., Alanio, C., Wherry, E. J., Bushman, F. D., Lacey, S. F., Tan, K., and June, C. H. (2022) Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4⁺ CAR T cells, *Nature*, **602**, 503-509, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04390-6>.
35. Sabbah, M., Jondreville, L., Lacan, C., Norol, F., Vieillard, V., Roos-Weil, D., and Nguyen, S. (2022) CAR-NK cells: a chimeric hope or a promising therapy? *Cancers (Basel)*, **14**, <https://doi.org/10.3390/cancers14153839>.
36. Ebrahimiyan, H., Tamimi, A., Shokoohian, B., Minaei, N., Memarnejadian, A., Hossein-Khannazer, N., Hassan, M., and Vosough, M. (2022) Novel insights in CAR-NK cells beyond CAR-T cell technology; promising advantages, *Int. Immunopharmacol.*, **106**, 108587, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108587>.
37. Daher, M., Basar, R., Gokdemir, E., Baran, N., Upreti, N., Nunez Cortes, A. K., Mendt, M., Kerbaux, L. N., Banerjee, P. P., Shanley M., Imahashi, N., Li, L., Lim, F. L. W. I., Fathi, M., Rezvan, A., Mohanty, V., Shen, Y., Shaim, H., Lu, J., Ozcan, G., Ensley, E., Kaplan, M., Nandivada, V., Bdiwi, M., Acharya, S., Xi, Y., Wan, X., Mak, D., Liu, E., Jiang, X. R., Ang, S., Muniz-Feliciano, L., Li, Y., Wang, J., Kordasti, S., Petrov, N., Varadarajan, N., Marin, D., Brunetti, L., Skinner, R. J., Lyu, S., Silva, L., Turk, R., Schubert, M. S., Rettig, G. R., McNeill, M. S., Kurgan, G., M Behlke, M. A., Li, H., Fowlkes, N. W., Chen, K., Konopleva, M., Champlin, R. E., Shpall, E. J., and Rezvani, K. (2021) Targeting a cytokine checkpoint enhances the fitness of armored cord blood CAR-NK cells, *Blood*, **137**, 624-636, <https://doi.org/10.1182/blood.2020007748>.
38. Pulè, M. A., Straathof, K. C., Dotti, G., Heslop, H. E., Rooney, C. M., and Brenner, M. K. (2005) A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells, *Mol. Ther.*, **12**, 933-941, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.04.016>.
39. Li, Y., Basar, R., Wang, G., Liu, E., Moyes, J. S., Li, L., Kerbaux, L. N., Upreti, N., Fathi, M., Rezvan, A., Banerjee, P. P., Muniz-Feliciano, L., Laskowski, T. J., Ensley, E., Daher, M., Shanley, M., Mendt, M., Acharya, S., Liu, B., Biedersadt, A., Rafei, H., Guo, X., Garcia, L. M., Lin P., Ang, S., Marin, D., Chen, K., Bover, L., Champlin, R. E., Varadarajan, N., Shpall, E. J., and Rezvani, K. (2022) KIR-based inhibitory CARs overcome CAR-NK cell trogocytosis-mediated fratricide and tumor escape, *Nat. Med.*, **28**, 2133-2144, <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02003-x>.
40. Li, L., Mohanty, V., Dou, J., Huang, Y., Banerjee, P. P., Miao, Q., Lohr, J. G., Vijaykumar, T., Frede, J., Knoechel, B., Muniz-Feliciano, L., Laskowski, T. J., Liang, S., Moyes, J. S., Nandivada, V., Basar, R., Kaplan, M., Daher, M., Liu, E., Li, Y., Acharya, S., Lin, P., Shanley, M., Rafei, H., Marin, D., Mielke, S., Champlin, R. E., Shpall, E. J., Chen, K., and Rezvani, K. (2023) Loss of metabolic fitness drives tumor resistance after CAR-NK cell therapy and can be overcome by cytokine engineering, *Sci. Adv.*, **9**, eadd6997, <https://doi.org/10.1126/sciadv.add6997>.
41. Papadopoulou, M., Sanchez Sanchez, G., and Vermijlen, D. (2020) Innate and adaptive $\gamma\delta$ T cells: how, when, and why, *Immunol. Rev.*, **298**, 99-116, <https://doi.org/10.1111/imr.12926>.

42. Simões, A. E., Di Lorenzo, B., and Silva-Santos, B. (2018) Molecular determinants of Target cell recognition by human $\gamma\delta$ T cells, *Front. Immunol.*, **9**, 929, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00929>.
43. Chien, Y. H., Meyer, C., and Bonneville, M. (2014) $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond, *Annu. Rev. Immunol.*, **32**, 121-155, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120216>.
44. Deng, J., and Yin, H. (2022) Gamma delta ($\gamma\delta$) T cells in cancer immunotherapy; where it comes from, where it will go? *Eur. J. Pharmacol.*, **919**, 174803, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174803>.
45. Sebestyen, Z., Prinz, I., Dechanet-Merville, J., Silva-Santos, B., and Kuball, J. (2020) Translating gammadelta ($\gamma\delta$) T cells and their receptors into cancer cell therapies, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 169-184, <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0038-z>.
46. Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E., and Hayday, A. C. (2001) Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells, *Science*, **294**, 605-609, <https://doi.org/10.1126/science.1063916>.
47. Donia, M., Ellebaek, E., Andersen, M. H., Straten, P. T., and Svane, I. M. (2012) Analysis of Vdelta1 T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes, *Oncoimmunology*, **1**, 1297-1304, <https://doi.org/10.4161/onci.21659>.
48. Wang, J., Lin, C., Li, H., Li, R., Wu, Y., Liu, H., Zhang, H., He, H., Zhang, W., and Xu, J. (2017) Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells predict prognosis and adjuvant chemotherapeutic benefit in patients with gastric cancer, *Oncoimmunology*, **6**, e1353858, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1353858>.
49. Silva-Santos, B., Mensurado, S., and Coffelt, S. B. (2019) $\gamma\delta$ T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 392-404, <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0153-5>.
50. Gunderson, A. J., Kaneda, M. M., Tsujikawa, T., Nguyen, A. V., Affara, N. I., Ruffell, B., Gorjestani, S., Liudahl, S. M., Truitt, M., Olson, P., Kim, G., Hanahan, D., Tempero, M. A., Sheppard, B., Irving, B., Chang, B. Y., Varner, J. A., and Coussens, L. M. (2016) Bruton tyrosine kinase-dependent immune cell cross-talk drives pancreas cancer, *Cancer Discov.*, **6**, 270-285, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0827>.
51. Deniger, D. C., Switzer, K., Mi, T., Maiti, S., Hurton, L., Singh, H., Huls, H., Olivares, S., Lee, D. A., Champlin, R. E., and Cooper, L. J. (2013) Bispecific T-cells expressing polyclonal repertoire of endogenous $\gamma\delta$ T-cell receptors and introduced CD19-specific chimeric antigen receptor, *Mol. Ther.*, **21**, 638-647, <https://doi.org/10.1038/mt.2012.267>.
52. Rozenbaum, M., Meir, A., Aharoni, Y., Itzhaki, O., Schachter, J., Bank, I., Jacoby, E., and Besser, M. J. (2020) Gamma-delta CAR-T cells show CAR-directed and independent activity against leukemia, *Front. Immunol.*, **11**, 1347, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01347>.
53. Fisher, J., Abramowski, P., Wisidagamage Don, N. D., Flutter, B., Capsomidis, A., Cheung, G. W., Gustafsson, K., and Anderson, J. (2017) Avoidance of on-target off-tumor activation using a co-stimulation-only chimeric antigen receptor, *Mol. Ther.*, **25**, 1234-1247, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.002>.
54. Morandi, F., Yazdanifar, M., Cocco, C., Bertaina, A., and Airolidi, I. (2020) Engineering the bridge between innate and adaptive immunity for cancer immunotherapy: focus on $\gamma\delta$ T and NK cells, *Cells*, **9**, <https://doi.org/10.3390/cells9081757>.
55. Fleischer, L. C., Becker, S. A., Ryan, R. E., Fedanov, A., Doering, C. B., and Spencer, H. T. (2020) Non-signaling chimeric antigen receptors enhance antigen-directed killing by $\gamma\delta$ T cells in contrast to $\alpha\beta$ T cells, *Mol. Ther. Oncolytics*, **18**, 149-160, <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.06.003>.
56. Ali, A. K., Tarannum, M., and Romee, R. (2021) Is adoptive cellular therapy with non-T-cell immune effectors the future? *Cancer J.*, **27**, 168-175, <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000517>.
57. Vivier, E., and Anfossi, N. (2004) Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future, *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 190-198, <https://doi.org/10.1038/nri1306>.
58. Kriegsmann, K., Kriegsmann, M., von Bergwelt-Baildon, M., Cremer, M., and Witzens-Harig, M. (2018) NKT cells – new players in CAR cell immunotherapy? *Eur. J. Haematol.*, **101**, 750-757, <https://doi.org/10.1111/ejh.13170>.
59. Yoneda, K., Morii, T., Nieda, M., Tsukaguchi, N., Amano, I., Tanaka, H., Yagi, H., Narita, N., and Kimura, H. (2005) The peripheral blood Valpha24⁺ NKT cell numbers decrease in patients with haematopoietic malignancy, *Leuk. Res.*, **29**, 147-152, <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.06.005>.
60. Tahir, S. M., Cheng, O., Shaulov, A., Koezuka, Y., Bubley, G. J., Wilson, S. B., Balk, S. P., and Exley, M. A. (2001) Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer, *J. Immunol.*, **167**, 4046-4050, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.7.4046>.
61. Tachibana, T., Onodera, H., Tsuruyama, T., Mori, A., Nagayama, S., Hiai, H., and Imamura, M. (2005) Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 7322-7327, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0877>.
62. Schneiders F. L., de Bruin, R. C., van den Eertwegh, A. J., Scheper, R. J., Leemans, C. R., Brakenhoff, R. H., Langendijk, J. A., Verheul, H. M., de Gruijl, T. D., Molling, J. W., and van der Vliet, H. J. (2012) Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up, *J. Clin. Oncol.*, **30**, 565-567, <https://doi.org/10.1200/jco.2011.39.3975>.

63. Bassiri, H., Das, R., Guan, P., Barrett, D. M., Brennan, P. J., Banerjee, P. P., Wiener, S. J., Orange, J. S., Brenner, M. B., Grupp, S. A., and Nichols, K. E. (2014) iNKT cell cytotoxic responses control T-lymphoma growth *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Immunol. Res.*, **2**, 59-69, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0104>.
64. Nair, S., and Dhodapkar, M. V. (2017) Natural killer T cells in cancer immunotherapy, *Front. Immunol.*, **8**, 1178, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01178>.
65. McEwen-Smith, R. M., Salio, M., and Cerundolo, V. (2015) The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity, *Cancer Immunol. Res.*, **3**, 425-435, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0062>.
66. Cortés-Selva, D., Dasgupta, B., Singh, S., and Grewal, I. S. (2021) Innate and innate-like cells: the future of chimeric antigen receptor (CAR) cell therapy, *Trends Pharmacol. Sci.*, **42**, 45-59, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.11.004>.
67. Heczey, A., Liu, D., Tian, G., Courtney, A. N., Wei, J., Marinova, E., Gao, X., Guo, L., Yvon, E., Hicks, J., Liu, H., Dotti, G., and Metelitsa, L. S. (2014) Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy, *Blood*, **124**, 2824-2833, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-541235>.
68. Tian, G., Courtney, A. N., Jena, B., Heczey, A., Liu, D., Marinova, E., Guo, L., Xu, X., Torikai, H., Mo, Q., Dotti, G., Cooper, L. J., and Metelitsa, L. S. (2016) CD62L⁺ NKT cells have prolonged persistence and antitumor activity *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **126**, 2341-2355, <https://doi.org/10.1172/JCI83476>.
69. Simon, B., Wiesinger, M., Marz, J., Wistuba-Hamprecht, K., Weide, B., Schuler-Thurner, B., Schuler, G., Dorrie, J., and Uslu, U. (2018) The generation of CAR-transfected natural killer T cells for the immunotherapy of melanoma, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2365, <https://doi.org/10.3390/ijms19082365>.
70. Shaik, R. S., Rath, P., Courtney, A., Schneller, N., Guo, L., Barragan, G., Zhang, C., Xu, X., Sumazin, P., Metelitsa, L., and Heczey, A. (2022) Glypican-3-specific CAR-NKT cells overexpressing BATF3 mediate potent antitumor activity against hepatocellular carcinoma, *J. Clin. Oncol.*, **40**, e14521-e14521, https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16_suppl.e14521.
71. Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance, *J. Immunol.*, **162**, 5317-5326.
72. Romano, M., Fanelli, G., Albany, C. J., Giganti, G., and Lombardi, G. (2019) Past, Present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity, *Front. Immunol.*, **10**, 43, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00043>.
73. Arjomandnejad, M., Kopec, A. L., and Keeler, A. M. (2022) CAR-T regulatory (CAR-Treg) cells: engineering and applications, *Biomedicines*, **10**, 287, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020287>.
74. Elinav, E., Waks, T., and Eshhar, Z. (2008) Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice, *Gastroenterology*, **134**, 2014-2024, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.060>.
75. Hombach, A. A., Kofler, D., Rappl, G., and Abken, H. (2009) Redirecting human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from the peripheral blood with pre-defined target specificity, *Gene Ther.*, **16**, 1088-1096, <https://doi.org/10.1038/gt.2009.75>.
76. Dawson, N. A. J., Rosado-Sánchez, I., Novakovsky, G. E., Fung, V. C. W., Huang, Q., McIver, E., Sun, G., Gillies, J., Speck, M., Orban, P. C., Mojibian, M., and Levings, M. K. (2020) Functional effects of chimeric antigen receptor co-receptor signaling domains in human regulatory T cells, *Sci. Transl. Med.*, **12**, eaaz3866, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz3866>.
77. Mohseni, Y. R., Saleem, A., Tung, S. L., Dudreuilh, C., Lang, C., Peng, Q., Volpe, A., Adigbli, G., Cross, A., Hester, J., Farzaneh, F., Scotta, C., Lechler, R. I., Issa, F., Fruhwirth, G. O., and Lombardi, G. (2021) Chimeric antigen receptor-modified human regulatory T cells that constitutively express IL-10 maintain their phenotype and are potently suppressive, *Eur. J. Immunol.*, **51**, 2522-2530, <https://doi.org/10.1002/eji.202048934>.
78. Boroughs, A. C., Larson, R. C., Choi, B. D., Bouffard, A. A., Riley, L. S., Schiferle, E., Kulkarni, A. S., Cetrulo, C. L., Ting, D., Blazar, B. R., Demehri, S., and Maus, M. V. (2019) Chimeric antigen receptor costimulation domains modulate human regulatory T cell function, *JCI Insight*, **5**, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126194>.
79. Fu, R. Y., Chen, A. C., Lyle, M. J., Chen, C. Y., Liu, C. L., and Miao, C. H. (2020) CD4⁺ T cells engineered with FVIII-CAR and murine Foxp3 suppress anti-factor VIII immune responses in hemophilia a mice, *Cell Immunol.*, **358**, 104216, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104216>.
80. Arjomandnejad, M., Sylvia, K., Blackwood, M., Nixon, T., Tang, Q., Muhuri, M., Gruntman, A. M., Gao, G., Flotte, T. R., and Keeler, A. M. (2021) Modulating immune responses to AAV by expanded polyclonal T-regs and capsid specific chimeric antigen receptor T-regulatory cells, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, **23**, 490-506, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.10.010>.
81. Rana, J., and Biswas, M. (2020) Regulatory T cell therapy: current and future design perspectives, *Cell Immunol.*, **356**, 104193, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104193>.

82. MacDonald, K. G., Hoeppli, R. E., Huang, Q., Gillies, J., Luciani, D. S., Orban, P. C., Broady, R., and Levings, M. K. (2016) Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor, *J. Clin. Invest.*, **126**, 1413-1424, <https://doi.org/10.1172/JCI82771>.
83. D'Souza, C., Chen, Z., and Corbett, A. J. (2018) Revealing the protective and pathogenic potential of MAIT cells, *Mol. Immunol.*, **103**, 46-54, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.08.022>.
84. Howson, L. J., Salio, M., and Cerundolo, V. (2015) MR1-restricted mucosal-associated invariant T cells and their activation during infectious diseases, *Front. Immunol.*, **6**, 303, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00303>.
85. Le Bourhis, L., Dusseaux, M., Bohineust, A., Bessoles, S., Martin, E., Premel, V., Core, M., Sleurs, D., Serriari, N. E., Treiner, E., Hivroz, C., Sansonetti, P., Gougeon, M. L., Soudais, C., and Lantz, O. (2013) MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells, *PLoS Pathog.*, **9**, e1003681, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003681>.
86. Dogan, M., Karhan, E., Kozhaya, L., Placek, L., Chen, X., Yigit, M., and Unutmaz, D. (2022) Engineering human mucosal associated invariant T (MAIT) cells with chimeric antigen receptors for cancer immunotherapy, *J. Immunol.*, **209**, 1523-1531, <https://doi.org/10.1101/2022.07.28.501764>.
87. Won, E. J., Ju, J. K., Cho, Y. N., Jin, H. M., Park, K. J., Kim, T. J., Kwon, Y.-S., Kee, H. J., Kim, J. C., Kee, S.-J., and Park, Y.-W. (2016) Clinical relevance of circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their anti-cancer activity in patients with mucosal-associated cancer, *Oncotarget*, **7**, 76274-76290, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11187>.
88. Gherardin, N. A., Loh, L., Admojo, L., Davenport, A. J., Richardson, K., Rogers, A., Darcy, P. K., Jenkins, M. R., Prince, H. M., Harrison, S. J., Quach, H., Fairlie, D. P., Kedzierska, K., McCluskey, J., Uldrich, A. P., Neeson, P. J., Ritchie, D. S., and Godfrey, D. I. (2018) Enumeration, functional responses and cytotoxic capacity of MAIT cells in newly diagnosed and relapsed multiple myeloma, *Sci. Rep.*, **8**, 4159, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22130-1>.
89. Reantragoon, R., Boonpattanaporn, N., Corbett, A. J., and McCluskey, J. (2016) Mucosal-associated invariant T cells in clinical diseases, *As. Pac. J. Allergy Immunol.*, **34**, 3-10.
90. Zhang, Z.-X., Yang, L., Young, K. J., Dutemple, B., and Zhang, L. I. (2000) Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression, *Nat. Med.*, **6**, 782-789, <https://doi.org/10.1038/77513>.
91. Wu, Z., Zheng, Y., Sheng, J., Han, Y., Yang, Y., Pan, H., and Yao, J. (2022) CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (Double-Negative) T cells in inflammation, immune disorders and cancer, *Front. Immunol.*, **13**, 816005, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.816005>.
92. Zhang, Z.-X., Yang, L., Young, K. J., and Zhang, L. (2001) Suppression of alloimmune responses *in vitro* and *in vivo* by CD3 CD8 CD4 regulatory T cells, *Transplant. Proc.*, **33**, 84-85, [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(00\)01915-1](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(00)01915-1).
93. Young, K. J., DuTemple, B., Phillips, M. J., and Zhang, L. (2003) Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells, *J. Immunol.*, **171**, 134-141, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.134>.
94. Chen, W., Ford, M. S., Young, K. J., Cybulsky, M. I., and Zhang, L. (2003) Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival, *J. Immunol.*, **170**, 1846-1853, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.1846>.
95. Chen, J., Hu, P., Wu, G., and Zhou, H. (2019) Antipancreatic cancer effect of DNT cells and the underlying mechanism, *Pancreatol.*, **19**, 105-113, <https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.12.006>.
96. Chen, X., Wang, D., and Zhu, X. (2022) Application of double-negative T cells in haematological malignancies: recent progress and future directions, *Biomark. Res.*, **10**, 11, <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00360-w>.
97. Merims, S., Li, X., Joe, B., Dokouhaki, P., Han, M., Childs, R. W., Wang, Z. Y., Gupta, V., Minden, M. D., and Zhang, L. (2011) Anti-leukemia effect of *ex vivo* expanded DNT cells from AML patients: a potential novel autologous T-cell adoptive immunotherapy, *Leukemia*, **25**, 1415-1422, <https://doi.org/10.1038/leu.2011.99>.
98. Lee, J. B., Kang, H., Fang, L., D'Souza, C., Adeyi, O., and Zhang, L. (2019) Developing allogeneic double-negative T cells as a novel off-the-shelf adoptive cellular therapy for cancer, *Clin. Cancer Res.*, **25**, 2241-2253, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2291>.
99. Vasic, D., Lee, J. B., Leung, Y., Khatri, I., Na, Y., Abate-Daga, D., and Zhang, L. (2022) Allogeneic double-negative CAR-T cells inhibit tumor growth without off-tumor toxicities, *Sci. Immunol.*, **7**, eabl3642, <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abl3642>.
100. Gao, X., Mi, Y., Guo, N., Xu, H., Xu, L., Gou, X., and Jin, W. (2017) Cytokine-induced killer cells as pharmacological tools for cancer immunotherapy, *Front. Immunol.*, **8**, 774, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00774>.
101. Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., and Rosenberg, S. A. (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **155**, 1823-1841, <https://doi.org/10.1084/jem.155.6.1823>.
102. Rosenberg, S. A., Spiess, P., and Lafreniere, R. (1986) A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes, *Science*, **233**, 1318-1321, <https://doi.org/10.1126/science.3489291>.

103. Cappuzzello, E., Sommaggio, R., Zanovello, P., and Rosato, A. (2017) Cytokines for the induction of antitumor effectors: the paradigm of cytokine-induced killer (CIK) cells, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **36**, 99-105, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.06.003>.
104. Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., and Raulet, D. H. (2000) Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages, *Nat. Immunol.*, **1**, 119-126, <https://doi.org/10.1038/77793>.
105. Merker, M., Wagner, J., Kreyenberg, H., Heim, C., Moser, L. M., Wels, W. S., Bonig, H., Ivics, Z., Ullrich, E., Klingebiel, T., Bader, P., and Rettinger, E. (2020) ERBB2-CAR-engineered cytokine-induced killer cells exhibit both CAR-mediated and innate immunity against high-risk rhabdomyosarcoma, *Front. Immunol.*, **11**, 581468, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.581468>.
106. Rotolo, R., Leuci, V., Donini, C., Cykowska, A., Gammaitoni, L., Medico, G., Valabrega, G., Aglietta, M., and Sangiolo, D. (2019) CAR-based strategies beyond T lymphocytes: integrative opportunities for cancer adoptive immunotherapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, <https://doi.org/10.3390/ijms20112839>.
107. Marin, V., Dander, E., Biagi, E., Introna, M., Fazio, G., Biondi, A., and D'Amico, G. (2006) Characterization of *in vitro* migratory properties of anti-CD19 chimeric receptor-redirectioned CIK cells for their potential use in B-ALL immunotherapy, *Exp. Hematol.*, **34**, 1219-1229, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.05.004>.
108. Marin, V., Kakuda, H., Dander, E., Imai, C., Campana, D., Biondi, A., and D'Amico, G. (2007) Enhancement of the anti-leukemic activity of cytokine induced killer cells with an anti-CD19 chimeric receptor delivering a 4-1BB-zeta activating signal, *Exp. Hematol.*, **35**, 1388-1397, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.05.018>.
109. Marin, V., Pizzitola, I., Agostoni, V., Attianese, G. M., Finney, H., Lawson, A., Pule, M., Rousseau, R., Biondi, A., and Biagi, E. (2010) Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors, *Haematologica*, **95**, 2144-2152, <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.026310>.
110. Magnani, C. F., Mezzanotte, C., Cappuzzello, C., Bardini, M., Tettamanti, S., Fazio, G., Cooper, L. J. N., Dastoli, G., Cazzaniga, G., Biondi, A., and Biagi, E. (2018) Preclinical efficacy and safety of CD19CAR cytokine-induced killer cells transfected with sleeping beauty transposon for the treatment of acute lymphoblastic leukemia, *Hum. Gene Ther.*, **29**, 602-613, <https://doi.org/10.1089/hum.2017.207>.
111. Jarosz-Biej, M., Kaminska, N., Matuszczak, S., Cichon, T., Pamula-Pilat, J., Czapl, J., Smolarczyk, R., Skwarzynska, D., Kulik, K., and Szala, S. (2018) M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma, *PLoS One*, **13**, e0191012, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191012>.
112. Biglari, A., Southgate, T. D., Fairbairn, L. J., and Gilham, D. E. (2006) Human monocytes expressing a CEA-specific chimeric CD64 receptor specifically target CEA-expressing tumour cells *in vitro* and *in vivo*, *Gene Ther.*, **13**, 602-610, <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302706>.
113. Morrissey, M. A., Williamson, A. P., Steinbach, A. M., Roberts, E. W., Kern, N., Headley, M. B., and Vale, R. D. (2018) Chimeric antigen receptors that trigger phagocytosis, *Elife*, **7**, <https://doi.org/10.7554/eLife.36688>.
114. Klichinsky, M., Ruella, M., Shestova, O., Lu, X. M., Best, A., Zeeman, M., Schmierer, M., Gabrusiewicz, K., Anderson, N. R., Petty, N. E., Cummins, K. D., Shen, F., Shan, X., Veliz, K., Blouch, K., Yashiro-Ohtani, Y., Kenderian, S. S., Kim, M. Y., O'Connor, R. S., Wallace, S. R., Kozlowski, M. S., Marchione, D. M., Shestov, M., Garcia, B. A., June, C. H., and Gill, S. (2020) Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy, *Nat. Biotechnol.*, **38**, 947-953, <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0462-y>.
115. Cannac, M., Nikolic, J., and Benaroch, P. (2022) Cancer immunotherapies based on genetically engineered macrophages, *Cancer Immunol. Res.*, **10**, 1156-1166, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-22-0030>.
116. Zhang, L., Tian, L., Dai, X., Yu, H., Wang, J., Lei, A., Zhu, M., Xu, J., Zhao, W., Zhu, Y., Sun, Z., Zhang, H., Hu, Y., Wang, Y., Xu, Y., Church, G. M., Huang, H., Weng, Q., and Zhang, J. (2020) Pluripotent stem cell-derived CAR-macrophage cells with antigen-dependent anti-cancer cell functions, *J. Hematol. Oncol.*, **13**, 153, <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00983-2>.
117. Hagemann, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K. A., Kulbe, H., Thompson, R. G., Robinson, S. C., and Balkwill, F. R. (2008) "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB, *J. Exp. Med.*, **205**, 1261-1268, <https://doi.org/10.1084/jem.20080108>.
118. Niu, Z., Chen, G., Chang, W., Sun, P., Luo, Z., Zhang, H., Zhi, L., Guo, C., Chen, H., Yin, M., and Zhu, W. (2021) Chimeric antigen receptor-modified macrophages trigger systemic anti-tumour immunity, *J. Pathol.*, **253**, 247-257, <https://doi.org/10.1002/path.5585>.
119. Zhang, W., Liu, L., Su, H., Liu, Q., Shen, J., Dai, H., Zheng, W., Lu, Y., Zhang, W., Bei, Y., and Shen, P. (2019) Chimeric antigen receptor macrophage therapy for breast tumours mediated by targeting the tumour extracellular matrix, *Br. J. Cancer*, **121**, 837-845, <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0578-3>.
120. Williford, J. M., Ishihara, J., Ishihara, A., Mansurov, A., Hosseinchi, P., Marchell, T. M., Potin, L., Swartz, M. A., and Hubbell, J. A. (2019) Recruitment of CD103⁺ dendritic cells via tumor-targeted chemokine

- delivery enhances efficacy of checkpoint inhibitor immunotherapy, *Sci. Adv.*, **5**, 1-15, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay1357>.
121. Maier, B., Leader, A. M., Chen, S. T., Tung, N., Chang, C., LeBerichel, J., Chudnovskiy, A., Maskey, S., Walker, L., Finnigan, J. P., Kirkling, M. E., Reizis, B., Ghosh, S., D'Amore, N. R., Bhardwaj, N., Rothlin, C. V., Wolf, A., Flores, R., Marron, T., Rahman, A. H., Kenigsberg, E., Brown, B. D., and Merad, M. (2020) A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity, *Nature*, **580**, 257-262, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2134-y>.
 122. Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B. U., Unanue, E. R., Diamond, M. S., Schreiber, R. D., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2008) Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α^+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity, *Science*, **322**, 1097-1100, <https://doi.org/10.1126/science.1164206>.
 123. Suh, H. C., Pohl, K. A., Termini, C., Kan, J., Timmerman, J. M., Slamon, D. J., and Chute, J. P. (2018) Bioengineered autologous dendritic cells enhance car t cell cytotoxicity by providing cytokine stimulation and intratumoral dendritic cells, *Blood*, **132**, 3693, <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-115296>.
 124. Zhang, L., Morgan, R. A., Beane, J. D., Zheng, Z., Dudley, M. E., Kassim, S. H., Nahvi, A. V., Ngo, L. T., Sherry, R. M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Feldman, S. A., Toomey, M. A., Kerkar, S. P., Restifo, N. P., Yang, J. C., and Rosenberg, S. A. (2015) Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 2278-2288, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2085>.
 125. Ruella, M., Xu, J., Barrett, D. M., Fraietta, J. A., Reich, T. J., Ambrose, D. E., Klichinsky, M., Shestova, O., Patel, P. R., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Bhoj, V. G., Orlando, E. J., Fry, T. J., Bitter, H., Maude, S. L., Levine, B. L., Nobles, C. L., Bushman, F. D., Young, R. M., Scholler, J., Gill, S. I., June, C. H., Grupp, S. A., Lacey, S. F., and Melenhorst, J. J. (2018) Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell, *Nat. Med.*, **24**, 1499-1503, <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0201-9>.
 126. Pesch, T., Bonati, L., Kelton, W., Parola, C., Ehling, R. A., Csepregi, L., Kitamura, D., and Reddy, S. T. (2019) Molecular design, optimization, and genomic integration of chimeric B cell receptors in murine B cells, *Front. Immunol.*, **10**, 2630, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02630>.
 127. Neelapu, S. S., Locke, F. L., Bartlett, N. L., Lekakis, L. J., Miklos, D. B., Jacobson, C. A., Braunschweig, I., Oluwole, O. O., Siddiqi, T., Lin, Y., Timmerman, J. M., Stiff, P. J., Friedberg, J. W., Flinn, I. W., Goy, A., Hill, B. T., Smith, M. R., Deol, A., Farooq, U., McSweeney, P., Munoz, J., Avivi, I., Castro, J. E., Westin, J. R., Chavez, J. C., Ghobadi, A., Komanduri, K. V., Levy, R., Jacobsen, E. D., Witzig, T. E., Reagan, P., Bot, A., Rossi, J., Navale, L., Jiang, Y., Aycock, J., Elias, M., Chang, D., Wiecek, J., and Go, W. Y. (2017) Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 2531-2544, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707447>.
 128. Schuster, S. J., Svoboda, J., Chong, E. A., Nasta, S. D., Mato, A. R., Anak, O., Brogdon, J. L., Pruteanu-Malinici, I., Bhoj, V., Landsburg, D., Wasik, M., Levine, B. L., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Porter, D. L., and June, C. H. (2017) Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 2545-2554, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708566>.
 129. Imura, Y., Ando, M., Kondo, T., Ito, M., and Yoshimura, A. (2020) CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD, *JCI Insight*, **5**, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.136185>.
 130. Raje, N., Berdeja, J., Lin, Y., Siegel, D., Jagannath, S., Madduri, D., Liedtke, M., Rosenblatt, J., Maus, M. V., Turka, A., Lam, L. P., Morgan, R. A., Friedman, K., Massaro, M., Wang, J., Russotti, G., Yang, Z., Campbell, T., Hege, K., Petrocca, F., Quigley, M. T., Munshi, N., and Kochenderfer, J. N. (2019) Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma, *N. Engl. J. Med.*, **380**, 1726-1737, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817226>.
 131. Berdeja, J. G., Madduri, D., Usmani, S. Z., Jakubowiak, A., Agha, M., Cohen, A. D., Stewart, A. K., Hari, P., Htut, M., Lesokhin, A., Deol, A., Munshi, N. C., O'Donnell, E., Avigan, D., Singh, I., Zudaire, E., Yeh, T. M., Allred, A. J., Olyslager, Y., Banerjee, A., Jackson, C. C., Goldberg, J. D., Schechter, J. M., Deraed, W., Zhuang, S. H., Infante, J., Geng, D., Wu, X., Carrasco-Alfonso, M. J., Akram, M., Hossain, F., Rizvi, S., Fan, F., Lin, Y., Martin, T., and Jagannath, S. (2021) Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study, *Lancet*, **398**, 314-324, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00933-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00933-8).
 132. Wang, X., Jasinski, D. L., Medina, J. L., Spencer, D. M., Foster, A. E., and Bayle, J. H. (2020) Inducible MyD88/CD40 synergizes with IL-15 to enhance antitumor efficacy of CAR-NK cells, *Blood Adv.*, **4**, 1950-1964, <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001510>.
 133. Shin, M. H., Oh, E., Kim, Y., Nam, D. H., Jeon, S. Y., Yu, J. H., and Minn, D. (2023) Recent advances in CAR-based solid tumor immunotherapy, *Cells*, **12**, 1606, <https://doi.org/10.3390/cells12121606>.

CAR BEYOND THE CLASSICAL CAR-T: FUNCTIONAL FEATURES AND APPLICATION PROSPECTS

Review

E. P. Minina, D. V. Dianov, S. A. Sheetikov, and A. V. Bogolyubova*

*National Research Center for Hematology,
125167 Moscow, Russia; e-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com*

Chimeric Antigen Receptor (CAR) is a genetically engineered receptor that recognizes an antigen and subsequently activates a signaling cascade in a cell. Antigen recognition and signal transduction are carried out by different CAR domains derived from different proteins; thus, CAR has a mixed domain composition. Cytotoxic T cells expressing CAR recognizing tumor-associated antigens led to development of CAR-T, a novel approach in the therapy of malignant diseases. Despite the high efficacy of CAR-T in hematological malignancies, this approach has several disadvantages that could be overcome by using leucocytes from other groups as effector cells. Currently, many cells of both innate and adaptive immunity have been shown to express CAR, leading to the development or enhancement of their cytotoxic properties. In this review, we discuss the peculiarities of CAR function in different types of immune cells will be covered. In particular, we focus on the results of pre-clinical and clinical research on the efficacy and safety of non-conventional CAR-expressing cells.

Keywords: chimeric antigen receptor, immunotherapy, cell therapy, CAR, CAR-T, CAR-NK

ПЕПТИДНЫЕ БЛОКАТОРЫ ИНДУЦИРОВАННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ: ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Обзор

© 2024 В.Ю. Тощакон

АНОО ВО «Научно-технологический университет Сириус»,
354340 г.мт Сириус, Краснодарский край, Россия: электронная почта: toschakov.vy@talantiuspeh.ru

Поступила в редакцию 05.01.2024

После доработки 29.02.2024

Принята к публикации 12.03.2024

Образование транзиторных белковых комплексов в ответ на активацию клеточных рецепторов является общим механизмом ответа клетки на внешние стимулы. В настоящем обзоре представлена концепция блокировки взаимодействий сигнальных белков пептидными блокаторами, а также описаны имеющиеся к настоящему времени достижения в разработке ингибиторов передачи сигнала, блокирующих сигнал-зависимые белковые взаимодействия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Толл-подобные рецепторы, TIR-домены, сигнальные комплексы, пептидные блокаторы белковых взаимодействий.

DOI: 10.31857/S0320972524050025 EDN: YPFIEI

ВВЕДЕНИЕ

Формирование многокомпонентных структурированных белковых комплексов в ответ на активацию клеточных рецепторов является общим механизмом трансляции клеткой экзогенных сигналов в биологически значимый ответ. Принципы функционирования таких комплексов, часто называемых сигнальными, были концептуально сформулированы ещё к концу прошлого–началу этого века [1, 2]. Существующее концептуальное понимание было дополнено достигнутыми в последние два десятилетия успехами структурной биологии, выявившими тонкую структуру многих олигомерных комплексов, состоящих из сигнальных белков или из их отдельных доменов, с разрешением, достаточным для визуализации положения отдельных атомов [3]. Эти знания существенно рас-

ширили понимание механизмов сборки сигнальных комплексов и их функционирования. Вместе с тем признаётся, что накопленные к настоящему времени сведения в значительной степени фрагментарны и не отражают динамики существования реальных комплексов. Также, поскольку большинство комплексов разрешено с использованием рекомбинантных методов, существует проблема верификации физиологически значимых структур.

Образование сигнальных комплексов в подавляющем большинстве случаев осуществляется специализированными белковыми доменами, зачастую называемыми доменами взаимодействия белков (ДВБ) [2, 4]. Некоторые ДВБ, такие как SH2, SH3 или бромодомены, распознают специфические характеристические особенности или короткие мотивы, присутствующие в первичной структуре

Принятые сокращения: АМП – антимикробный пептид; БП – блокирующий пептид; ВВ-петля – петля между вторым тяжом и второй α -спиралью; ДВБ – домен взаимодействия белков; ДС – домен (клеточной) смерти; ПП – проникающий пептид; ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; IL – интерлейкин; IL-1R – рецептор интерлейкина 1; LPS – липополисахарид; MAP – митоген-активируемая протеинкиназа; MyD88 – Myeloid differentiation primary response protein 88; TIR – домен гомологии Толл-белка насекомых, IL-1R человека и белков устойчивости растений; TIRAP – TIR-containing adapter protein, также называемый Mal; TLR – Толл-подобный рецептор; TNF – фактор некроза опухолей; TRAM – TRIF-related adapter molecule, также известный под наименованием TICAM-2; TRIF – TIR domain-containing adapter inducing IFN- β , также называемый TICAM-1.

белков; тогда как домены другого типа, примерами которых являются TIR-домены (домены гомологии Толл-белка насекомых, IL-1R человека и белков устойчивости растений) или домены смерти (ДС), не имеют специфического мотива связывания. ДВБ последнего типа характеризуются способностью одновременно устанавливать множественные кооперативные взаимодействия с доменами своего типа как гомо-, так и гетеротипически [5, 6]. Опубликованные к настоящему времени структуры сигнальных комплексов демонстрируют как их широчайшее топологическое разнообразие, так и фактическую уникальность сайтов, осуществляющих индивидуальные бинарные взаимодействия компонентов внутри олигомерных комплексов [3]. Структурное разнообразие сигнальных комплексов включает в себя как линейные двуцепочечные комплексы, образуемые TIR-доменами активированных Толл-подобных рецепторов (TLR) и их адаптерных белков, а также рецепторами семейства рецептора интерлейкина 1 (IL-1R) [7, 8], так и спиральные комплексы различной структуры. Имеющиеся к настоящему времени примеры топологий спиральных комплексов включают в себя как одно-, так и двуцепочечные спирали и представлены такими комплексами, как Myddosome [9], PIDDosome [10], MDA5-MAVS [11], инфламасомы [12–14] и другие [3, 15, 16].

Сигнальные пути клеток являются важнейшей фармакологической мишенью. Этот тезис, в частности, подтверждается достигнутым в последние 25 лет клиническим успехом терапевтических антител, направленных как на блокировку активирующих сигнальные пути клеточных рецепторов, так и на блокировку цитокинов, функционально являющихся циркулирующими активаторами регулирующих иммунный ответ рецепторов [17–19]. Другим указанием на важность сигнальных путей как фармакологической мишени является то, что малые молекулы, блокирующие сайты связывания лиганда рецепторами, сопряжёнными с G-белком, составляют значительную часть имеющегося пула лекарственных средств [20–23]. Ввиду того, что малые молекулы оказались не столь эффективными для блокады рецепторов, активируемых макромолекулами (такими как цитокины или экзогенные молекулы патогенов), а также того, что многие сигнальные пути не имеют свободно циркулирующих агонистов, блокировка сигнальных путей посредством нарушения сборки сигнальных комплексов представляется перспективным подходом к созданию новых фармакологических препаратов. Однако следует отметить, что практический успех в создании лекарственных препаратов с таким механизмом действия к настоящему времени ограничен. Вместе с тем значительный пласт экспериментальных данных, полученных как *in vitro*

с использованием культивируемых клеток, так и на различных моделях *in vivo*, указывает на то, что направленная разработка ингибиторов передачи сигнала с активированных рецепторов посредством блокировки сборки сигнальных комплексов возможна. Поскольку сборка сигнальных комплексов в большинстве случаев осуществляется за счёт взаимодействий ДВБ [2], ДВБ и белковые взаимодействия, осуществляемые за счёт ДВБ, являются наиболее частой мишенью ингибиторов, разработанных к настоящему времени. В настоящем обзоре мы рассмотрим имеющиеся достижения в разработке ингибиторов сборки сигнальных комплексов, а также оценим перспективы и сложности создания фармакологических агентов на основе таких ингибиторов.

КОНЦЕПЦИЯ ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРОВ ТРАНЗИТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Многочисленные примеры (многие из которых будут рассмотрены ниже) показывают, что относительно короткие пептиды, соответствующие линейному фрагменту первичной белковой последовательности, формирующему сайт функционально значимого белок-белкового взаимодействия, способны блокировать функцию белка-прототипа. Механизм действия таких пептидов, зачастую называемых блокирующими пептидами (БП) или пептидами-приманками (от английского decoy peptides), заключается в том, что блокирующий пептид связывает и блокирует сайты взаимодействия белка-прототипа с белками-партнёрами, таким образом предотвращая формирование функционально значимого комплекса и, как следствие, ингибируя подлежащую функцию (рис. 1). Поскольку сборка сигнальных комплексов является внутриклеточным процессом, помимо сегмента, имитирующего сайт связывания на белке-прототипе, функциональный блокатор сборки сигнального комплекса должен содержать сегмент, обеспечивающий проникновение всей конструкции в клетку. В качестве агента, обеспечивающего трансмембранный перенос блокатора, наиболее часто используются пептидные векторы, взятые либо из натуральных белков, обладающих способностью проникать через плазматические мембраны клеток, либо искусственно созданные аминокислотные последовательности. Пептидные блокаторы взаимодействий, осуществляемых цитоплазматическими белками, таким образом, состоят из двух функциональных частей: специфической части, обеспечивающей связывание с белками-мишенями, и пептидного вектора, необходимого для проникновения всей конструкции в клетку.

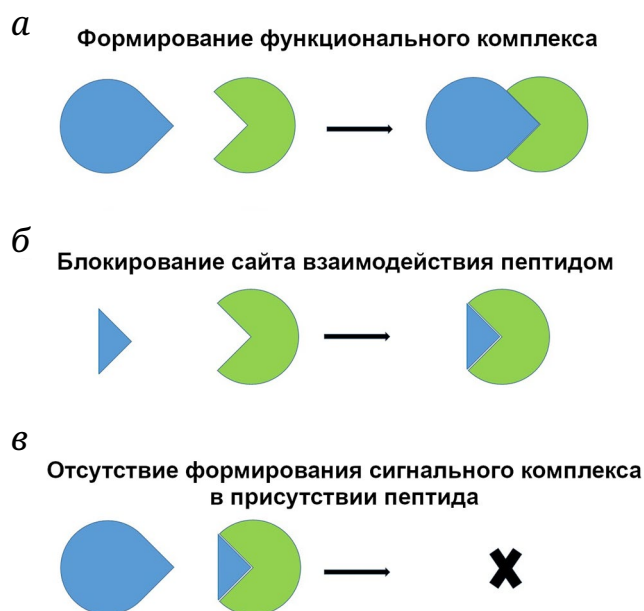


Рис. 1. Механизм действия блокирующих пептидов – предотвращение формирования белкового комплекса за счёт конкуренции с белком-прототипом за функциональный сайт связывания. *а* – Взаимодействие ДВБ1 (голубая фигура) и ДВБ2 (зелёный сектор) приводит к формированию функционального бинарного комплекса. *б* – Пептид, соответствующий сайту связывания ДВБ1 с ДВБ2, (голубой треугольник) сохраняет способность связываться с ДВБ2. *в* – Связывание пептида с ДВБ2 предотвращает формирование комплекса ДВБ1–ДВБ2

Ниже мы рассмотрим типичные характеристики этих двух частей отдельно.

Дизайн мишень-связывающего сегмента блокирующих пептидов. Функциональное назначение этой части пептида – блокировка сайтов связывания белка-прототипа партнёрами по взаимодействию и, как следствие, предотвращение формирования сигнального комплекса (рис. 1). В случаях, когда сайт взаимодействия белка известен, дизайн прототипа блокирующего пептида представляется очевидным. Однако следует отметить, что, как показывают результаты скрининга библиотек пептидов, значительная часть пептидов, соответствующих сайту связывания, может не проявлять ингибирующей активности в тестах на культуре клеток или *in vivo* [24–26]. Наиболее частыми причинами отсутствия функциональной активности в таких случаях оказываются такие факторы, как неспецифическое связывание пептида компонентами протеома клетки, недостаточная растворимость пептида, негативное влияние мишень-связывающей части на проницаемость пептида, биологическая нестабильность пептида и другие факторы [27]. В случаях, когда границы сайтов взаимодействия не известны точно, ингибирующие последовательности определяются путём

скрининга библиотек пептидов или же подбираются эмпирически [5, 26, 28]. При эмпирическом выборе блокирующего сегмента или при дизайне библиотеки пептидов следует учитывать типичные размеры сайтов, осуществляющих транзиторные взаимодействия сигнальных белков. Общие характеристики сайтов взаимодействий белков достаточно хорошо изучены и описаны в серии исследований [29–32]. Анализ известных структур сигнальных комплексов, образованных ДВБ, подтверждает общие закономерности и уточняет, что площадь бинарных взаимодействий в таких комплексах находится в нижней половине диапазона размеров сайтов взаимодействия белков в транзиторных комплексах и составляет 250–800 Å² [7–9, 33]. Принимая во внимание то, что циркулярность сайтов взаимодействия глобулярных белков высока и составляет в среднем 0,7 [29], верхняя оценка размера условного сайта бинарного взаимодействия в сигнальном комплексе соответствует кругу диаметром ~30 Å. Альфа- или 3₁₀-спирали такой протяжённости соответствовали бы пептиду, состоящему из 20 или 15 а.о., тогда как пептид такой же длины в конформации тяжёлый β-листа состоял бы из 8–9 а.о. [34]. Следует отметить, что эти упрощённые оценки достаточно точно описывают диапазон размеров мишень-связывающего сегмента экспериментально подтверждённых блокирующих пептидов [26, 27].

Векторы, обеспечивающие внутриклеточную проницаемость блокирующих пептидов. Наиболее часто используемыми векторами для переноса БП внутрь клеток являются пептидные векторы. Основа для использования пептидных векторов для транспорта макромолекул через плазматическую мембрану клеток была заложена во второй половине 80-х гг. прошлого века открытием естественной способности транскриптора транскрипции (Tat), белка, кодируемого вирусом иммунодефицита человека, проникать через плазматические мембраны [35, 36]. Вслед за этим открытием аналогичная способность проникать через клеточные мембраны была обнаружена у белка мушек дрозофил Antennapedia homeodomain (Antp) [37]. Вскоре было показано, что проникающая способность Antp обеспечивается за счёт присутствия относительно короткого сегмента первичной последовательности (16 а.о.), формирующего третью α-спираль этого белка [38]. Позднее функционально аналогичные короткие последовательности (будем называть их проникающие пептиды (ПП)) были обнаружены в Tat и других белках, способных проникать через клеточные мембраны [39–42]. В настоящее время насчитывают более 1000 известных ПП различных классов [43, 44]. Помимо ПП, обнаруженных в природных белках, известны и искусственно

созданные ПП [40, 42, 45]. На основании различий в физико-химических свойствах выделяют следующие классы ПП: катионные, гидрофобные, а также амфипатические, включающие в себя как катионные, так и гидрофобные участки [45]. Примерами катионных пептидов являются проникающие последовательности белков Tat (RKKRRQRRR), Antp (RQIKIWFQNRRMKWKK), а также других членов семейства, способных к интернализации транскрипционных факторов, содержащих гомеодомен [42, 46]. К этой же группе относятся и некоторые искусственные последовательности, такие как олигоаргинины или олиголизины [45, 47]. Примером амфипатического ПП является транспортан, искусственно созданная комбинация двух фрагментов природных белков [48]. Гидрофобные ПП встречаются реже, и они менее чувствительны к аминокислотным заменам [45]. Отмечалась меньшая эффективность гидрофобных ПП по сравнению с ПП других классов.

Механизмы интернализации ПП по-прежнему остаются предметом дискуссий в литературе [42, 49]. Общеизвестным является то, что ПП интернализируются посредством как эндоцитоза с последующим выходом из эндосом, так и прямого взаимодействия с плазматической мембраной, причём отдельные ПП могут использовать множественные механизмы проникновения, важность отдельных из которых различается как для индивидуальных пептидов, так и для клеточных линий. Вместе с тем ПП не используют специальных белковых переносчиков для проникновения в клетку, чем объясняется универсальность их действия в отношении клеток различных типов. Длина использовавшихся ПП варьирует в диапазоне 5–30 а.о. Помимо белков и пептидов, ПП способны переносить внутрь клеток макромолекулярные соединения различной природы, включая нуклеиновые кислоты, медицинские препараты и контрастные вещества, а также сложные молекулярные структуры, такие как липосомы или наночастицы [45, 49, 50]. Пептидные векторы эффективны для внутриклеточного транспорта различных веществ не только в монослой культивируемых клеток. Многочисленные исследования показывают, что ПП также повышают тканевую проницаемость, включая проницаемость через гематоэнцефалический барьер. Так, уже в ранней работе Schwarze et al. [51] было показано, что Tat-пептид обеспечивает проникновение введённой интраперитонеально β -галактозидазы, белка размером 120 кДа, во все ткани мышей, включая мозг. Результаты последующих работ подтвердили эффективность ПП для внутриклеточного транспорта карго различной природы *in vivo*, а также показали широкое распределение по органам как при интраперитонеальном, так и при внутривенном

введении [52–55]. Вместе с тем отмечалось преимущественное накопление ПП в печени и почках, тогда как накопление в мозге и мышцах было существенно меньше [53, 54].

Отметим, что типичные рабочие концентрации ПП при применении в культуре клеток находятся в достаточно узком диапазоне, варьируя от 1–5 мкМ до 50–100 мкМ, для широкого спектра ПП, транспортируемых агентов, а также клеточных линий [26]. Наиболее вероятной причиной существования нижнего предела эффективных концентраций является низкая эффективность транспорта при меньших концентрациях ПП. Подтверждением такого обоснования являются наблюдения значительно более высокого сродства блокирующих пептидов к их белку-мишени *in vitro* по сравнению с эффективной концентрацией в культуре клеток. В качестве примера можно привести TLR-блокирующий пептид 2R9, константа связывания которого с мишенью, TIR-доменом адаптерного белка TIRAP, составляла ~40 нМ, тогда как эффективная концентрация в культуре макрофагов была примерно в 500 раз выше [56]. Существование верхнего предела используемых на клетках концентраций ПП обусловлено цитотоксичностью, зачастую наблюдаемой при использовании БП в концентрациях, превышающих 100 мкМ, что связано с их мембранотропным действием и способностью формировать мембранные поры при высоких концентрациях.

Другим проявлением мембранотропных свойств ПП являются антимикробные свойства, основывающиеся на сходстве их физико-химических свойств со свойствами так называемых «антимикробных пептидов» [57, 58]. Антимикробными пептидами (АМП) называют природные пептиды, кодируемые геномами как растений, так и животных как элемент системы противомикробной защиты, эффективный против патогенов различных классов, включая бактерии, вирусы и грибы [59]. Оба класса пептидов, как ПП, так и АМП, в основном представлены катионными пептидами, включающими в себя значительную долю гидрофобных аминокислотных остатков [57, 60, 61]. И хотя механизмы бактерицидного действия АМП, вероятно, множественны, как ПП, так и АМП проявляют меньшую цитотоксичность в отношении животных клеток по сравнению с активностью в отношении прокариот.

Несмотря на огромный прогресс в открытии новых ПП, наиболее часто используемыми векторами остаются 2 ПП, открытые первыми: Tat-пептид и вектор из Antp, часто называемый в литературе пенетратин. Следует отметить, что относительная эффективность этих векторов варьирует в различных системах и зависит от клеточной модели и природы молекулярной мишени:

в одних системах Tat оказывается более эффективным, в других – более эффективен пенетратин. Однозначное и верифицируемое объяснение данного наблюдения в литературе отсутствует, и первичный выбор ПП осуществляется исследователями эмпирически. Одним из удобств использования пенетратина является простота квантификации содержащих его БП. Пенетратин содержит аминокислотные остатки триптофана, соответственно его концентрацию можно определять спектрофотометрически, тогда как такая возможность для БП, содержащих Tat, зависит от присутствия поглощающих ароматических аминокислотных остатков в блокирующей части пептида. Следует отметить, что природные последовательности, обеспечивающие проникновение белков в клетку, в высокой степени эволюционно сохранены. Так, проникающая последовательность белка дрожжевой дрожжи Antp на 100% сохранена в гомологичном белке человека [62]. Высокая степень эволюционной сохранности проникающих последовательностей отражает их биологическую значимость для функции белков-носителей.

В заключение этого раздела статьи отметим, что концепция блокирующих пептидов основывается на часто наблюдаемой способности пептидов, соответствующих отрезку первичной последовательности белка, формирующему сайт (или значительную часть сайта) функционального белок-белкового взаимодействия, связывать белок-партнёр по взаимодействию и тем самым блокировать функцию белка-прототипа. Концепция БП применима к внутриклеточным мишеням за счёт использования пептидных векторов, способных осуществлять перенос специфической блокирующей части пептида внутрь клеток. Наибольшее число имеющихся на настоящее время успешных примеров применения БП относится к блокировке взаимодействий, осуществляемых ДВБ, белковыми доменами, специализирующимися на осуществлении сигнал-зависимых белковых взаимодействий.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЛОКИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ

Первые успешные попытки модулировать биологические функции с помощью синтетических БП можно отнести к 90-м гг. прошлого века. Мишенью первых экспериментальных работ были внеклеточные взаимодействия белков. Так, различные варианты пептидов, содержащих связывающий интегрин мотив (RGD), использовались в качестве агентов для блокировки клеточной адгезии в попытках разработки инновационных медицинских препаратов [63]. Другим ранним примером реализации концепции блокирова-

ния функциональных белковых взаимодействий является ингибирование протеинкиназы Akt пептидами-псевдосубстратами, а также пептидом, содержащим тяж β A взаимодействующего с Akt белка TCL1 [64, 65]. Применение пептидных векторов, обеспечивающих проникновение в клетку, в сочетании с сегментом, обеспечивающим связывание мишени, существенно расширило область применения методологии блокирующих пептидов. Так, пептиды, блокирующие олигомеризацию NEMO (nuclear factor kappa-B (NF- κ B) essential modulator), а также пептиды, соответствующие NEMO-связывающему домену IKK, ингибировали активацию NF- κ B, индуцированную фактором некроза опухолей (TNF) или липополисахаридом (LPS) [66–68]. В исследовании Borsello et al. [69] использовался пептид (10 а.о.), состоящий из последовательности белка Tat вируса иммунодефицита человека в сочетании с JNK-связывающим мотивом белка (20 а.о.), взаимодействующего с JNK 1 (JNK interacting protein 1). Интересно, что как L-, так и D-изомеры этого пептида блокировали киназную активность JNK и оказывали нейропротекторное действие в моделях ишемии мозга [69]. Другим примером белкового сегмента, блокирующего активность митоген-активируемых протеинкиназ (MAP), является участок последовательности киназы MEK1 (13 а.о.), который эффективно ингибировал активность киназ ERK [70]. Примером успешной реализации концепции блокирующих пептидов в отношении рецепторов, сопряжённых с G-белком, является пептид, включающий C-концевой сегмент белка G α_s в связке с пенетратинном. Этот пептид специфически ингибировал продукцию cAMP, стимулированную агонистами адренорецепторов [71].

Значительное количество исследований было посвящено разработке ингибиторов TLR. Horng et al. [72] были первыми, кто использовал синтетические проникающие пептиды для ингибирования TLR. Авторы показали, что пептид, состоящий из BB-петли (петля между вторым тяжом и второй α -спиралью) TIR-домена адаптерного белка TIRAP в связке с пенетратинном, блокирует индуцированную LPS активацию NF- κ B и MAP-киназ в макрофагальной линии клеток. Этот пептид, однако, не проявлял подобной активности при стимуляции клеток агонистом TLR9 или IL-1 [72]. TIRAP-пептид также селективно блокировал TLR4-зависимую продукцию цитокинов и созревание дендритных клеток [72]. В другом исследовании сравнивались эффекты аналогичных пептидов, блокирующие части которых состояли из гомологичной BB-петли TIR-доменов всех известных адаптерных белков, участвующих в передаче сигнала с TLR [73]. Это и другие исследования показали, что пептиды, включающие в себя

петлю BB TIR-домена адаптерных белков MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88), TRIF (TIR domain-containing adapter inducing IFN- β , также называемый TICAM-1) и TRAM (TRIF-related adapter molecule, также называемый TICAM-2), также обладают ингибиторным действием, в значительной степени подавляя сигнальную функцию TLR [41, 73–76]. Вместе с тем отмечались различия в эффективности отдельных адаптерных пептидов и сообщалось, что ингибиторное действие пептида, содержащего последовательность адаптерного белка TRAM, было наиболее выражено [73]. Пептидомиметик, имитирующий центральную часть БП, происходящего из BB-петли TRAM [55, 73], оказывал кардиопротекторное действие в мышинной модели инфаркта миокарда, что интерпретировалось авторами как проявление ингибирования TLR4-зависимого воспаления [77]. В последующем исследовании та же группа авторов подтвердила, что димерный пептидомиметик, имитирующий BB-петлю TRAM, дозозависимым образом ингибирует индуцированную LPS транскрипцию IFN- β и CXCL10 [78]. Вместе с тем отмечалась неполная специфичность действия этого агента, поскольку также ингибировалась продукция IFN- β , индуцированная агонистами TLR8 и MDA5/RIG-I [78]. Пептиды, соответствующие BB-петле рецепторов TLR2 и TLR4, аналогичные по дизайну адаптерным BB-пептидам, также блокировали активность рецепторов-прототипов и проявляли кросс-реактивность, тогда как пептид, содержащий гомологичную последовательность из TLR1 или TLR6 (эти белки не индуцируют сигналинг самостоятельно, а только при гетеродимеризации с TLR2), не обладал биологической активностью [79].

Следующим этапом в развитии методологии блокирующих пептидов стало использование скрининга библиотек пептидов, соответствующих вероятным сайтам взаимодействия доменов взаимодействия белков. Основой для этого подхода послужило возникшее понимание множественности функциональных сайтов взаимодействия, присутствующих на ДВБ, вместе с отсутствием точной информации о локализации таких сайтов. Первой работой, в которой были представлены результаты скрининга библиотеки пептидов, полно представляющих поверхность ДВБ, стал скрининг пептидов TIR-домена TLR4 [5]. Библиотека состояла из 11 пептидов, блокирующая часть каждого из которых состояла из сегмента первичной последовательности TIR-домена TLR4, представляющего нефрагментированную часть поверхности домена. В качестве проникающей последовательности использовался пенетратин. Результаты работы валидировали предложенный подход, косвенно подтвердив предположение о множественности сайтов взаимо-

действия, присутствующих на TIR-доменах. Было идентифицировано 5 пептидов, проявлявших ингибирующее действие в отношении индуцированной LPS активации MAP-киназ и факторов транскрипции, а также экспрессии цитокинов [5]. Ингибирующее действие проявляли пептиды, соответствующие участку, соединяющему TIR-домен с трансмембранным участком TLR, петлям AB и BB, а также α -спиралям B и D (рис. 2, а и б) [5]. В последующей работе авторы проскринировали аналогичным образом созданную библиотеку пептидов адаптерного белка TIRAP [80]. Скрининг выявил 5 активных пептидов, происходящих из следующих структурных элементов TIR-домена: петля AB, а также α -спирали B, C, D и E [80]. Интересно, что активность использовавшегося в этой работе пептида, представляющего петлю BB (пептид TR4), но не включающего лишь один аминокислотный остаток ранее использовавшегося TIRAP BB-пептида [72], была существенно меньше. В последующих работах были скринированы библиотеки TIR-доменов адаптерных белков MyD88-независимого пути, TRAM и TRIF [55, 81]. В обеих библиотеках было обнаружено по 2 активных пептида. В дополнение к ранее обнаруженным пептидам, происходящим из петли BB обоих адаптерных белков [73], ингибирующей активностью обладали пептид TM6 из третьей спирали TRAM и пептид TF5 из второй спирали TRIF [55, 81]. Используя делеционный анализ, авторы идентифицировали транкированные варианты (9 а.о.) блокирующих пептидов TM6- Δ C и TF5- Δ C, которые практически полностью сохраняли ингибиторную активность своих прототипов. Проведенные в последующих работах скрининги пептидных библиотек TIR-доменов рецепторов TLR2, корецепторов TLR2 (TLR1 и TLR6), а также TLR9, TLR7 и TLR5 выявили дополнительные ингибиторные последовательности в каждой из библиотек [25, 26, 56, 82, 83]. На основании анализа взаимного расположения сегментов, представляющих активные БП на поверхности TIR-доменов, было предложено, что активные пептиды происходят из 4-х топологически сохранных сайтов TIR-TIR-взаимодействий, ответственных за сборку сигнальных комплексов активированными TLR (рис. 2) [26, 83–85]. Два сайта (S1 и S4) расположены на противоположных сторонах TIR-домена в районах краевых тяжей β -листа. В дополнение к аминокислотным остаткам, формирующим тяж B, сайт S1 может быть представлен сегментами петель AB и/или BB, а также (в случае рецепторов TLR2, TLR4 и TLR7) сегментом, соединяющим TIR с трансмембранной спиралью [5, 24, 26]. Сайт S4 представлен пептидами, соответствующими тяжу E, а также прилегающей к тяжу E α -спиралью E [24–26]. Сайты S2 и S3 образованы тремя спиральными участками, прилегающими к β -листу

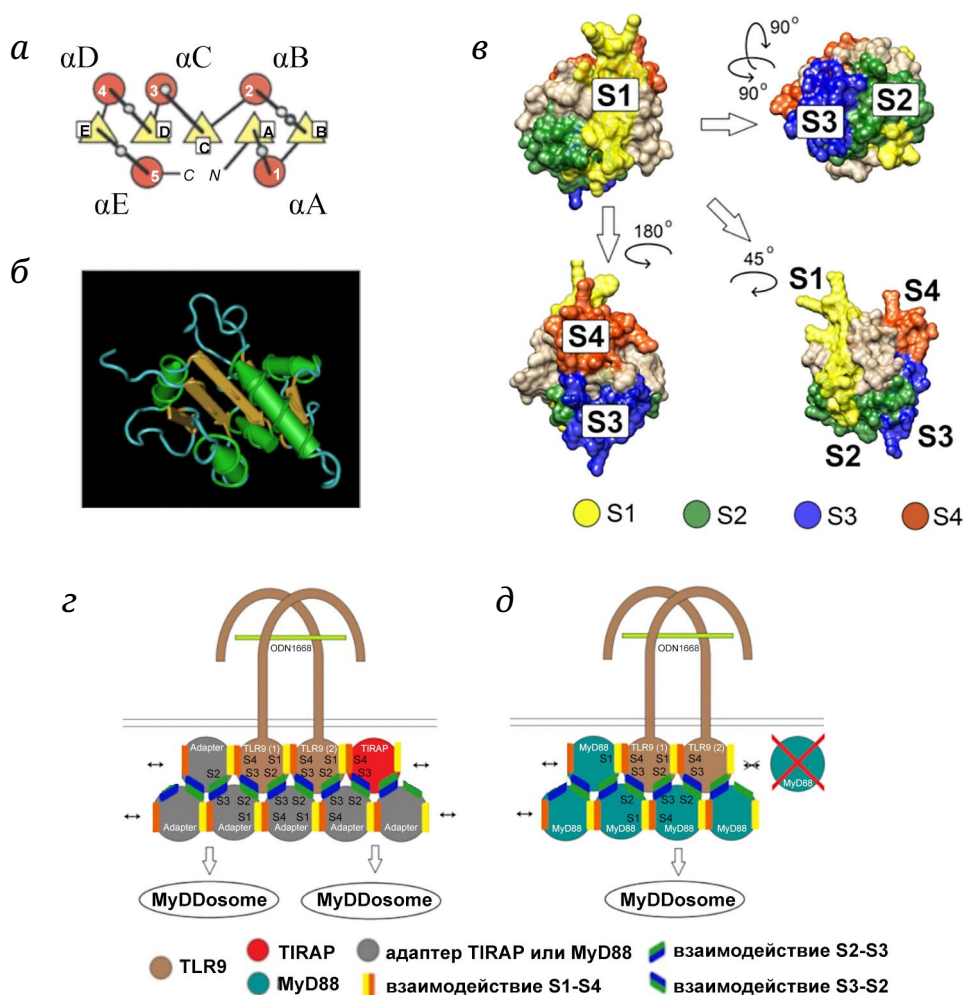


Рис. 2. Структура TIR-доменов, позиции участков, соответствующих ингибиторным БП, и предполагаемая архитектура комплексов, образуемых TIR-доменами при активации TLR. *а* – Схема, показывающая вторичную структуру TIR-доменов [84]. TIR-Домены принадлежат к классу α/β белковых доменов, вторичная структура которых образована β -тяжами, чередующимися с α -спиральными участками [84]. Согласно наиболее часто используемой номенклатуре, элементы вторичной структуры TIR-доменов обозначаются в алфавитном порядке, начиная с N-конца. Например, βA и βE (показаны на панели (а) треугольниками) обозначают первый и пятый тяжи, а αB и αD – вторую и четвертую спирали (показаны на схеме коричневыми кружками). Петли обозначаются двумя заглавными буквами соответственно элементам, которые они соединяют. Например, петля BB соединяет второй тяж со второй спиралью, а петля DE – четвертую спираль с пятым тяжом. *б* – Третичная структура TIR-домена TLR2 человека [85]. Типичный TIR-домен включает в себя 5 тяжей, уложенных в параллельный β -лист, формирующий сердцевину домена. α -Спирали располагаются по обе стороны листа – первая и последняя располагаются с вогнутой стороны листа; вторая, третья и четвертая располагаются на его выпуклой стороне. *в* – 4 сайта связывания TIR-доменов, осуществляющие димеризацию TIR-доменов рецепторов и рекрутирование адаптерных белков, обозначены на рисунке как S1–S4. Сайты S1 и S4 расположены на противоположных концах TIR-домена, в районах краевых тяжей β -листа. Сайты S2 и S3 располагаются в одной полусфере. Сайт S2 формируется спиралями B и/или C; сайт S3 – спиралью D вместе с прилегающими петлями [26, 83]. *з* – Схема взаимодействия TIR-доменов в формирующемся сигнальном комплексе при активации TLR9 в присутствии обоих адаптеров MyD88-зависимого пути, TIRAP и MyD88. Сайты S1 и S4, реципрокно взаимодействуя, образуют связи внутри каждой из цепей двуцепочечной структуры комплекса, тогда как сайты S2 и S3 формируют межцепочечные связи [83]. *д* – Схема взаимодействия TIR-доменов в сигнальном комплексе при активации TLR9 при отсутствии TIRAP [83]

с его выпуклой стороны: спиралями B, C и D. Спираль B и/или C образуют сайт S2; спираль D – сайт S3 (рис. 2, в) [26, 83]. Предложено, что сборка первичного сигнального комплекса активированными TLR осуществляется за счёт TIR–TIR-взаимодействий, осуществляемых за счёт связывания

сайта S1 с сайтом S4, а также сайта S2 с сайтом S3 (рис. 2, з и д) [26, 83]. Последнее положение также основывается на результатах структурного анализа олигомерных комплексов, спонтанно образуемых *in vitro* рекомбинантными TIR-доменами адаптерных белков TIRAP и MyD88 [7, 8].

Помимо стратегий дизайна блокирующих пептидов, основывающихся на мимикрии сайтов взаимодействия белков эукариот, также использовались стратегии, основывающиеся на способности некоторых бактериальных и вирусных патогенов блокировать антимикробную защиту высших животных посредством белков, связывающих компоненты иммунной системы [86, 87]. Одним из примеров таких белков являются белки вируса коровьей оспы A46R и A52R, обладающие способностью связывать TIR-домены как TLR4, так и адаптерных белков, передающих сигнал с TLR4, тем самым блокируя сборку сигнальных комплексов [88, 89]. В обоих вирусных белках были идентифицированы короткие пептиды, способные ингибировать TLR. Так, конъюгированный с поли-аргининовым вектором пептид P13 из белка A52R эффективно ингибировал продукцию цитокинов, индуцированную агонистами TLR3, TLR4 и TLR7 в культуре клеток, а также снижал летальность мышей в модели септического шока, индуцированной введением LPS и D-галактозамина [90, 91]. Скрининг пептидов, представляющих участки A46R, ответственные за ингибирование TLR4 полноразмерным белком, выявил пептид, способный ингибировать TLR4 в культуре клеток в концентрации 1–5 мкМ [28]. Этот пептид, названный авторами VIPER, был специфичен к TLR4 и не оказывал ингибирующего действия на TLR2, TLR3 или TLR9. Авторы исследовали влияние аминокислотных замен на активность VIPER. Интересно, что замена одной аминокислоты в любой из позиций за исключением центрального лейцина не оказывала существенного влияния на ингибиторную активность пептида [28].

Было показано, что содержащие TIR-домен бактериальные факторы вирулентности TspV и TspC обладают способностью ингибировать TLR за счёт связывания адаптерного белка MyD88 [92]. Snyder et al. [93] тестировали пептиды, соответствующие петлям BB и DD TIR-домена белка TspC уропатогенного штамма *Escherichia coli*. Оба пептида подавляли индуцированную LPS активацию макрофагов. Используя иммунопреципитацию, авторы показали, что BB-пептид связывает TLR4, а DD-пептид – MyD88 [93]. Ke et al. [94] скринировали библиотеку пептидов TIR-домена белка TspV (TIR-containing protein in *Brucella*). Скрининг выявил 2 пептида, TB-8 и TB-9, ингибирующих ответ на LPS в моделях *in vitro* и *in vivo* [94].

Методология блокирующих пептидов также применялась в попытках разработки антивирусных агентов, предотвращающих проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетку [95]. Предлагались пептиды, происходящие как из вирусного белка Spike, так и из белка ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), являющегося рецептором, связываю-

щим Spike и необходимым для вхождения вируса в клетку хозяина [95]. На основании известной структуры комплекса Spike-ACE2 Loi et al. [96] создали серию коротких пептидов, происходящих из различных сайтов взаимодействия белка Spike с ACE2, и показали, что эти пептиды снижают связывание вируса с экспрессирующими ACE2 клетками при применении Spike-пептидов как по отдельности, так и (более эффективно) в составе коктейля из нескольких пептидов.

В заключение раздела, дающего функциональную характеристику известных БП, можно констатировать, что пептидные блокаторы могут быть направлены на блокировку как внеклеточных взаимодействий белков, так и взаимодействий сигнальных белков, находящихся в цитоплазме. В последнем случае требуется дополнение блокирующей части пептида пептидным вектором, обеспечивающим трансмембранный перенос. Блокировка функции трансмембранных рецепторов, располагающихся на плазматической мембране или на мембране эндосом, реализуема как за счёт блокировки взаимодействий, осуществляемых непосредственно рецепторами, так и за счёт блокировки индуцированных активацией рецептора взаимодействий адаптерных и эффекторных белков, располагающихся в цитоплазме. Опубликованные работы также показывают, что скрининг библиотек пептидов, созданных на основе последовательностей ДВБ, оказывается наиболее продуктивным вследствие множественности сайтов связывания, типично присутствующих на ДВБ. Ещё одним общим наблюдением при анализе опубликованных работ является достаточно узкий диапазон рабочих концентраций БП, направленных на блокировку внутриклеточных мишеней. Эффективная рабочая концентрация в культуре клеток для подавляющего большинства известных пептидов находится в диапазоне 5–40 мкМ, что, по-видимому, определяется эффективностью трансмембранного переноса пептидными векторами.

ВЕРИФИКАЦИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ БЛОКИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ

Концепция блокирующих пептидов основывается на предположении, что БП в значительной степени сохраняют специфичность и аффинность взаимодействий полноразмерного белка-прототипа. На практике, однако, БП идентифицируют не по связыванию с мишенью в системе *in vitro*, а в функциональных тестах либо путём скрининга, либо используя предсуществующее знание о положении сайта взаимодействия, необходимого для выполнения ингибируемой функции. Очевидно, что верификация механизма действия БП,

идентифицированных по ингибированию функции, должна включать подтверждение прямого связывания БП с белком-мишенью и/или блокировку пептидом взаимодействия мишени с полноразмерным белком-прототипом пептида. К настоящему времени имеются данные, подтверждающие такой механизм действия для значительного числа БП. Так, в одной из ранних работ методом иммунопреципитации было показано, что пептид, соответствующий петле BB TIR-домена MyD88, предотвращает димеризацию MyD88 [97]. Piao et al. [56], используя дот-блоттинг, позднее показали, что пептид из BB-петли TIR-домена MyD88, кроме MyD88, связывает и TIR-домены TIRAP и TLR9. Другим примером мультиспецифического связывания является пептид 7R11, соответствующий пятой спирали TIR-домена TLR7 (сайт S4; рис 2, в). 7R11 связывал TIR-домены как MyD88, так и TIRAP, но не контрольный белок; тогда как пептид 7R9 из 4-й спирали TIR-домена TLR7 (сайт S3; рис 2, в) связывал TIRAP, но не MyD88 или контрольный белок [24]. Более поздние исследования показали, что многие БП, происходящие из TIR-доменов, демонстрируют мультиспецифическое связывание, взаимодействуя со специфической подгруппой TIR-доменов, что повторяет свойства полноразмерных ДВБ как класса белков [26]. Эти наблюдения показывают, что БП могут связывать несколько мишеней, что в совокупности и определяет функциональные свойства того или иного пептида.

Вместе с тем отмечались и определённые закономерности в специфичностях связывания БП, происходящих из ДВБ. Так, БП, соответствующие 4-й спирали TIR-домена TLR, взаимодействовали с TIR-доменами адаптерных белков, но не с TIR-доменами рецепторов [26]. Так, пептид 4R9 (спираль D TLR4) не связывал TIR-домены TLR4 и TLR2 [5], но взаимодействовал с TIR-доменом адаптера TIRAP [81]. Пептид 2R9 (4-й спиральный регион (спираль D) TIR-домена TLR2) также преимущественно взаимодействовал с TIR-доменом TIRAP, но не с TIR-доменами TLR1, TLR4, TLR6 или TLR9 [56]. Аналогичным образом, БП из 4-го спирального региона рецепторов TLR1 и TLR6 преимущественно взаимодействовали с TIR-доменами адаптерных белков, MyD88 и TIRAP соответственно, а не с TIR-доменом TLR2, являющегося корецептором белков-прототипов этих БП [82]. Другим примером специфичности взаимодействия БП, происходящих из TIR-доменов, является связывание, демонстрируемое пептидами адаптерного белка TRIF, принадлежащего к MyD88-независимому сигнальному пути [81]. Пептид TF4 взаимодействовал с TIR-доменом рецептора TLR4, а TF5 – с TIR-доменами как TLR4, так и TRAM, но ни один из TRIF-пептидов не связывал адаптерные белки MyD88-зависимого пути, TIRAP и MyD88 [81].

Одним из свидетельств, подтверждающих, что связывание белка пептидом действительно является механизмом ингибирования функции этого белка, могло бы стать совпадение кажущейся константы связывания пары белок–БП, измеренной в клеточной системе, с константой ингибирования функции, также измеренной в клеточной системе. Чтобы получить такое подтверждение, наша группа разработала и применила систему, использующую Фёрстеровский резонансный перенос энергии для количественной оценки связывания пептидов с белками-мишенями непосредственно в клетке. Была создана панель плазмид, кодирующих гибридные белки, состоящие из TIR-домена в связке с белковой флуоресцентной меткой. Для оценки связывания пептидов с TIR-доменами флуоресцентно меченные TIR-домены, рассматриваемые как вероятные мишени пептида, эктопически экспрессировались в клетках HeLa, и клетки инкубировались в присутствии блокирующего пептида, меченного флуоресцентным красителем, способным тушить флуоресценцию белковой метки TIR-домена [5, 98]. Связывание пептида с TIR-доменом оценивалось по тушению флуоресценции белковой метки, выражающемуся в снижении времени жизни её флуоресценции. Многочисленные примеры, подробно разобранные в опубликованном ранее обзоре литературы [26], а также в двух статьях, вышедших позднее [24, 25], продемонстрировали практически полное совпадение эффективных концентраций, необходимых для блокирования функции проникающими БП и для тушения ими флуоресценции меченых TIR-доменов. Кажущиеся константы связывания и ингибирования, измеренные в клеточной системе для ингибиторных БП с TIR-мишенями, находятся в диапазоне 1–20 мкМ для всех эффективно связывающихся пар БП–TIR, идентифицированных к настоящему времени [26]. Такой достаточно узкий диапазон эффективных концентраций для достаточно большой группы БП, идентифицированных к настоящему времени, вероятно, является следствием общности механизма проникновения БП через плазматическую мембрану клеток. Подтверждением последнего предположения является то, что БП демонстрируют значительно более высокие константы связывания в *in vitro* тестах, использующих рекомбинантные белки-мишени по сравнению со связыванием в клеточной системе. Так, пептид 2R9 связывался с рекомбинантным TIR-доменом адаптерного белка TIRAP в растворе с $K_D \sim 40$ мкМ, что значительно меньше кажущейся константы диссоциации для этой пары в клеточной системе [56]. Расхождение констант связывания, измеренных *in vitro* и в клеточной системе, также отчасти может объясняться неспецифическим связыванием пептида с вне- и внутриклеточными белками. В частности, было

показано, что 2R9 связывается с сывороточным альбумином с $K_D \sim 1,5$ мкМ [56]. Эксперименты, выполненные с использованием методики поверхностного плазмонного резонанса, подтвердили, что высокое сродство пептидов к TIR-доменам обеспечивается за счёт высокой скорости ассоциации вместе с низкой скоростью диссоциации [56].

В заключение этого раздела можно констатировать, что накопленные к настоящему времени экспериментальные данные подтверждают связывание белков-мишеней блокирующими пептидами как основной механизм действия БП. И хотя некоторые БП, происходящие из ДВБ, подобно их белкам-прототипам, демонстрируют способность к взаимодействию с несколькими белками, представителями своего класса, многие взаимодействия селективны. Одним из примеров селективности таких взаимодействий являются взаимодействия БП, происходящих из α -спирали D TIR-доменов TLR, с TIR-доменами адаптерных белков, вместе с тем, что эти пептиды не взаимодействуют с TIR-доменами рецепторов.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БЛОКИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ *in vivo*

Пептидные блокаторы белковых взаимодействий, идентифицированные в экспериментах на культуре клеток, были оттестированы в экспериментах *in vivo*. Следует отметить, однако, что представленные к настоящему времени в литературе примеры использования БП *in vivo* ограничиваются экспериментами на мелких лабораторных животных и в подавляющем большинстве случаев представлены тестированием ингибиторов TLR. В первых попытках модулировать функции TLR *in vivo* с помощью БП использовались пептиды вирусных белков A46R и A52R. Tsung et al. [91] показали, что P13, пептид белка A52R, снижал уровень циркулирующего TNF, индуцированного введением LPS мышам, приблизительно вдвое. Аналогичное действие оказывал пептид VIPER при интравенозном, совместном с LPS введении мышам, снижая циркулирующий IL-12p40 на ~50% по сравнению с контролем [28]. Couture et al. [80] первыми протестировали в мышинной модели блокирующие TLR-пептиды на основе белков млекопитающих. Было протестировано 2 пептида, идентифицированных при скрининге библиотеки адаптерного белка TIRAP, это пептиды из второго и третьего спирального участка последовательности TIRAP, соответственно обозначенные TR5 и TR6. Пептиды вводили мышам интраперитонеально в дозе 10 нмоль/г за час до введения сублетальной дозы LPS. Оба БП, но не контрольный проникающий пептид аналогичной длины, прак-

тически полностью блокировали выброс TNF в кровоток животных в ответ на введение LPS, а также значительно снижали уровни циркулирующего IL-6 [80].

В последующей работе Piao et al. [55] более детально оценили эффективность БП в животной модели. Оценивались ингибирующие пептиды, происходящие из адаптерного белка TRAM, принадлежащего к MyD88-независимому сигнальному пути [99]. Эксперименты подтвердили системную ингибирующую активность, демонстрируемую пептидами при введении мышам. Пептиды, TM4, TM6, а также транкированный пептид TM4-ΔC снижали уровни циркулировавших TNF и IL-6 на ~90% от их пиковых значений [55]. Авторы сравнивали активность пептидов при интраперитонеальном и интравенозном введении. БП достоверно снижали системные уровни цитокинов при обоих способах введения, однако ингибиторная активность пептидов после интраперитонеального введения была выше [55]. Также изучалась эффективность БП при так называемом «терапевтическом введении». В этих экспериментах менялась очерёдность введения БП и LPS, БП вводились через 30 минут после введения LPS, а не за час до него. Эксперименты продемонстрировали значительное снижение уровней циркулирующих цитокинов уже через полтора часа после «терапевтического» введения БП [55]. В другой серии экспериментов этого исследования была оценена способность TRAM-пептидов предотвращать летальность, вызванную введением LPS мышам. Введение пептидов TM4 и TM4-ΔC в дозе 10 нмоль/г за час до введения LPS в дозе 17,5 мкг/г предотвращало летальность в 100% случаев, тогда как пептиды TM6 и TR6 были эффективны в ~65–80% случаев [55]. Выживаемость мышей при терапевтическом введении пептида TM4-ΔC (через 3 часа после введения летальной дозы LPS) ожидаемо снижалась, по сравнению с профилактическим введением, и составляла ~70% против 100%-ной выживаемости при введении пептида за 1 час до введения LPS [55].

В литературе использовались несколько вариантов пептидов, происходящих из третьего спирального участка последовательности TIRAP. Так, Shah et al. [100] использовали пептид MIP2, 8 из 12 а.о. последовательности которого перекрывались с последовательностью TR6, ингибиторного пептида, идентифицированного Couture et al. [80] в оригинальном скрининге библиотеки пептидов TIR-домена TIRAP. MIP2 демонстрировал мультиспецифичный эффект в отношении TLR, ингибируя TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 и TLR9 [100]. Это наблюдение подтвердило и расширило данные исследования Couture et al. [80], в котором влияние TR6 оценивалось только на TLR2 и TLR4. На модели LPS-индуцированного септического шока

было показано, что MIP2 увеличивал 72-часовую выживаемость мышей с 0 до 20–25% [100]. Shah et al. [100] детально изучали эффекты MIP2 в моделях хронических воспалительных заболеваний: псориаза, индуцированного введением имиквимода, агониста TLR7; системной красной волчанки (СКВ), использовавшей мышей линии MRL/lpr, склонных к спонтанному развитию этого заболевания; а также неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП), индуцированной диетой с низким содержанием метионина и холина. Авторы сообщают, что 6-дневный курс MIP2 оказывал значительное (сравнимое с эффектом метотрексата) противовоспалительное действие в модели псориаза при применении пептида в низкой дозе (1 нмоль/г), которое, однако, парадоксальным образом снижалось при применении MIP2 в высоких дозах (10 и 20 нмоль/г) [100]. В мышинной модели СКВ 20-дневный курс MIP2 заметно замедлял прогрессирование воспалительных проявлений болезни, тогда как в модели НЖБП длительное применение пептида, хотя и не вызывало снижения печёночных маркеров и гистологических проявлений стеатоза, заметно понижало воспалительные проявления [100]. Другим примером блокирующего пептида, происходящего из третьего спирального участка последовательности TIRAP, является TR667, представляющий эволюционно сохранный сегмент поверхности TIR-домена и отличающийся от MIP2 сдвигом на один аминокислотный остаток к С-концу TIRAP [25]. TR667, подобно MIP2, проявлял мультиспецифические ингибирующие свойства в отношении TLR и ингибировал TLR2, TLR4, TLR5 и TLR9; однако, в отличие от MIP2, не ингибировал TLR7 [25].

В исследовании Piao et al. [56] оценивалась эффективность пептида 2R9 в отношении системной продукции цитокинов, индуцированной агонистами TLR2 и TLR7, а также для подавления цитокинового ответа на способный к репликации патоген (использовался штамм PR8 вируса гриппа H1N1). Предварительные исследования показали, что 2R9, пептид, идентифицированный при скрининге библиотеки пептидов TIR-домена TLR2, мультиспецифичен и блокирует TLR2, TLR4, TLR7 и TLR9 за счёт связывания TIRAP, адаптерного белка, усиливающего передачу сигнала с этих рецепторов [56]. При введении мышам 2R9 достоверно ингибировал цитокиновый ответ как на Pam3Cys (S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-Ser-Lys₄-OH), агонист TLR2, так и на R848 (резиквимод), агонист TLR7, а также на ODN1668, агонист TLR9 [56, 83]. 2R9 также на 80–90% блокировал MyD88-зависимую секрецию TNF, IL-6 и IFN- β культивируемыми перитонеальными макрофагами, инфицированными вирусом гриппа [56]. Избыточная секреция цитокинов мо-

жет служить причиной смертности при острых вирусных инфекциях. Используя такое обоснование, авторы протестировали, будет ли 2R9 снижать летальность мышей, инфицированных вызывающей ~90%-ную летальность дозой вируса гриппа (штамм PR8). Эксперименты показали, что 5-дневный курс ежедневных инъекций пептида, начатых спустя 48 часов после инфицирования вирусом, достоверно снижали смертность [56]. В другой работе, однако, было показано, что эффект от подавления TLR-зависимого иммунного ответа на исход болезни сильно зависит от времени начала терапии [101], причём слишком раннее начало введения подавляющих иммунный ответ агентов может усугублять течение инфекционных болезней.

Представленные работы показывают эффективность БП как для подавления системной продукции цитокинов, индуцированной введением синтетических агонистов специфических рецепторов, так и в более сложных моделях хронического воспаления или воспаления, индуцированного инфекционными агентами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования последних двух десятилетий привели к значительному прогрессу в открытии новых БП и пониманию механизмов их действия. К настоящему времени отработаны методики идентификации БП, оценки специфичности их связывания с мишенями *in vitro* и на клеточных моделях, а также оценки эффективности БП *in vivo*. Показана высокая эффективность методологии блокирующих пептидов для создания ингибиторов сигнальных путей, механизм действия которых заключается в блокировке транзитных взаимодействий сигнальных белков, осуществляемых специализированными белковыми доменами. В экспериментах на мелких лабораторных животных убедительно показана способность БП подавлять системный ответ на стимуляцию определённых рецепторов как при интраперитонеальном, так и при внутривенном введении пептидов. Также имеются примеры эффективности БП при длительном применении для подавления хронических воспалительных процессов. К настоящему времени достигнуто понимание, что мультиспецифичность, демонстрируемая некоторыми БП, важна для понимания их биологических эффектов, а также что она, по-видимому, вносит существенный вклад в эффективность БП в сложных животных моделях.

Несмотря на то что пул известных БП достаточно велик, точные молекулярные детерминанты их ингибиторной активности на данный

момент не установлены. Это обусловлено такими ключевыми факторами, как значительное разнообразие ингибиторных последовательностей, толерантность БП к аминокислотным заменам, множественность сайтов, связывающих отдельные БП, а также отсутствие известных структур комплексов БП с их белками-мишенями. Определение атомной трёхмерной структуры комплексов БП с их белками-мишенями улучшит понимание механизмов распознавания сигнальных белков, а также заложит основание для рациональной оптимизации уже известных БП. Функциональность БП также может быть улучшена за счёт оптимизации проникающих последовательностей для более прицельной доставки блокатора к молекулярной

мишени, а также за счёт использования пептидомиметиков с целью повышения биологической стабильности блокирующих агентов.

Финансирование. Финансирование осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; проект НИР-ИМБ-2102).

Конфликт интересов. Автор является сообладателем авторских прав на коммерческое использование некоторых из описанных в статье пептидов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray, D. (1998) Signaling complexes: biophysical constraints on intracellular communication, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**, 59-75, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.59>.
2. Pawson, T., and Nash, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains, *Science*, **300**, 445-452, <https://doi.org/10.1126/science.1083653>.
3. Wu, H., and Fuxreiter, M. (2016) The structure and dynamics of higher-order assemblies: amyloids, signalosomes, and granules, *Cell*, **165**, 1055-1066, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.004>.
4. Mayer, B. J. (2015) The discovery of modular binding domains: building blocks of cell signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 691-698, <https://doi.org/10.1038/nrm4068>.
5. Toshchakov, V. Y., Szmazinski, H., Couture, L. A., Lakowicz, J. R., and Vogel, S. N. (2011) Targeting TLR4 signaling by TLR4 Toll/IL-1 receptor domain-derived decoy peptides: identification of the TLR4 Toll/IL-1 receptor domain dimerization interface, *J. Immunol.*, **186**, 4819-27, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002424>.
6. Wu, H. (2013) Higher-order assemblies in a new paradigm of signal transduction, *Cell*, **153**, 287-292, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.013>.
7. Ve, T., Vajjhala, P. R., Hedger, A., Croll, T., Dimaio, F., Horsefield, S., Yu, X., Lavrencic, P., Hassan, Z., Morgan, G. P., Mansell, A., Mobli, M., O'Carroll, A., Chauvin, B., Gambin, Y., Sieracki, E., Landsberg, M. J., Stacey, K. J., Egelman, E. H., and Kobe, B. (2017) Structural basis of TIR-domain-assembly formation in MAL- and MyD88-dependent TLR4 signaling, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 743-751, <https://doi.org/10.1038/nsmb.3444>.
8. Clabbers, M. T. B., Holmes, S., Muusse, T. W., Vajjhala, P. R., Thygesen, S. J., Malde, A. K., Hunter, D. J. B., Croll, T. I., Flueckiger, L., Nanson, J. D., Rahaman, M. H., Aquila, A., Hunter, M. S., Liang, M., Yoon, C. H., Zhao, J., Zatsepin, N. A., Abbey, B., Sieracki, E., Gambin, Y., Stacey, K. J., Darmanin, C., Kobe, B., Xu, H., and Ve, T. (2021) MyD88 TIR domain higher-order assembly interactions revealed by microcrystal electron diffraction and serial femtosecond crystallography, *Nat. Commun.*, **12**, 2578, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22590-6>.
9. Lin, S. C., Lo, Y. C., and Wu, H. (2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling, *Nature*, **465**, 885-890, <https://doi.org/10.1038/nature09121>.
10. Park, H. H., Lo, Y.-C., Lin, S.-C., Wang, L., Yang, J. K., and Wu, H. (2007) The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation, *Annu. Rev. Immunol.*, **25**, 561-586, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141656>.
11. Song, B., Chen, Y., Liu, X., Yuan, F., Tan, E. Y. J., Lei, Y., Song, N., Han, Y., Pascal, B. D., Griffin, P. R., Luo, C., Wu, B., Luo, D., and Zheng, J. (2021) Ordered assembly of the cytosolic RNA-sensing MDA5-MAVS signaling complex via binding to unanchored K63-linked poly-ubiquitin chains, *Immunity*, **54**, 2218-2230.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.008>.
12. Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., Jiang, Q. X., Halfmann, R., and Chen, Z. J. (2014) Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation, *Cell*, **156**, 1207-1222, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.063>.
13. Lu, A., Magupalli, V. G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M. K., Vos, M. R., Schröder, G. F., Fitzgerald, K. A., Wu, H., and Egelman, E. H. (2014) Unified polymerization mechanism for the assembly of asc-dependent inflammasomes, *Cell*, **156**, 1193-1206, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.008>.
14. Fu, J., and Wu, H. (2023) Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation, *Annu. Rev. Immunol.*, **41**, 301-316, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-081022-021207>.

15. Kagan, J. C., Magupalli, V. G., and Wu, H. (2014) SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 821-826, <https://doi.org/10.1038/nri3757>.
16. Nanson, J. D., Kobe, B., and Ve, T. (2019) Death, TIR, and RHIM: Self-assembling domains involved in innate immunity and cell-death signaling, *J. Leukoc. Biol.*, **105**, 363-375, <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0318-123R>.
17. Attwood, M. M., Jonsson, J., Rask-Andersen, M., and Schiöth, H. B. (2020) Soluble ligands as drug targets, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 695-710, <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0078-4>.
18. Monaco, C., Nanchahal, J., Taylor, P., and Feldmann, M. (2015) Anti-TNF therapy: past, present and future, *Int. Immunol.*, **27**, 55-62, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu102>.
19. Buss, N. A. P. S., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., and de Haan, L. (2012) Monoclonal antibody therapeutics: history and future, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **12**, 615-622, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001>.
20. Filmore, D. (2004) It's a GPCR world, *Modern Drug Discov.*, **11**, 24-28.
21. Sriram, K., and Insel, P. A. (2018) G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Mol. Pharmacol.*, **93**, 251-258, <https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>.
22. George, S. R., O'Dowd, B. F., and Lee, S. P. (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 808-820, <https://doi.org/10.1038/nrd913>.
23. Chan, W. K. B., Zhang, H., Yang, J., Brender, J. R., Hur, J., Ozgur, A., and Zhang, Y. (2015) GLASS: a comprehensive database for experimentally validated GPCR-ligand associations, *Bioinformatics*, **31**, 3035-3042, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv302>.
24. Javmen, A., Szmazinski, H., Lakowicz, J. R., and Toshchakov, V. Y. (2020) Frontline science: targeting the TLR7 signalosome assembly, *J. Leukoc. Biol.*, **108**, 1697-1706, <https://doi.org/10.1002/JLB.2HI0819-180R>.
25. Javmen, A., Zou, J., Nallar, S. C., Szmazinski, H., Lakowicz, J. R., Gewirtz, A. T., and Toshchakov, V. Y. (2023) TLR5-derived, TIR-interacting decoy peptides to inhibit TLR signaling, *J. Immunol.*, **210**, 1428-1436, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200371>.
26. Toshchakov, V. Y., and Javmen, A. (2020) Targeting the TLR signalosome with TIR domain-derived cell-permeable decoy peptides: the current state and perspectives, *Innate Immun.*, **26**, 35-47, <https://doi.org/10.1177/1753425919844310>.
27. Toshchakov, V. Y., and Vogel, S. N. (2007) Cell-penetrating TIR BB loop decoy peptides: a novel class of TLR signaling inhibitors and a tool to study topology of TIR-TIR interactions, *Exp. Opinion Biol. Ther.*, **7**, 1035-1050, <https://doi.org/10.1517/14712598.7.7.1035>.
28. Lysakova-Devine, T., Keogh, B., Harrington, B., Nagpal, K., Halle, A., Golenbock, D. T., Monie, T., and Bowie, A. G. (2010) Viral inhibitory peptide of TLR4, a peptide derived from vaccinia protein A46, specifically inhibits TLR4 by directly targeting MyD88 adaptor-like and TRIF-related adaptor molecule, *J. Immunol.*, **185**, 4261-4271, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002013>.
29. Jones, S., and Thornton, J. M. (1996) Principles of protein-protein interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13-20, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.13>.
30. Conte, L. Lo; Chothia, C., and Janin, J. (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites, *J. Mol. Biol.*, **285**, 2177-2198, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2439>.
31. Nooren, I. M. A., and Thornton, J. M. (2003) Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions, *J. Mol. Biol.*, **325**, 991-1018, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01281-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01281-0).
32. Chen, J., Sawyer, N., and Regan, L. (2013) Protein-protein interactions: general trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area, *Protein Sci.*, **22**, 510-515, <https://doi.org/10.1002/pro.2230>.
33. Park, H. H., Logette, E., Raunser, S., Cuenin, S., Walz, T., Tschoop, J., and Wu, H. (2007) Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex, *Cell*, **128**, 533-546, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.019>.
34. Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. (2005) *Физика белка* (В. Я. Дубнова, ред.) 3-е изд., издательство «КДУ», Москва.
35. Green, M., and Loewenstein, P. M. (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein, *Cell*, **55**, 1179-1188, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0).
36. Frankel, A. D., and Pabo, C. O. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell*, **55**, 1189-1193, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90263-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2).
37. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1864-1868, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1864>.
38. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.*, **269**, 10444-10450, [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)34080-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)34080-2).
39. Park, J., Ryu, J., Kim, K.-A., Lee, H. J., Bahn, J. H., Han, K., Choi, E. Y., Lee, K. S., Kwon, H. Y., and Choi, S. Y. (2002) Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells, *J. Gen. Virol.*, **83**, 1173-1181, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-5-1173>.

40. Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S., and Kim, S. C. (2000) Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8245-8250, <https://doi.org/10.1073/pnas.150518097>.
41. Low, W., Mortlock, A., Petrovska, L., Dottorini, T., Dougan, G., and Crisanti, A. (2007) Functional cell permeable motifs within medically relevant proteins, *J. Biotechnol.*, **129**, 555-564, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.019>.
42. Joliot, A., and Prochiantz, A. (2004) Transduction peptides: from technology to physiology, *Nat. Cell Biol.*, **6**, 189-196, <https://doi.org/10.1038/ncb0304-189>.
43. Kauffman, W. B., Fuselier, T., He, J., and Wimley, W. C. (2015) Mechanism matters: a taxonomy of cell penetrating peptides, *Trends Biochem. Sci.*, **40**, 749-764, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.004>.
44. Kardani, K., and Bolhassani, A. (2021) Cpps site 2.0: an available database of experimentally validated cell-penetrating peptides predicting their secondary and tertiary structures, *J. Mol. Biol.*, **433**, 166703, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.002>.
45. Milletti, F. (2012) Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape, *Drug Discovery Today*, **17**, 850-860, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>.
46. Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2022) Shuttling homeoproteins and their biological significance, *Methods Mol. Biol.*, **2383**, 33-44, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6_2.
47. Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G., and Rothbard, J. B. (2000) Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers, *J. Pept. Res.*, **56**, 318-325, <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x>.
48. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (1998) Cell penetration by transportan, *FASEB J.*, **12**, 67-77, <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.1.67>.
49. Sun, Z., Huang, J., Fishelson, Z., Wang, C., and Zhang, S. (2023) Cell-penetrating peptide-based delivery of macromolecular drugs: development, strategies, and progress, *Biomedicines*, **11**, 1971, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071971>.
50. Bechara, C., and Sagan, S. (2013) Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.*, **587**, 1693-1702, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>.
51. Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. (1999) *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse, *Science*, **285**, 1569-1572, <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1569>.
52. Reveret, L., Leclerc, M., Morin, F., Émond, V., and Calon, F. (2023) Pharmacokinetics, biodistribution and toxicology of novel cell-penetrating peptides, *Sci. Rep.*, **13**, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37280-0>.
53. Nakase, I., Konishi, Y., Ueda, M., Saji, H., and Futaki, S. (2012) Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery *in vivo*, *J. Controll. Rel.*, **159**, 181-188, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.016>.
54. Sarko, D., Beijer, B., Garcia Boy, R., Nothelfer, E.-M., Leotta, K., Eisenhut, M., Altmann, A., Haberkorn, U., and Mier, W. (2010) The pharmacokinetics of cell-penetrating peptides, *Mol. Pharmaceut.*, **7**, 2224-2231, <https://doi.org/10.1021/mp100223d>.
55. Piao, W., Vogel, S. N., and Toshchakov, V. Y. (2013) Inhibition of TLR4 signaling by TRAM-derived decoy peptides *in vitro* and *in vivo*, *J. Immunol.*, **190**, 2263-2272, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202703>.
56. Piao, W., Shirey, K. A., Ru, L. W., Lai, W., Szmazinski, H., Snyder, G. A., Sundberg, E. J., Lakowicz, J. R., Vogel, S. N., and Toshchakov, V. Y. (2015) A decoy peptide that disrupts TIRAP recruitment to TLRs is protective in a murine model of influenza, *Cell Rep.*, **11**, 1941-1952, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.035>.
57. Henriques, S. T., Melo, M. N., and Castanho, M. A. R. B. (2006) Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem. J.*, **399**, 1-7, <https://doi.org/10.1042/BJ20061100>.
58. Dutta, P., and Das, S. (2016) Mammalian antimicrobial peptides: promising therapeutic targets against infection and chronic inflammation, *Curr. Top. Med. Chem.*, **16**, 99-129, <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121819>.
59. Sadiq, I. Z., Muhammad, A., Mada, S. B., Ibrahim, B., and Umar, U. A. (2022) Biotherapeutic effect of cell-penetrating peptides against microbial agents: a review, *Tissue Barriers*, <https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1995285>.
60. Splith, K., and Neundorff, I. (2011) Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa, *Eur. Biophys. J.*, **40**, 387-397, <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0682-7>.
61. Neundorff, I. (2019) Antimicrobial and cell-penetrating peptides: how to understand two distinct functions despite similar physicochemical properties, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1117**, 93-109, https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_7.
62. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
63. Goligorsky, M. S., Noiri, E., Kessler, H., and Romanov, V. (1998) Therapeutic effect of arginine-glycine-aspartic acid peptides in acute renal injury, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**, 276-279, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1998.t01-2-x>.

64. Luo, Y., Smith, R. A., Guan, R., Liu, X., Klinghofer, V., Shen, J., Hutchins, C., Richardson, P., Holzman, T., Rosenberg, S. H., and Giranda, V. L. (2004) Pseudosubstrate peptides inhibit Akt and induce cell growth inhibition, *Biochemistry*, **43**, 1254-1263, <https://doi.org/10.1021/bi034515p>.
65. Hiromura, M., Okada, F., Obata, T., Auguin, D., Shibata, T., Roumestand, C., and Noguchi, M. (2004) Inhibition of Akt kinase activity by a peptide spanning the β A strand of the proto-oncogene TCL1, *J. Biol. Chem.*, **279**, 53407-53418, <https://doi.org/10.1074/jbc.M403775200>.
66. May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glöckner, J., Pober, J. S., and Ghosh, S. (2000) Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex, *Science*, **289**, 1550-1554, <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1550>.
67. Agou, F., Courtois, G., Chiaravalli, J., Baleux, F., Coïc, Y. M., Traincard, F., Israël, A., and Véron, M. (2004) Inhibition of NF- κ B activation by peptides targeting NF- κ B essential modulator (NEMO) oligomerization, *J. Biol. Chem.*, **279**, 54248-54257, <https://doi.org/10.1074/jbc.M406423200>.
68. Choi, M., Rolle, S., Wellner, M., Cardoso, M. C., Scheidereit, C., Luft, F. C., and Kettritz, R. (2003) Inhibition of NF- κ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis, *Blood*, **102**, 2259-2267, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2960>.
69. Borsello, T., Clarkel, P. G. H., Hirt, L., Vercelli, A., Repici, M., Schorderet, D. F., Bogousslavsky, J., and Bonny, C. (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia, *Nat. Med.*, **9**, 1180-1186, <https://doi.org/10.1038/nm911>.
70. Kelemen, B. R., Hsiao, K., and Goueli, S. A. (2002) Selective *in vivo* inhibition of mitogen-activated protein kinase activation using cell-permeable peptides, *J. Biol. Chem.*, **277**, 8741-8748, <https://doi.org/10.1074/jbc.M108459200>.
71. D'Ursi, A. M., Giusti, L., Albrizio, S., Porchia, F., Esposito, C., Caliendo, G., Gargini, C., Novellino, E., Lucacchini, A., Rovero, P., and Mazzoni, M. R. (2006) A membrane-permeable peptide containing the last 21 residues of the G alpha(s) carboxyl terminus inhibits G(s)-coupled receptor signaling in intact cells: correlations between peptide structure and biological activity, *Mol. Pharmacol.*, **69**, 727-736, <https://doi.org/10.1124/mol.105.017715>.
72. Horng, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway, *Nat. Immunol.*, **2**, 835-841, <https://doi.org/10.1038/ni0901-835>.
73. Toshchakov, V. U., Basu, S., Fenton, M. J., and Vogel, S. N. (2005) Differential involvement of BB loops of Toll-IL-1 resistance (TIR) domain-containing adapter proteins in TLR4- versus TLR2-mediated signal transduction, *J. Immunol.*, **175**, 494-500, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.494>.
74. Toshchakov, V., Jones, B. W., Perera, P. Y., Thomas, K., Cody, M. J., Zhang, S., Williams, B. R. G., Major, J., Hamilton, T. A., Fenton, M. J., and Vogel, S. N. (2002) TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT1 α / β -dependent gene expression in macrophages, *Nat. Immunol.*, **3**, 392-398, <https://doi.org/10.1038/ni774>.
75. Loiarro, M., Sette, C., Gallo, G., Ciacci, A., Fantó, N., Mastroianni, D., Carminati, P., and Ruggiero, V. (2005) Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- κ B, *J. Biol. Chem.*, **280**, 15809-15814, <https://doi.org/10.1074/jbc.C400613200>.
76. Schilling, D., Thomas, K., Nixdorff, K., Vogel, S. N., and Fenton, M. J. (2002) Toll-like receptor 4 and toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter-like (Mal) contribute to maximal IL-6 expression in macrophages, *J. Immunol.*, **169**, 5874-5880, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5874>.
77. Trifonov, L., Nudelman, V., Zhenin, M., Matsree, E., Afri, M., Schmerling, B., Cohen, G., Jozwiak, K., Weitman, M., Korshin, E., Senderowitz, H., Shainberg, A., Hochhauser, E., and Gruzman, A. (2018) Structurally simple, readily available peptidomimetic 1-benzyl-5-methyl-4-(n-octylamino)pyrimidin-2(1H)-one exhibited efficient cardioprotection in a myocardial ischemia (MI) mouse model, *J. Med. Chem.*, **61**, 11309-11326, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01471>.
78. Trifonov, L., Yurchenko, M., Skjesol, A., Cohen, G., Espevik, T., Korshin, E. E., Grøvdal, L. M., Husebye, H., and Gruzman, A. (2022) Benzyl-para-di-[5-methyl-4-(n-octylamino) pyrimidin-2(1H)one] as an interferon beta (IFN- β) modulator, *Mol. Diversity*, **26**, 2175-2188, <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10324-1>.
79. Toshchakov, V. Y., Fenton, M. J., and Vogel, S. N. (2007) Cutting edge: differential inhibition of TLR signaling pathways by cell-permeable peptides representing BB loops of TLRs, *J. Immunol.*, **178**, 2655-2660, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2655>.
80. Couture, L. A., Piao, W., Ru, L. W., Vogel, S. N., and Toshchakov, V. Y. (2012) Targeting toll-like receptor (TLR) signaling by toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein/MyD88 adapter-like (TIRAP/Mal)-derived decoy peptides, *J. Biol. Chem.*, **287**, 24641-24648, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.360925>.
81. Piao, W., Ru, L. W., Piepenbrink, K. H., Sundberg, E. J., Vogel, S. N., and Toshchakov, V. Y. (2013) Recruitment of TLR adapter TRIF to TLR4 signaling complex is mediated by the second helical region of TRIF TIR domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 19036-19041, <https://doi.org/10.1073/pnas.1313575110>.

82. Piao, W., Ru, L. W., and Toshchakov, V. Y. (2016) Differential adapter recruitment by TLR2 co-receptors, *Pathogens Disease*, **74**, ftw043, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw043>.
83. Javmen, A., Szmackinski, H., Lakowicz, J. R., and Toshchakov, V. Y. (2018) Blocking TIR domain interactions in TLR9 signaling, *J. Immunol.*, **201**, 995-1006, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800194>.
84. Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* toll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 588-593, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.588>.
85. Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., and Tong, L. (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, *Science*, **408**, 111, 111-115, <https://doi.org/10.1038/35040600>.
86. Odendall, C., and Kagan, J. C. (2017) Activation and pathogenic manipulation of the sensors of the innate immune system, *Microbes Infect.*, **19**, 229-237, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.01.003>.
87. Reddick, L. E., and Alto, N. M. (2014) Bacteria fighting back: how pathogens target and subvert the host innate immune system, *Mol. Cell*, **54**, 321-328, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.010>.
88. Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K., and O'Neill, L. A. J. (2000) A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10162-10167, <https://doi.org/10.1073/pnas.160027697>.
89. Azar, D. F., Haas, M., Fedosyuk, S., Rahaman, M. H., Hedger, A., Kobe, B., and Skern, T. (2020) Vaccinia virus immunomodulator A46: destructive interactions with MAL and MyD88 shown by negative-stain electron microscopy, *Structure*, **28**, 1271-1287.e5, <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.09.007>.
90. McCoy, S. L., Kurtz, S. E., MacArthur, C. J., Trune, D. R., and Hefeneider, S. H. (2005) Identification of a peptide derived from vaccinia virus A52R TLR-dependent signaling and reduces *in vivo*, *J. Immunol.*, **174**, 3006-3014, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.3006>.
91. Tsung, A., McCoy, S. L., Klune, J. R., Geller, D. A., Billiar, T. R., and Hefeneider, S. H. (2007) A novel inhibitory peptide of toll-like receptor signaling limits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory mediators and enhances survival in mice, *Shock*, **27**, 364-369, <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000239773.95280.2c>.
92. Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N., Wagner, H., Svanborg, C., and Miethke, T. (2008) Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins, *Nat. Med.*, **14**, 399-406, <https://doi.org/10.1038/nm1734>.
93. Snyder, G. A., Cirl, C., Jiang, J., Chen, K., Waldhuber, A., Smith, P., Römmler, F., Snyder, N., Fresquez, T., Dürr, S., Tjandra, N., Miethke, T., and Xiao, T. S. (2013) Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 6985-6990, <https://doi.org/10.1073/pnas.1215770110>.
94. Ke, Y., Li, W., Wang, Y., Yang, M., Guo, J., Zhan, S., Du, X., Wang, Z., Yang, M., Li, J., Li, W., and Chen, Z. (2016) Inhibition of TLR4 signaling by *Brucella* TIR-containing protein TcpB-derived decoy peptides, *Int. J. Med. Microbiol.*, **306**, 391-400, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.003>.
95. Круть В. Г., Чувпило С. А., Астраханцева И. В., Козловская Л. И., Ефимов Г. А., Круглов А. А., Друцкая М. С., Недоспасов С. А. (2022) Помогут ли пептиды остановить Covid-19? *Биохимия*, **87**, 707-726, <https://doi.org/10.31857/S0320972522060021>.
96. Loi, L. K., Yang, C. C., Lin, Y. C., Su, Y. F., Juan, Y. C., Chen, Y. H., and Chang, H. C. (2023) Decoy peptides effectively inhibit the binding of SARS-CoV-2 to ACE2 on oral epithelial cells, *Heliyon*, **9**, e22614, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22614>.
97. Loiarro, M., Capolunghi, F., Fantò, N., Gallo, G., Campo, S., Arseni, B., Carsetti, R., Carminati, P., De Santis, R., Ruggiero, V., and Sette, C. (2007) Pivotal Advance: Inhibition of MyD88 dimerization and recruitment of IRAK1 and IRAK4 by a novel peptidomimetic compound, *J. Leukoc. Biol.*, **82**, 801-810, <https://doi.org/10.1189/jlb.1206746>.
98. Szmackinski, H., Toshchakov, V., and Lakowicz, J. R. (2014) Application of phasor plot and autofluorescence correction for study of heterogeneous cell population, *J. Biomed. Optics*, **19**, 046017, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.4.046017>.
99. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway, *Nat. Immunol.*, **4**, 1144-1150, <https://doi.org/10.1038/ni986>.
100. Shah, M., Kim, G. Y., Achek, A., Cho, E. Y., Baek, W. Y., Choi, Y. S., Lee, W. H., Kim, D. J., Lee, S. H., Kim, W., Kim, S. S., Cheong, J. Y., Suh, C. H., and Choi, S. (2020) The α C helix of TIRAP holds therapeutic potential in TLR-mediated autoimmune diseases, *Biomaterials*, **245**, 119974, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119974>.
101. Shirey, K. A., Lai, W., Scott, A. J., Lipsky, M., Mistry, P., Pletneva, L. M., Karp, C. L., McAlees, J., Gioannini, T. L., Weiss, J., Chen, W. H., Ernst, R. K., Rossignol, D. P., Gusovsky, F., Blanco, J. C. G., and Vogel, S. N. (2013) The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection, *Nature*, **497**, 498-502, <https://doi.org/10.1038/nature12118>.

PEPTIDE INHIBITORS OF THE INDUCED SIGNALING PROTEIN INTERACTIONS: THE CURRENT STATE AND PERSPECTIVES

Review

V. Y. Toshchakov

*Sirius University of Science and Technology,
354340 «Sirius» Federal Territory, Krasnodar region, Russia; e-mail: toschakov.vy@talantiuspeh.ru*

The formation of transitory protein complexes in response to activation of cellular receptors is a common mechanism by which cells respond to external stimuli. This article presents the concept of blocking the interactions of signaling proteins by peptide inhibitors, and describes the progress achieved to date in development of signaling inhibitors that act by blocking the signal-dependent protein interactions.

Keywords: Toll-like receptors, TIR domains; signaling complexes, peptide inhibitors of protein interactions

НАРУШЕНИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ОТНОШЕНИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ИПСК И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Обзор

© 2024 М.Е. Богомякова^{1,2*}, А.Н. Богомазова^{1,2}, М.А. Лагарькова^{1,3}

¹ ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России,
119435 Москва, Россия; электронная почта: targbog@rcrpt.ru

² ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,
Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
119435 Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 12.10.2023

После доработки 21.12.2023

Принята к публикации 13.02.2024

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) благодаря своей способности к дифференцировке в любой тип соматических клеток являются многообещающим инструментом для решения проблем трансплантационной медицины. Более того, технология репрограммирования делает возможным получение персонализированного, то есть пациент-специфического, клеточного продукта, при трансплантации которого не должны возникать проблемы, связанные с гистосовместимостью пересаженных тканей и органов. В то же время противоречивые сведения о главном преимуществе производных ИПСК аутологичного происхождения – отсутствии иммуногенности – все же ставят под сомнение применение таких клеток вне протоколов иммуносупрессивной терапии. Этот обзор посвящен иммуногенным свойствам сингенных и аутологичных ИПСК и их производных, а также рассмотрению возможных причин нарушения их иммунологической толерантности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, иммунный ответ, иммуногенность, иммунотолерантность, Т-клетки, NK-клетки, дифференцировка.

DOI: 10.31857/S0320972524050036 EDN: YPENAB

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека, к которым относятся эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), обладают способностью к неограниченной пролиферации и дифференцировке практически в любой тип соматических клеток [1, 2]. Эти уникальные свойства делают их привлекательным и многообе-

щающим инструментом для моделирования различных заболеваний и разработки лекарственных препаратов [3, 4]. Особая надежда возлагается на дифференцированные производные ПСК как на источник материала для клеточной терапии, что должно решить проблему нехватки донорских органов и тканей [5].

Сегодня о повсеместном внедрении технологии ПСК в клиническую практику говорить еще рано. С момента открытия ЭСК человека в 1998 г.

Принятые сокращения: B2M – бета-2-микроглобулин; ГМК – гладкомышечные клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; ПЭС – пигментный эпителий сетчатки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; HLA – человеческий лейкоцитарный антиген; KIR – иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток; NK – натуральные киллеры.

* Адресат для корреспонденции.

прошло всего 26 лет [1], и на текущий момент продолжают активные работы по совершенствованию протоколов дифференцировки ПСК в специализированные клетки и получению трехмерных структурированных тканей *in vitro* [4]. Высокая стоимость технологии – еще один камень преткновения на пути к масштабной клеточной терапии. По сравнительно недавним оценкам, получение одной линии ИПСК в условиях надлежащей производственной практики (*good manufacturing practice*, GMP), согласно требуемым стандартам качества, обходится примерно в 800 000 долларов США [4]. Еще одним тормозящим фактором является длительное время, необходимое для получения новой линии ИПСК, а также для ее последующей дифференцировки в желаемый тип клеток [6]. Кроме того, пока четко не определены параметры клинической стандартизации, которые должны применяться как к ПСК [7], так и к их дифференцированным производным [8]. В связи с этим терапия на основе пациент-специфических ИПСК вряд ли найдет широкое распространение по крайней мере в ближайшие годы. Интересно отметить, что клеточные продукты, полученные всего из пяти линий ЭСК, были использованы почти в половине клинических исследований производных ПСК, тем не менее число исследований клеток, полученных из ИПСК, значительно увеличилось за последние несколько лет [9]. В России, согласно Федеральному закону № 180, запрещено использование ЭСК для разработки, производства и применения биомедицинских клеточных продуктов, поэтому в клинической практике возможно применение только производных ИПСК.

Несмотря на очевидные экономические преимущества, связанные с производством клеточных продуктов на основе аллогенных производных ПСК, проблема гистосовместимости донора и реципиента, связанная с высоким полиморфизмом генов главного комплекса гистосовместимости (МНС/HLA), остается нерешенной. Для предотвращения иммунного отторжения при трансплантации аллогенных тканей и органов обязательно пожизненное применение иммуносупрессивной терапии, которая часто сопряжена с побочными эффектами или может быть неэффективна [10]. Изначально считалось, что персонализированная терапия на основе аутологичных производных ИПСК сможет обойти проблему гистосовместимости [11]. Однако некоторые группы исследователей сообщают, что иммунный ответ против сингенных и аутологичных ИПСК все-таки возможен, таким образом, подвергая сомнению главное преимущество аутологичных ИПСК – отсутствие иммуногенности [12–15]. Впрочем, причины данного феномена до сих пор тщательно не изучены. В данном обзоре мы постарались пролить свет на механиз-

мы нарушения толерантности иммунной системы по отношению к аутологичным ИПСК. Стоит подчеркнуть, что, несмотря на неизбежность, понимание реакции основных эффекторных клеток трансплантационного иммунитета – Т-клеток и НК-клеток (натуральных киллеров) – на различные типы клеток, а в будущем и тканей, полученных из ИПСК, поможет найти подходы к их подавлению и будет иметь большое значение для успешного развития трансляционной медицины.

ИММУНОГЕННОСТЬ СИНГЕННЫХ И АУТОЛОГИЧНЫХ ИПСК И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К Т-КЛЕТКАМ

Сама возможность, что клетки, дифференцированные из аутологичных ИПСК, могут спровоцировать возникновение иммунного ответа, широко не рассматривалась до публикации Zhao et al. [12]. В этом исследовании авторы показали, что подкожное введение ИПСК сингенным, т.е. линейным, мышам приводило к образованию тератом, в которых выявлялись зоны инфильтрации Т-клетками, что сопровождалось последующим некрозом и регрессом сформированных тератом. При этом тератомы, образованные после введения сингенных ЭСК с тем же генетическим фоном, значительно реже вызывали иммунный ответ. Авторы отметили, что частота отторжения тератом из ИПСК значительно снижалась при использовании эпизомных векторов для репрограммирования исходных соматических клеток, хотя в последнем случае сформированные тератомы все равно отторгались с частотой 10–20%, и большинство из них были также инфильтрированы Т-клетками. Тем не менее данные результаты были встречены в научном сообществе с некоторым скептицизмом во многом в связи с тем, что недифференцированные ИПСК не рассматриваются в качестве источника клеток для клинического применения [11].

Более поздние работы оказались достаточно противоречивыми, хотя большая часть все-таки свидетельствовала об отсутствии иммуногенности сингенных производных ИПСК. Об обратном сообщалось лишь в единичных исследованиях. Так, дополнительные доказательства иммуногенности клеток, полученных из сингенных ИПСК, представили в 2013 г. Araki et al. [16]. Авторы обнаружили аналогичную частоту отторжения тератом, сформированных как сингенными ИПСК, так и ЭСК. Было высказано предположение, что иммунный ответ на тератомы потенциально связан с экспрессией генов, регулирующих плюрипотентность. В частности, авторы опирались на ранее полученные данные, что транскрипционный фактор Oct4

может иметь иммуногенные свойства [17]. Кроме того, Araki et al. [16] впервые обнаружили признаки иммунного ответа на терминально дифференцированные производные сингенных ИПСК. При трансплантации кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, авторы наблюдали у сингенных мышей значительный уровень инфильтрации Т-клетками трансплантата.

Еще в одной работе сообщали о полной выживаемости тератом, сформированных сингенными ПСК, хотя в некоторых тератомах все-таки наблюдали зоны инфильтрации Т-клетками [18]. Далее, авторы сравнили иммуногенность эндотелиальных клеток, гепатоцитов и нейрональных предшественников, дифференцированных из сингенных ЭСК и ИПСК. Дифференцированные производные ИПСК не вызвали признаков специфического Т-клеточного ответа ни в *in vitro* модели, ни при трансплантации сингенным мышам. Таким образом, Guha et al. [18] показали, что степень иммуногенности ПСК может снижаться при дифференцировке. К такому же выводу пришли авторы другой работы [19]. Анализ функционального состояния иммунных клеток, обнаруженных в зоне трансплантации, показал, что тератомы преимущественно инфильтрированы цитотоксическими Т-клетками, в то время как эндотелиальные клетки, дифференцированные из ИПСК, – регуляторными Т-клетками и макрофагами [19].

В 2013 г. было опубликовано исследование, в котором сравнивали иммунный ответ на аутологичную и аллогенную трансплантацию дофаминергических нейронов среднего мозга, дифференцированных из ИПСК, в мозг приматов [20]. Авторы обнаружили, что значительное количество микроглии и Т-клеток инфильтрировало аллотрансплантаты, в то время как аутологичные нейроны вызвали минимальную реакцию иммунных клеток. Похожая работа была проведена на нейрональных предшественниках ИПСК, где также не наблюдали существенной инфильтрации в зонах трансплантации аутологичных клеток [21, 22]. Интересно отметить, что Morizane et al. [20] в некоторых случаях все-таки детектировали ограниченный Т-клеточный ответ на аутологичные дофаминергические нейроны, если те были дифференцированы из ИПСК, полученных с помощью ретровирусной трансфекции. Если ИПСК были получены репрограммированием с помощью эписомных векторов, то их производные не приводили к иммунному ответу аутологичных Т-клеток. Эти данные могут свидетельствовать о том, что вирусная интеграция факторов плюрипотентности при получении ИПСК может влиять на иммуногенность клеточных продуктов.

Стоит отметить некоторые ограничения работы Morizane et al. [20]. Во-первых, провести анализ

иммунного ответа авторы смогли только после эвтаназии животных примерно через 3–4 месяца после трансплантации. Были предприняты попытки отследить иммунные реакции в динамике с помощью позитронно-эмиссионной томографии, а также путем измерения цитокинов в крови и спинномозговой жидкости, однако полученные результаты обладали высокой вариабельностью и слабо коррелировали с постмортальными гистологическими данными. Возможно, дополнительные временные точки могли бы точнее определить вероятность иммунного ответа на трансплантацию аутологичных производных ИПСК. Во-вторых, хотя авторы и продемонстрировали, что степень иммунного ответа была выше при трансплантации аллогенных дофаминергических нейронов, однако их отторжения не наблюдали даже при отсутствии иммуносупрессивной терапии. Данный феномен можно объяснить тем, что мозг является иммуопривилегированным органом. Более того, эти данные согласуются с клиническими наблюдениями за длительной выживаемостью аллогенных дофаминергических нейронов, полученных из фетального материала, у пациентов с болезнью Паркинсона, которые получали только кратковременную иммуносупрессию или вообще ее не получали [23, 24].

Все предыдущие работы описывали иммуногенность ИПСК животных – мышей и приматов. Однако для клинического применения очень важно изучение иммуногенности аутологичных производных ИПСК человека. В 2015 г. Zhao et al. [13] изучили этот вопрос, используя гуманизированную мышиную модель с реконструированной иммунной системой человека. Они обнаружили зоны Т-клеточной инфильтрации и некроз тканей в большинстве тератом, сформированных из ИПСК. Тем не менее степень иммунного ответа на аутологичные ИПСК оказалась слабее, чем на аллогенные ЭСК. В связи с этим авторы предположили, что только некоторые типы производных ИПСК могут вызвать отторжение. Кроме того, глубокое секвенирование репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) инфильтрующих лимфоцитов выявило их олигоклональный характер, что свидетельствовало об антиген-специфичном ответе Т-лимфоцитов на аутологичные ИПСК. В случае аллогенных ЭСК был выявлен поликлональный репертуар TCR.

Для выявления потенциально иммуногенных тканей были проанализированы гистологические срезы тератом, инфильтрированных Т-клетками. Zhao et al. [13] обнаружили, что десмин-положительные гладкомышечные клетки (ГМК) значительно чаще окружены инфильтрующими Т-лимфоцитами, в то время как клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) практически не были инфильтрированы Т-лимфоцитами. Далее, авторы

провели сравнительный анализ иммуногенности двух типов клеток – ГМК и ПЭС. Оказалось, что аутологичные ГМК были более иммуногенными в связи с deregulated экспрессией опухолеассоциированных генов, в частности, *HORMAD1* и *ZG16*. Эктопическая экспрессия *ZG16* в клетках ПЭС приводила к значимому Т-клеточному ответу в аутологичных реципиентах.

Таким образом, данные об иммуногенности сингенных и аутологичных производных ИПСК по отношению к Т-клеткам достаточно противоречивы. Тем не менее большинство из них все-таки обнадеживают, как, например, сравнительно недавние работы, проведенные на моделях свиней [25], обезьян [26], гуманизированных мышей [27], а также *in vitro* [15, 28], в которых продемонстрирована толерантность иммунной системы в отношении клеточных продуктов, полученных из ИПСК.

ИММУНОГЕННОСТЬ СИНГЕННЫХ И АУТОЛОГИЧНЫХ ИПСК И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К НК-КЛЕТКАМ

В то время как основная функция Т-лимфоцитов – распознавание чужеродных молекул, в том числе неопитопов, НК-клетки имеют другой принцип иммунологического распознавания. Классическая гипотеза распознавания «отсутствие своего» предполагает, что НК-клетки распознают и уничтожают все клетки, в которых отсутствуют молекулы HLA (человеческий лейкоцитарный антиген) I класса [29]. Современное представление является более сложным: считается, что активация НК-клеток определяется взаимодействием сигналов, поступающих от двух типов рецепторов на их поверхности: активирующих и ингибирующих [30]. Превалирование ингибирующих сигналов при взаимодействии с клеткой-мишенью не нарушает анергию НК-клеток, в то время как превалирование активирующих – запускает их цитотоксическую программу. В свою очередь, превалирование активирующих сигналов может быть обусловлено как повышением количества (уровня) лигандов активирующих рецепторов НК-клеток в клетках-мишенях, так и снижением ингибирующих лигандов, главным образом молекул HLA I класса. Подобная разбалансировка в физиологических условиях определяется различными патологическими процессами, в том числе процессами онкогенеза, вирусными и бактериальными инфекциями, а также при стрессе [31].

Активность НК-клеток против недифференцированных ИПСК, в том числе сингенных и аутологичных, ранее освещалась в ряде исследований, выполненных *in vitro* [32, 33]. В целом, низкая экс-

прессия молекул HLA I класса является характерным признаком ПСК [34], поэтому высокая активность НК-клеток обусловлена в первую очередь нехваткой ингибирующих сигналов. Однако в некоторых работах также косвенно отмечают вклад активирующих лигандов. Так, Frenzel et al. [35] обнаружили, что предварительное блокирование активирующего рецептора NKG2D существенно снижает цитотоксичность НК-клеток при сокультивировании с сингенными ЭСК мыши. В другой работе было показано, что НК-клетки с нокаутом гена *Klrk1*^{-/-}, кодирующего рецептор NKG2D, лизировали значительно меньший процент ПСК, чем НК-клетки дикого типа [36]. Интересно, что для ПСК человека в экспериментах с блокирующими антителами была показана роль другого активирующего рецептора – DNAM-1 [33]. По-видимому, высокая чувствительность ПСК к действию НК-клеток обусловлена одновременно двумя факторами: низкой экспрессией молекул HLA-I и повышенной экспрессией активирующих лигандов.

Что касается иммунного ответа *in vivo*, то известно, что НК-клетки ограничивают формирование тератом после подкожной инъекции как сингенных [37], так и аутологичных ИПСК [38]. В целом, полученные данные могут свидетельствовать о том, что остаточные ПСК, которые потенциально могли остаться в трансплантате среди дифференцированных клеток, не смогут сформировать тератомы и будут отторгнуты НК-клетками. Сообщается даже, что НК-клетки могут выступать в качестве внутреннего барьера в случае репрограммирования как *in vitro*, так и *in vivo* [39]. Было показано, что НК-клетки способны распознавать и элиминировать частично репрограммированные клетки, которые, как оказалось, экспрессируют лиганды активирующих рецепторов NKG2D и DNAM-1. Далее, используя трансгенную линию мышей [40], экспрессирующую под воздействием доксициклина четыре репрограммирующих фактора коктейля Яманаки (OSKM), авторы показали, что частичное *in vivo* репрограммирование идет эффективнее при деpleции НК-клеток и, наоборот, существенно понижается при их адоптивном переносе [39].

Ответ сингенных и аутологичных НК-клеток на дифференцированные производные ИПСК изучен достаточно слабо. Так, сообщалось о повышенной чувствительности гепатоцито-подобных клеток, дифференцированных из мышинных ИПСК (iPS-HLC), к действию сингенных НК-клеток *in vitro* [41]. При этом сингенные соматические клетки – гепатоциты – практически не вызывали проявления эффекторных функций со стороны НК-клеток. Интересно отметить, что в этой работе также был определен иммунный ответ НК-клеток на гепатоцито-подобные клетки, полученные

из ЭСК (ES-HLC). Авторы обнаружили, что процент лизированных ES-HLC был практически в 2 раза выше, чем лизированных iPS-HLC. Оказалось, что ES-HLC, но не iPS-HLC, экспрессируют лиганды активирующего рецептора NKG2D. Кроме того, нокаут гена, кодирующего рецептор NKG2D в NK-клетках, достоверно снижал процент лизированных ES-HLC, но не iPS-HLC. Таким образом, эта работа еще раз подтвердила более ранние данные о том, что элиминация ПСК мыши и их дифференцированных производных преимущественно реализуется через взаимодействие рецептора NKG2D с его лигандами [35, 36, 42].

В другой работе на мышинной модели изучали ответ NK-клеток на трансплантацию кардиомиоцитов, дифференцированных из сингенных ИПСК (miPSC-CMs) [14]. Было показано, что выживаемость трансплантированных подкожно miPSC-CMs значительно выше в мышцах с деплецией NK-клеток. В контрольных мышцах, помимо инфильтрации NK-клетками областей трансплантата, были выявлены признаки дегрануляции NK-клеток, а также отторжения miPSC-CMs. Анализ экспрессии NK-клеточных лигандов показал, что miPSC-CMs слабо экспрессируют молекулы МНС I класса, а также окрашиваются антителами к лигандам рецепторов NKG2D и DNAM-1. Блокирование рецепторов NKG2D и DNAM-1 или увеличение экспрессии МНС-I путем предварительной обработки IFN γ снижало цитотоксические свойства NK-клеток *in vitro*, а также уменьшало инфильтрацию NK-клеток в трансплантированные области и некроз miPSC-CMs *in vivo*.

В то же время иммуногенность производных ИПСК человека по отношению к NK-клеткам изучалась достаточно мало. Преимущественно работы были связаны с созданием низкоиммуногенных, или «универсальных», линий ИПСК. Полагают, что этот подход может стать альтернативой привычной иммуносупрессивной терапии, поскольку производные таких клеток будут подходить любому реципиенту [43, 44]. Для создания гипоиммуногенных клеток наиболее часто применяется стратегия полного «выключения» экспрессии молекул HLA как I, так и II классов. Для подавления экспрессии HLA I класса обычно нокаутируют ген бета-2-микроглобулина (*B2M*), кодирующий легкую субъединицу, необходимую для стабильного формирования гетеродимера [45–47]. Для подавления экспрессии HLA II класса нокаутируют ген *СИТА*, кодирующий транскрипционный фактор, необходимый для экспрессии HLA-II [48–50]. Клетки, лишённые молекул HLA, должны стать полностью невидимыми для Т-клеток реципиента (как CD8 $^{+}$, так и CD4 $^{+}$) [51]. С другой стороны, элиминация молекул HLA I класса приводит к тому, что производные ПСК становятся чувствительными к цитоток-

сическим свойствам NK-клеток [46, 52, 53]. Поэтому получение линий ПСК с пониженной иммуногенностью обычно состоит из двух шагов: сначала должна быть подавлена экспрессия HLA, а затем добавлены дополнительные факторы, которые позволят избежать NK-клеточного ответа [53–57].

A priori исследования низкоиммуногенных производных ИПСК проводили на аллогенной модели. В целом, поскольку NK-клетки не способны распознавать чужеродные молекулы, оценку толерантности производных ИПСК по отношению к иммунной системе можно проводить с использованием NK-клеток аллогенного происхождения, однако с одним условием. Известно, что аллореактивность со стороны NK-клеток теоретически может быть вызвана несовпадением лигандов семейства KIR (иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток) по механизму распознавания «отсутствие своего». Все аллели HLA-C делятся на две группы – HLA-C1 и HLA-C2 – в зависимости от последовательности аминокислот в позициях 77 и 80 альфа-цепи, что определяет их способность связываться с рецепторами NK-клеток KIR2DL3 и KIR2DL1 соответственно [58]. По этому принципу все доноры и реципиенты могут быть поделены на следующие группы: HLA-C1/C1, HLA-C1/C2 и HLA-C2/C2. NK-Клетки в процессе лицензирования, или «обучения» в процессе созревания, обретают толерантность к определенному набору аллелей HLA-C на собственных клетках. Условия ответа NK-клеток на несовпадение аллелей HLA-C при взаимодействии с KIR2DL-рецепторами представлено на рис. 1. Поэтому в случае использования в качестве клеток-мишеней производных, дифференцированных из HLA-гомозиготных линий ИПСК, гетерозиготные HLA-C1/C2 NK-клетки будут отвечать на отсутствие любого из KIR-лигандов, что было подтверждено в работе Ichise et al. [59]. Авторы показали, что HLA-C1/C2 NK-клетки, выделенные из крови здоровых доноров, лизируют Т-клетки и эндотелиальные клетки, дифференцированные из HLA-C1/C1 ИПСК [59]. В свою очередь, эктопическая экспрессия HLA-C2 в дифференцированных производных HLA-C1/C1 приводила к снижению NK-клеточного ответа. Помимо аллореактивности на несовпадение лигандов к KIR2DL-рецепторам, еще сообщается о реакции NK-клеток на отсутствие лигандов к рецепторам KIR3DL1 (эпитоп Bw4) и KIR3DL2 (аллели HLA-A3, A11) [60]. Таким образом, аллогенная модель может быть использована для оценки иммуногенности производных ИПСК по отношению к NK-клеткам, однако при условии типирования доноров, принимающих участие в исследовании.

Интересно, что в некоторых работах с гипоиммуногенными производными ПСК не отмечалось существенной разницы в ответе NK-клеток

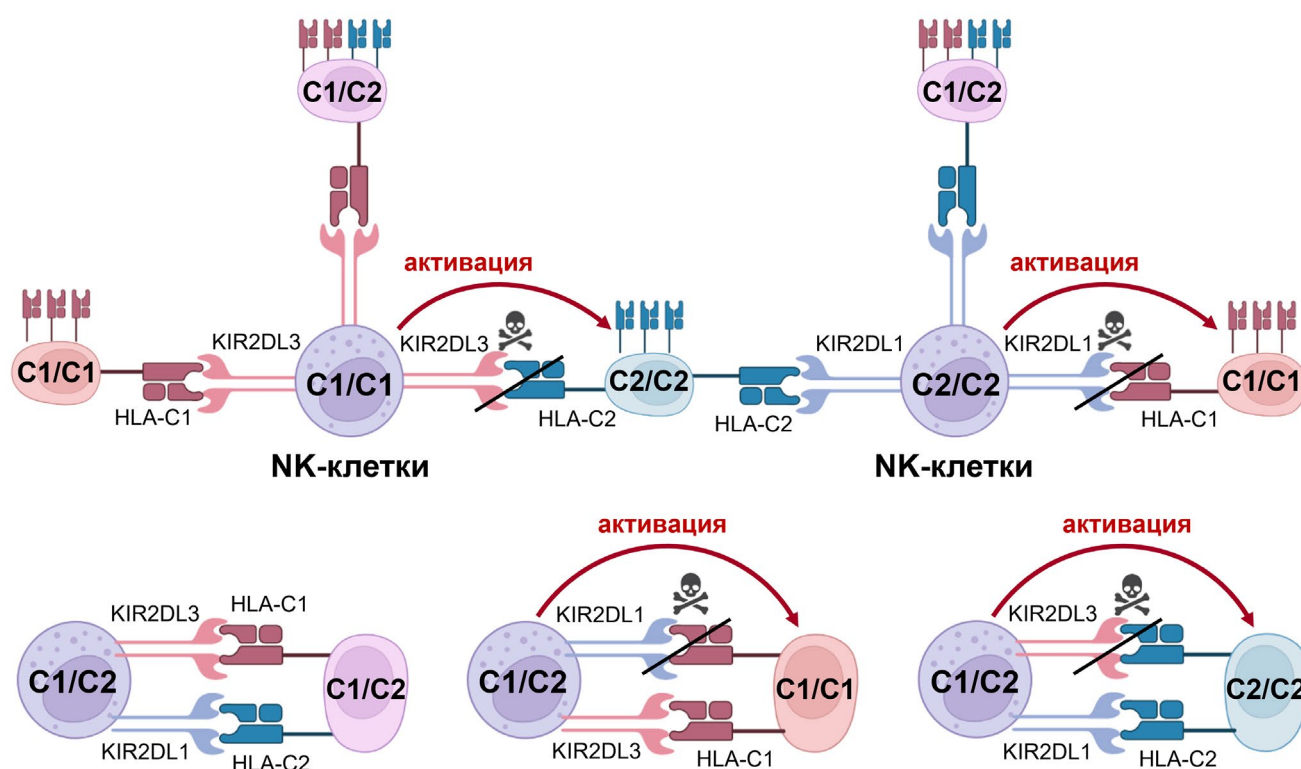


Рис. 1. Механизм аллореактивности NK-клетками на примере несоответствия лигандов для KIR2DL-рецепторов. HLA-C1/C1 NK-клетки активируются при взаимодействии с HLA-C2/C2 клетками-мишенями (нет ингибирующего сигнала через KIR2DL3-рецептор). HLA-C2/C2 NK-клетки активируются при взаимодействии с HLA-C1/C1 клетками-мишенями (нет ингибирующего сигнала через KIR2DL1-рецептор). HLA-C1/C2 NK-клетки активируются при взаимодействии с HLA-C1/C1 клетками-мишенями (нет ингибирующего сигнала через KIR2DL1-рецептор) и при взаимодействии с HLA-C2/C2 клетками-мишенями (нет ингибирующего сигнала через KIR2DL3-рецептор)

на нокаутные производные ПСК и производные ПСК дикого типа. Правда, стоит отметить, что типирование исходных клеток, а также доноров, принимающих участие в исследовании, во всех этих работах проведено не было. Так, различия в цитотоксичности и количестве CD107a⁺ (т.е. дегранулировавших NK-клеток) были статистически незначимыми при сокультивировании с ГМК дикого типа и ГМК, не экспрессирующими HLA I класса [55]. В свою очередь, клетки ПЭС дикого типа провоцировали крайне высокую NK-клеточную цитотоксичность, которая была сравнима с нокаутными производными ПСК [50]. При этом процент дегранулировавших NK-клеток также не различался между исходными и нокаутными клетками ПЭС, хотя и сильно варьировал в зависимости от донора. Высокую цитотоксичность NK-клеток наблюдали и для кардиомиоцитов, дифференцированных из ЭСК [57]. Эндотелиальные клетки вызвали одинаковый уровень дегрануляции NK-клеток вне зависимости от экспрессии HLA I класса, хотя цитотоксичность NK-клеток была выше против производных ИПСК с нокаутом гена *B2M* [61]. Стоит отметить, что в вышеупомянутых исследованиях авторы не фокусирова-

лись на ответе NK-клеток против производных дикого типа, а, скорее, описали отсутствие гиперчувствительности к NK-клеткам для HLA-негативных клеток.

В своей недавней работе мы также обнаружили, что фибробластоподобные производные ИПСК с нокаутом гена *B2M* (Δ iPS-fibro) демонстрируют ту же степень чувствительности к действию аллогенных и аутологичных NK-клеток, что и фибробластоподобные клетки дикого типа – iPS-fibro [15]. Однако, в отличие от других авторов, были использованы исходные изогенные фибробласты в качестве отрицательного контроля реакции NK-клеток. Это сравнение позволило обнаружить отсутствие полной иммунологической толерантности дифференцированных производных ИПСК к аутологичным NK-клеткам. С помощью транскриптомного анализа был выявлен значительный дисбаланс NK-клеточных лигандов в iPS-fibro. По сравнению с исходными фибробластами, в iPS-fibro одновременно наблюдалось значительное снижение экспрессии молекул HLA-I и повышение экспрессии лигандов к семейству активирующих рецепторов DNAM-1 и NKG2D. Далее, в работе было показано, что баланс NK-клеточных лигандов в дифферен-

цированных производных ИПСК может быть возвращен в равновесное состояние за счет предварительной обработки клеточных культур IFN γ [15].

В еще одной работе отмечалась чувствительность почечных производных ИПСК к действию аутологичных NK-клеток [28]. Авторы обнаружили, что процент активированных NK-клеток был ниже при сокультивировании с предшественниками проксимальных эпителиальных клеток, чем с более «зрелыми» производными ИПСК. Однако эти различия подробно в работе не обсуждаются. Судя по данным РНК-секвенирования, в ходе длительного культивирования в проксимальных эпителиальных клетках растет уровень транскриптов HLA I класса, что согласуется с данными, полученными на iPS-fibro [15], а также некоторых активирующих NK-клеточных лигандов, в частности, *MICA* и *NECTIN2*. По-видимому, это обуславливает превалирование активирующих сигналов и реализации цитотоксической программы в NK-клетках. Также интересно отметить, что, в отличие от более ранней работы Kruse et al. [33], высокая активность NK-клеток против недифференцированных ИПСК человека в работе Rossbach et al. [28] не наблюдалась.

Надо отметить, что роль NK-клеток при трансплантации солидных органов оценивается довольно противоречиво [60, 62]. Существуют свидетельства того, что некоторые субпопуляции NK-клеток могут играть роль в регуляции толерантности к аллотрансплантату, однако чаще NK-клетки участвуют в отторжении аллотрансплантата при посредстве Т-клеток и антител [63]. При отсутствии иммуносупрессивной терапии, которая снижает цитотоксическую активность и регулирует свойства дегрануляции, активированные NK-клетки продуцируют IFN γ , что может способствовать развитию хронического воспаления и усилению иммунного ответа, опосредованного в первую очередь Т-клетками [64]. Таким образом, иммуногенность производных ИПСК по отношению к NK-клеткам также учитывается при использовании клеточного продукта, дифференцированного из ИПСК, в целях регенеративной медицины.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ИММУННОГО ОТВЕТА НА АУТОЛОГИЧНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ИПСК

До сих пор нет четкого понимания, что является ключевым фактором иногда наблюдавшейся иммуногенности производных ИПСК аутологичного происхождения. В целом, ответ со стороны Т-клеток может быть объяснен формированием неоантигенов и aberrантной экспрессией генов (рис. 2, а), а ответ со стороны NK-клеток – нару-

шением баланса активирующих и ингибирующих лигандов в клетках-мишенях (рис. 2, б).

Одним из первых высказанных предположений о причинах иммуногенности ИПСК было использование разных репрограммирующих векторов. Еще в первой работе было показано, что тератомы, сформированные сингенными ИПСК, отторгались чаще при использовании ретровирусных векторов в качестве метода репрограммирования [12]. В свою очередь, использование эпизомных конструкций сильно снижало процент отторгнутых тератом. Похожие результаты были получены при трансплантации дофаминергических нейронов в мозг приматов [20]. Ретровирусные и лентивирусные конструкторы преимущественно интегрируют в транскрипционно активные сайты, что может вызывать мутации, геномную нестабильность и хромосомные aberrации. Кроме того, есть сведения о том, что последующая активация трансенов коррелирует с aberrантной продукцией иммуногенного белка Oct4 [17].

В целом, предполагается, что иммуногенность линий, полученных «неинтеграционным» способом, должна быть ниже в сравнении с линиями, полученными с помощью ретро- и лентивирусной трансфекции, однако подробных исследований на этот счет никто не проводил. Данные, посвященные сравнению геномной нестабильности в линиях ИПСК, полученных разными способами репрограммирования, достаточно противоречивы. Так, одни исследователи сообщают о схожем количестве точечных мутаций [65], а также вариаций числа копий генов CNVs (copy number variations) [66], а другие – наоборот, показывали вдвое меньшее число мутаций в безынтеграционных ИПСК [67, 68], а значит, и меньший шанс формирования потенциальных неоэпитопов. Частота генетических вариаций также была низкой в ИПСК человека, полученных с помощью эпизомных конструкций [69]. Стоит отметить, что в последние годы появились и другие способы безынтеграционного репрограммирования, в частности, путем индукции эндогенных плюрипотентных генов с помощью системы CRISPR/Cas9 [70], однако дополнительных сведений об их геномной нестабильности, насколько нам известно, представлено не было. Так или иначе, именно безынтеграционные способы репрограммирования в настоящее время являются наиболее безопасными и эффективными для дальнейшего клинического применения [4].

Наиболее часто различия в иммуногенности объясняют мутациями и, следовательно, формированием неоэпитопов [71]. Во-первых, это могут быть мутации, которые существовали в исходных соматических клетках. Так, фибробласты – один из наиболее часто используемых источников клеток для репрограммирования [72]. Сообщается, что му-

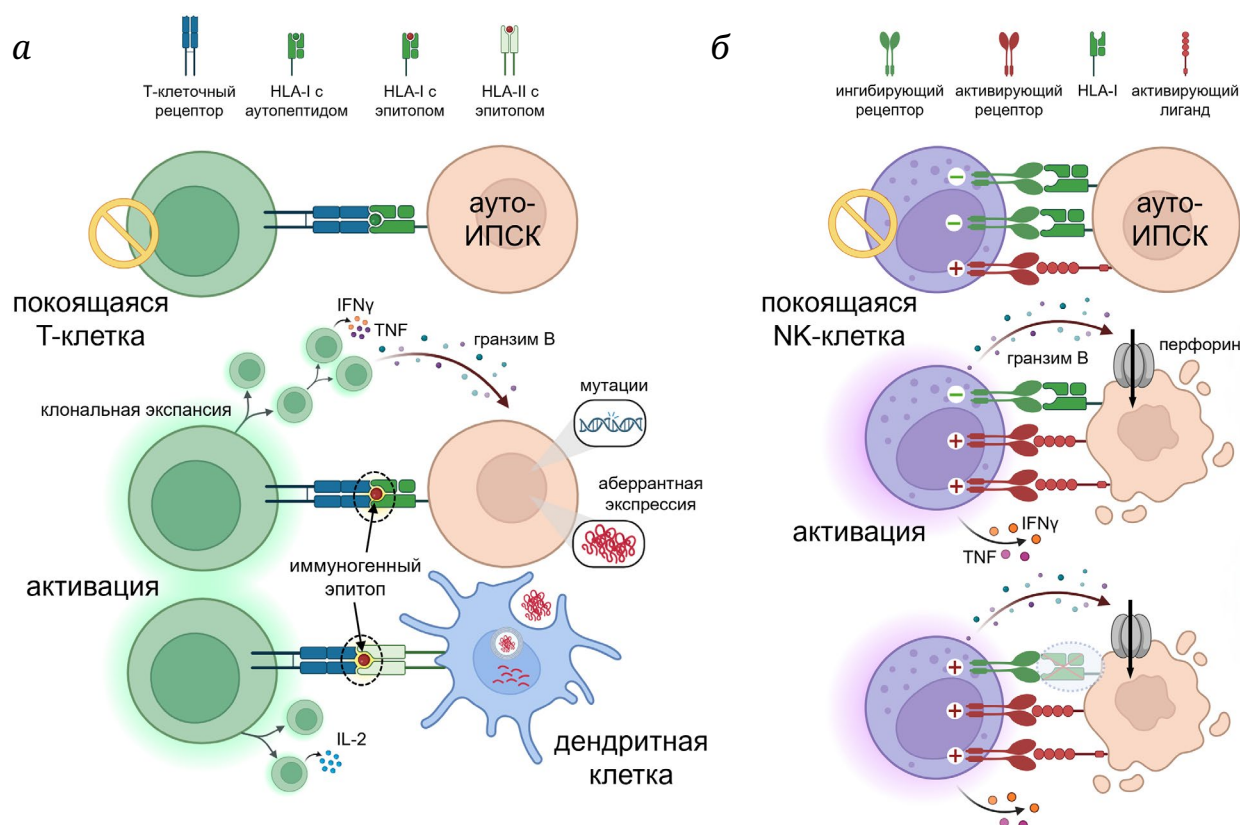


Рис. 2. Иммуногенность аутологичных ИПСК и их производных. *а* – Ответ Т-клеток на аутологичные ИПСК и их дифференцированные производные может быть обусловлен распознаванием иммуногенных неоэпитопов, сформированных в результате возникновения мутаций или aberrантной экспрессии иммуногенных генов. *б* – Ответ НК-клеток на аутологичные ИПСК и их дифференцированные производные может быть обусловлен дисбалансом НК-клеточных лигандов в клетках-мишенях. Превалирование активирующих сигналов приводит к запуску цитотоксической программы НК-клеток

тации, приобретенные вследствие УФ-индуцированного мутагенеза, присутствуют в ~50% ИПСК человека, репрограммированных из фибробластов кожи [73]. Такие мутации характеризуются заменами C-to-T или CC-to-TT и часто наблюдаются в меланомах [74]. В качестве альтернативы фибробластам могут выступать и другие соматические клетки. Например, сообщается, что ИПСК, полученные из гемопоэтических стволовых клеток, содержат значительно меньше точечных мутаций, инсерций и делеций, чем ИПСК, полученные из фибробластов кожи [75]. Также в качестве источника клеток для репрограммирования очень часто используют клетки периферической крови. Rouhani et al. [76] показали, что ИПСК, полученные из клеток крови, значительно реже содержат мутации, чем ИПСК, полученные из фибробластов. В то же время есть данные о том, что мутации в клетках крови также накапливаются с возрастом [77]. Так, работа с использованием 16 линий ИПСК, полученных из клеток крови доноров в возрасте 21–100 лет, продемонстрировала, что частота мутаций в ИПСК линейно увеличивается с возрастом доноров [78]. Помимо этого, частота мутаций митохон-

дриальной ДНК в ИПСК человека также увеличивается с возрастом донора, и это может привести к метаболическим дефектам в ИПСК [79]. И хотя *de novo* мутации в митохондриальной ДНК – в целом редкое явление для ИПСК [80, 81], они могут приводить к образованию иммуногенных неоэпитопов и провоцировать иммунный ответ даже при аутологичной трансплантации, как было показано в одной из недавних работ [82].

Таким образом, соматические клетки молодых доноров могут иметь сравнительное преимущество при создании ИПСК. Это также подтверждает и недавняя работа, в которой из эритробластов пуповинной крови были получены ИПСК, не содержащие мутаций в белок-кодирующих участках генома [83]. Кроме того, возраст доноров может сказываться на культуральных свойствах ИПСК. Так, показано, что ИПСК, полученные из более старых мышей, пролиферировали хуже, чем ИПСК, полученные из более молодых мышей [84].

Мутации в ИПСК могут также возникать в процессе репрограммирования. Такие мутации обычно схожи с мутациями, вызванными окислительным стрессом (замены C-to-A), и преимущественно

обнаруживаются в конденсированных ламина-ассоциированных хромосомных доменах, расположенных на периферии ядра [85]. Более ранние работы свидетельствуют о том, что до 75% точечных мутаций в ИПСК возникают во время репрограммирования [86, 87]. При этом наличие разных мутаций для изогенных клонов ИПСК, а также меньшая частота точечных мутаций в изогенных ЭСК, предположительно, указывают на то, что такие мутации не были получены от исходных соматических клеток [67]. Дополнительные сведения о мутациях, возникающих в ходе репрограммирования, были представлены в работе Rouhani et al. [88]. Авторы идентифицировали уникальные мутации в изогенных линиях ИПСК, которые были получены из эндотелиальных предшественников моноклонального происхождения.

Полагают, что мутации возникают на самых ранних стадиях репрограммирования перед первым делением клетки после внесения репрограммирующих факторов или сразу же после первого или второго деления [67, 83]. Авторам последней работы также удалось обнаружить, что временный дефицит компонентов чекпойнта клеточного цикла G1/S на начальной стадии процесса репрограммирования приводит к накоплению мутаций [83]. В то же время данные о мутациях, возникающих в ходе репрограммирования, достаточно неоднозначны. В более поздних работах было показано, что до 90% различных SNP и инделов в ИПСК происходят от соматических клеток [73, 89]. Более того, Kosanke et al. [90] показали, что только 2% мутаций, выявленных в ИПСК, не были обнаружены в исходных эндотелиальных клетках, использованных для репрограммирования.

Третья причина возникновения мутаций в ИПСК – длительное культивирование. Такие мутации образуются стохастически, и поэтому являются значительно более редкими, чем предсуществующие соматические мутации или мутации, возникшие в результате репрограммирования. Полагают, что мутации, вызванные длительным культивированием, могут обеспечивать пролиферативные преимущества [91, 92]. Так, в одной линии ИПСК на поздних пассажах было обнаружено возникновение четырех дополнительных точечных мутаций по сравнению с клетками ранних пассажей [86]. Тем не менее, по последним данным, частота и спектр мутаций, возникающих в ИПСК в ходе культивирования, не отличается от мутаций, возникающих в ходе прегастрюляционной стадии эмбриогенеза [93]. В другой работе было показано, что при длительном культивировании *in vitro* скорость накопления мутаций ниже в ИПСК, чем в стволовых клетках кишечника и печени [94]. Авторы обнаружили, что более чем треть мутаций вызвана заменами C-to-A, которые ассоциированы

с окислительным стрессом. Культивирование клеток в условиях гипоксии (3% кислорода) в течение трех месяцев значительно снижало количество одонуклеотидных замен. Похожие результаты были получены и при культивировании ЭСК: авторы наблюдали более чем 2-кратное снижение частоты мутаций в условиях гипоксии [95]. Полученные данные могут быть использованы для оптимизации условий культивирования ИПСК.

Для клинического применения крайне важно понимать, как мутации могут влиять на фенотип ИПСК, в том числе – могут ли они приводить к процессам канцерогенеза. Есть работы, свидетельствующие о том, что точечные мутации преимущественно обнаруживают в генах, ассоциированных с раком [86]. Повторяющиеся мутации в гене опухолевого супрессора *TP53* были обнаружены как при полноэкзомном секвенировании ЭСК, так и при анализе общедоступных данных РНК-секвенирования 120 линий ПСК [92]. Помимо мутаций в *TP53*, повторяющиеся мутации обнаруживают и в других опухолеассоциированных генах, например, в *CDK12*, *EGFR* и *PATZ1* [96, 97]. Недавнее исследование выявило мутации в гене *BCOR*, которые часто обнаруживают при гематологических заболеваниях (более чем в 25% проанализированных линий ИПСК) [76]. Напротив, в других исследованиях связь с опухолеассоциированными генами не была обнаружена [65, 69, 73, 94]. В целом, большинство точечных мутаций обнаруживают в областях неактивного хроматина, поэтому маловероятно, что они смогут вызвать нежелательные эффекты. Однако уникальные мутации, которые обнаруживают в разных изогенных клонах ИПСК, обычно встречаются в активных промоторах и могут изменять экспрессию генов [73]. Это, в свою очередь, может приводить к формированию иммунгенных детерминант или влиять на эффективность дифференцировки в желаемый клеточный тип [98], что также имеет большое значение для регенеративной медицины.

Помимо мутаций, которые потенциально могут возникнуть в процессе репрограммирования и культивирования, также следует учитывать и эпигенетические изменения, которые могут регулировать экспрессию разных белков. В первую очередь это касается нарушения метилирования ДНК в линиях ПСК. Так, в некоторых работах отмечается, что паттерн aberrантного метилирования в ИПСК может быть схож с опухолевыми клетками [99–101]. Более того, было показано, что нарушения метилирования могут сохраняться и в дифференцированных клетках [102]. Однако стоит отметить, что метилирование ДНК в ПСК может иметь динамичный характер, реагировать на условия культивирования и варьировать в зависимости от клеточной линии [95].

Также существует мнение, что некоторые клетки не до конца проходят процесс репрограммирования, и ИПСК в значительной мере способны сохранять транскрипционную и эпигенетическую память о своем происхождении [103]. Тем не менее работы в этой области достаточно противоречивы и, согласно современным представлениям, молекулярные и функциональные различия в разных линиях ИПСК теряются в процессе продолжительного пассирования [104]. В то же время недавняя работа показала, что репрограммирование через стадию наивных ИПСК (TNT-репрограммирование) полностью обнуляет эпигенетическую память, а также корректирует возникшие эпигенетические aberrации [105]. Такие TNT-ИПСК оказались молекулярно и функционально более схожими с ЭСК, чем ИПСК, полученные стандартной методикой.

Так или иначе, эпигенетические особенности могли бы объяснить аномальную экспрессию иммуногенных белков. Так, по крайней мере в двух работах было продемонстрировано, что феномен «соматической памяти» может влиять на дальнейшую иммуногенность полученных линий ИПСК [106, 107]. ИПСК, полученные из клеток Сертоли семенников мыши, являющихся анатомически иммуопривилегированной областью, с большей эффективностью формировали тератомы, чем ИПСК, полученные из эмбриональных фибробластов мыши [106]. Более того, дифференцированные производные сингенных ЭСК продемонстрировали сниженный потенциал к активации аллогенных Т-клеток *in vitro* по сравнению с ИПСК, полученными из эмбриональных фибробластов мыши. Однако стоит отметить, что на более поздних пассажах авторы не увидели отличий в иммуногенности ИПСК, полученных из разных соматических клеток, что потенциально еще раз подтверждает, что некая «соматическая память» в ИПСК может присутствовать только на ранних пассажах [106]. В другой работе было показано, что мезенхимальные клетки пуповины являются менее иммуногенным источником клеток для репрограммирования, чем фибробласты кожи [107].

Нарушение экспрессии генов, связанных с NK-клеточным ответом, является еще одной причиной иммуногенности ИПСК и их производных [15]. К запуску цитотоксической программы NK-клеток может привести как повышение сигналов, идущих от активирующих рецепторов, так и снижение сигналов, поступающих от ингибирующих рецепторов. Иными словами, правильный баланс между ингибирующими и активирующими лигандами может сделать клетку-мишень невидимой для NK-клеток [108], тогда как нарушенный баланс лигандов NK-клеток в производных может быть причиной чрезмерной активации NK-клеток. Таким образом, на степень иммунного

ответа будут влиять интенсивность экспрессии молекул HLA I класса, активирующих лигандов и молекул адгезии. Мы ранее показали, что все эти факторы могут являться причиной повышенного NK-клеточного ответа на производные [15]. Во-первых, в фибробластоподобных производных ИПСК (iPS-fibro) наблюдалась относительно низкая экспрессия генов молекул HLA-I, основных ингибирующих лигандов. Во-вторых, в них была обнаружена повышенная экспрессия генов лигандов основных активирующих рецепторов NK-клеток. Так, по сравнению с исходными фибробластами, экспрессия стресс-индуцированного гена *MICA* (лиганд NKG2D) была более чем в 1,5 раза выше. Лиганды *DNAM-1*, *NECTIN2* (CD112) и *PVR* (CD155), а также лиганд *NKp30*, *NCR3LG1* (B7-H6), были повышены более, чем в 3 раза в iPS-fibro. В-третьих, наблюдалась повышенная экспрессия некоторых молекул адгезии. Взаимодействие молекул адгезии с соответствующими рецепторами на поверхности NK-клеток способствует образованию плотных клеточных контактов между NK-клеткой и клеткой-мишенью, что приводит к формированию иммунологических синапсов, которые необходимы для проявления цитотоксических функций NK-клеток [109]. Гены *ICAM-1* (лиганд LFA-1) и *VCAM-1* (лиганд VLA-4, или интегрин $\alpha 4 \beta 1$) были повышены в производных ИПСК. Тем самым дисбаланс лигандов в производных ИПСК был обусловлен одновременно низкой интенсивностью ингибирующих сигналов и повышенной интенсивностью активирующих сигналов [15].

Уязвимость к действию NK-клеток можно объяснить недостаточной зрелостью дифференцированных производных и низким уровнем молекул HLA I класса по сравнению со взрослыми соматическими клетками. Так, по крайней мере для клеток ПЭС [50], проксимальных эпителиальных клеток почки [28] и iPS-fibro [15] был показан рост экспрессии HLA-I по мере длительного культивирования или пассирования. Еще один риск незрелого фенотипа – экспрессия эмбриональных или фетальных белков, которые также характерны для некоторых раковых опухолей (например, альфа-фета протеин) [110]. Несмотря на активное развитие протоколов дифференцировки, существует ряд типов клеток, которые в условиях *in vitro* могут быть дифференцированы только до незрелого фенотипа, в частности, кардиомиоциты [111], гепатоциты [112], β -клетки поджелудочной железы [113].

Отдельно стоит отметить повышенную экспрессию активирующих NK-клеточных лигандов. Анализ общедоступных данных РНК-секвенирования [114–116] показал, что экспрессия генов *NECTIN2*, *PVR*, *CADM1* и *CD70* была повышена в независимо полученных фибробластоподобных клетках по сравнению с изогенными фибробластами,

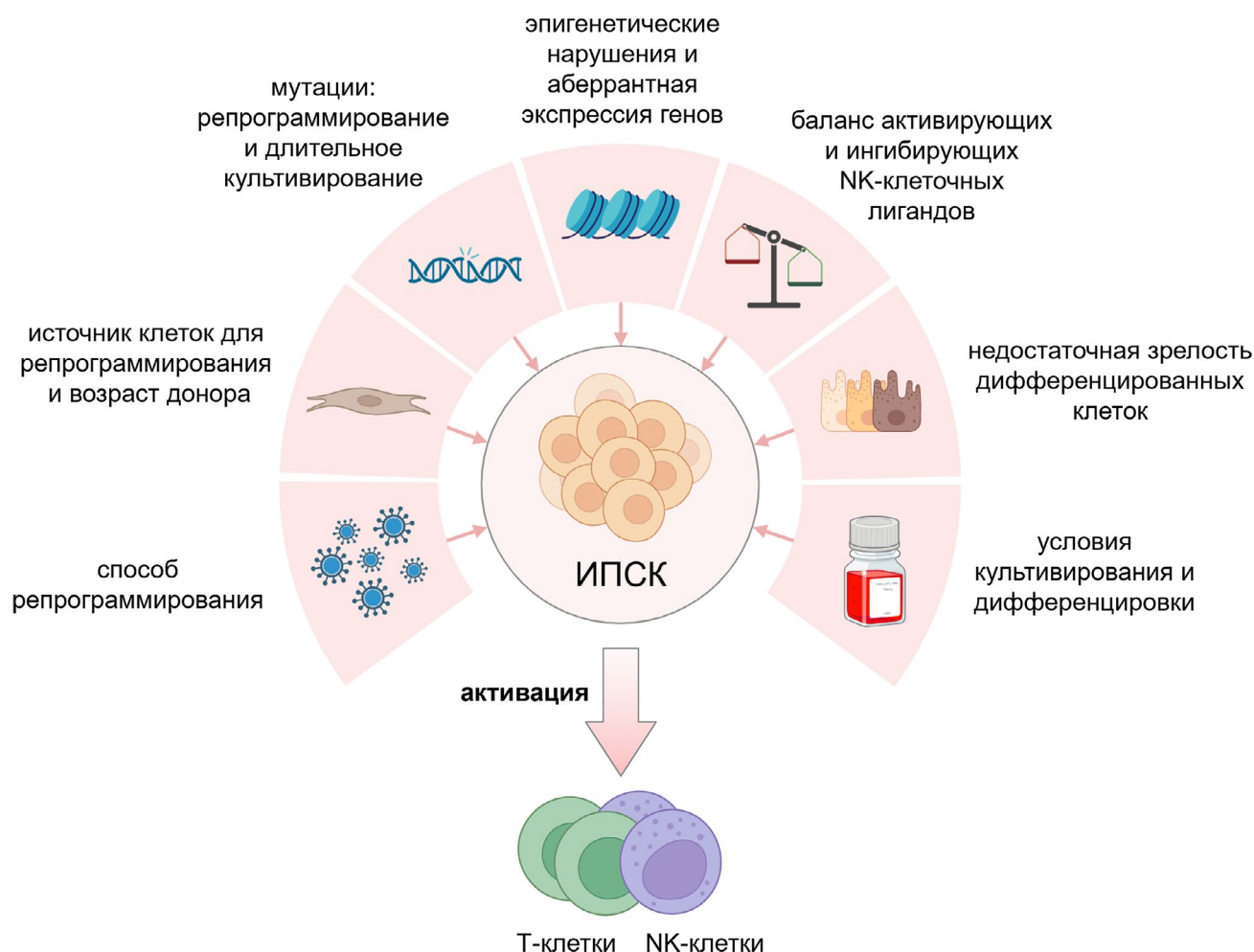


Рис. 3. Потенциальные причины нарушения толерантности иммунной системы в отношении аутологических ИПСК и их дифференцированных производных

использованными для репрограммирования [15]. Вероятно, несовершенное микроокружение во время *in vitro* дифференцировки может влиять на правильный баланс NK-клеточных лигандов в данном типе производных ИПСК. Помимо этого, высокий уровень экспрессии *MICA* и *NECTIN2* был отмечен в проксимальных эпителиальных клетках почки [28]. Поскольку каждый тип клеток экспрессирует свой собственный набор белков, для применения в клинической практике необходимо будет определять паттерн экспрессии лигандов рецепторов NK-клеток. Стоит отметить, что некоторые типы клеток, которые относятся к иммунопривилегированным тканям, могут обладать иммуномодулирующими функциями для подавления иммунного ответа. Было показано, что некоторые типы дифференцированных производных ПСК, в частности клетки ПЭС [117, 118], ганглиозные клетки сетчатки [119], нейрональные предшественники [120–122], клетки нервного гребня [123, 124] и хондроциты [125] демонстрируют сниженную иммуногенность даже по отношению к аллогенным лимфоцитам.

Различные условия культивирования могут влиять на иммуногенность ИПСК и их производных. Как уже упоминалось ранее, длительное культивирование может приводить к накоплению мутаций в клетках на более поздних пассажах [86, 94]. Метод криопаузы, т.е. хранение ИПСК в виде готовых к использованию аликвот на одном пассаже, может снизить частоту геномных aberrаций, вызванных пассированием и длительным культивированием ИПСК [126]. Поскольку окислительный стресс в ходе репрограммирования и длительного культивирования может приводить к заменам C-to-A [85, 88, 94], использование антиоксидантов может уменьшить мутагенную нагрузку в ИПСК. В частности, сообщалось, что антиоксиданты снижают CNV в ИПСК [127]. В недавнем исследовании также было показано, что введение трансгенов антиоксидантов, в частности супероксиддисмутазы 1 (*SOD1*) и 2 (*SOD2*), глутатионпероксидазы 1 (*GPX1*) и N-ацетилцистеина (*NAC*), приводило к меньшему количеству трансверсионных замен в ИПСК [83].

Выбор реактивов для культивирования и дифференцировки может оказывать влияние на иммуногенные свойства ИПСК и их производных. Так, применение ксеногенных материалов для культивирования ПСК потенциально может осложнить дальнейшее клиническое использование производных ПСК. Например, ЭСК и эмбрионидные тельца способны поглощать N-гликолилнейраминовую кислоту (Neu5Gc) из фидерных слоев эмбриональных фибробластов, а также из питательных сред, содержащих сыворотку животных [128]. Это представляет большой риск, поскольку в крови человека циркулируют антитела к Neu5Gc [129]. В настоящее время ПСК обычно культивируют в бесфидерных условиях, кроме того, были разработаны протоколы репрограммирования и дифференцировки без применения компонентов животного происхождения (xeno-free), в которых снижен или полностью отсутствует Neu5Gc, однако эти методы признаны более дорогостоящими [130, 131]. С другой стороны, коммерческие среды xeno-free могут содержать повышенный уровень аскорбата, который может влиять на метилирование промотора CD30 – маркера злокачественных новообразований [132]. Хотя стоит отметить, что CD30, скорее, является маркером недифференцированных клеток, нежели маркером трансформированных клеток [133]. Так или иначе, риск не ограничивается продуктами животного происхождения, и для новых составов сред в обязательном порядке должно быть определено их биологическое воздействие на культивируемые клетки, в том числе на баланс NK-клеточных лигандов.

Таким образом, сразу несколько факторов потенциально могут влиять на иммуногенность финального клеточного продукта, получаемого из ПСК (рис. 3). Общая систематизация перечисленных выше причин должна способствовать разработке критериев качества для обеспечения безопасности клинического применения производных ПСК. Так как каждый тип дифференцированных клеток экспрессирует разные наборы генов и белков, остается актуальным предположение, что для последующего клинического применения необходимо будет скринировать каждый тип клеток на иммуногенность [134].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накапливающиеся сведения об отсутствии полной толерантности иммунной системы по отношению к производным аутологичных ИПСК [13–15] вызывают опасения в отношении их трансплантации без применения иммуносупрессии. Тем не менее наиболее красноречивым ответом на эти опасения могут считаться результаты текущих кли-

нических исследований с применением аутологичных производных ИПСК. Согласно clinicaltrials.gov, стадию клинических испытаний проходят около 20 клеточных продуктов на основе аутологичных ИПСК. К настоящему моменту опубликованы первичные результаты трех из них [135–137]. В первых двух были трансплантированы клетки ПЭС для лечения возрастной макулярной дегенерации, а в третьем – дофаминергические клетки-предшественники для лечения болезни Паркинсона. Ни при одной трансплантации не применялась иммуносупрессивная терапия, но и не сообщалось о побочных эффектах. Следует отметить, что во всех случаях трансплантацию гомогенных культур производных ИПСК проводили в иммунопривилегированные органы – глаз и мозг. Возникнут ли нежелательные иммунные реакции в ходе трансплантаций производных аутологичных ИПСК, в том числе сложнокомпонентных клеточных продуктов, в органы и ткани, лишенные иммунопривилегированного статуса, еще предстоит изучить. Совсем недавно сообщалось об отсутствии побочных эффектов при трансфузии тромбоцитов, дифференцированных из аутологичных ИПСК [138].

Так или иначе, возможное отсутствие толерантности иммунной системы вкупе с высокой стоимостью и длительностью производства новых линий ИПСК на сегодняшний день не позволяют рассматривать персонализированную терапию на их основе перспективной для широкой медицинской практики. В связи с этим аллогенные производные ПСК на данный момент являются более предпочтительным источником для регенеративной медицины. В последние годы широко распространяется гипотеза, что решить проблему гистосовместимости и предотвратить иммунное отторжение можно путем создания «универсальных» линий ПСК, производные которых будут подходить любому реципиенту [43, 44, 51]. Как уже упоминалось ранее, для получения таких ИПСК применяются различные стратегии «иммунной маскировки»: от элиминации молекул HLA для ингибирования Т-лимфоцитов [45–50] до включения иммуномодулирующих факторов для ускользания от надзора со стороны NK-клеток [53–57]. Было показано, что дифференцированные производные таких модифицированных ИПСК с пониженной иммуногенностью демонстрируют долговременную выживаемость в полностью иммунокомпетентных животных: 50 дней в мышинной модели [56] и 40 недель на макаках-резус [139]. В обеих работах «ослепление» аллогенной иммунной системы было достигнуто благодаря блокированию экспрессии HLA I и II классов через нокаут генов *B2M* и *СИТА* и введению иммунного чекпойнта NK-клеток *CD47* [140]. В недавней работе одновременное введение в ЭСК мыши восемью иммуномодулирующих

факторов (Pdl1, Cd200, Cd47, H2-M3, FasL, Serpinb9, Ccl21 и Mfge8) обеспечивало в аллогенной модели долговременное выживание тератом [141]. В некоторых группах животных срок наблюдения составлял 9 месяцев. Кроме того, в феврале 2022 г. компании «ViaCyte» и «CRISPR Therapeutics» объявили о начале первой фазы клинических испытаний VCTX210 – основанной на ЭСК терапии сахарного диабета 1-го типа без необходимости иммуносупрессии. Используемая линия СуТ49 имеет нокаут гена *B2M* и экспрессирует трансген *CD274*, кодирующий иммунологический чекпоинт PD-L1 для дополнительной защиты от атаки Т-клеток [142].

Несмотря на привлекательность «универсального» подхода, стоит отметить вопросы, связанные с безопасностью такой терапии [43, 143, 144]. В первую очередь они касаются иммунной эвазии, которая может увеличить риски онкогенной трансформации клеток. Само по себе отсутствие молекул МНС/HLA не должно способствовать онкогенезу [145], поэтому вероятность злокачественного перерождения вряд ли будет превышать таковую у взрослого человека, однако очевидно, что в HLA-негативных клетках устранить ее будет труднее с помощью обычных иммунных механизмов. Решить эту проблему предлагается через вставку «суицидальных кассет», которые будут активированы в случае злокачественной трансформации или вирусного инфицирования трансплантата [43, 51]. Например, может быть использовано введение тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) как под промотор плюрипотентных генов [146], так и под промоторы генов, играющих ключевую роль в регуляции клеточного цикла, например *CDK1* [147]. К слову, последний подход совсем

недавно был применен и в иммуномодифицированных ЭСК человека [141]. Другой суицидальной системой может стать индуцируемая каспаза-9 (iCas9) [148]. В этом вопросе текущее клиническое испытание «ViaCyte» представляется более безопасным, поскольку β-клетки инкапсулированы полупроницаемой мембраной и не смогут выйти из капсулы в случае перерождения [149]. Так или иначе, очевиден факт, что в целях безопасности необходимо тщательно исследовать универсальные линии на наличие потенциальных онкогенных мутаций и активацию протоонкогенов [51]. И все же, несмотря на сохраняющиеся проблемы, разработка генетически модифицированных плюрипотентных стволовых клеток может способствовать крупномасштабному производству «готовых» (off-the-shelf) клеточных продуктов и решить проблему нехватки донорских органов и тканей.

Вклад авторов. М.Е.Б. – поиск литературы, написание текста, оформление рисунков; А.Н.Б. – написание и редактирование текста, М.А.Л. – общая концепция рукописи и финальное редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 123032900030-7.

Благодарности. М.А.Л. – участник Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, **282**, 1145-1147, <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.
2. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663-676, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
3. Лебедева О. С., Лагарькова М. А. (2018) Плюрипотентные стволовые клетки для моделирования и клеточной терапии болезни Паркинсона, *Биохимия*, **83**, 1318-1330, <https://doi.org/10.1134/S0006297918090067>.
4. Doss, M. X., and Sachinidis, A. (2019) Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications, *Cells*, **8**, 403, <https://doi.org/10.3390/cells8050403>.
5. Богомазова А. Н., Васина Е. М., Киселев С. Л., Лагарькова М. А., Лебедева О. С., Некрасов Е. Д., Панова А. В., Филоненко Е. С., Хомякова Е. А., Цховребова Л. В., Честков И. В., Шутова М. В. (2015) Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования, *Генетика*, **51**, 466-478, <https://doi.org/10.7868/S0016675815040025>.
6. Huang, C. Y., Liu, C. L., Ting, C. Y., Chiu, Y. T., Cheng, Y. C., Nicholson, M. W., and Hsieh, P. C. H. (2019) Human iPSC banking: barriers and opportunities, *J. Biomed. Sci.*, **26**, 87, <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0578-x>.
7. Rehakova, D., Souralova, T., and Koutna, I. (2020) Clinical-grade human pluripotent stem cells for cell therapy: characterization strategy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2435, <https://doi.org/10.3390/ijms21072435>.

8. Sullivan, S., Stacey, G. N., Akazawa, C., Aoyama, N., Baptista, R., Bedford, P., Bennaceur Griscelli, A., Chandra, A., Elwood, N., Girard, M., Kawamata, S., Hanatani, T., Latsis, T., Lin, S., Ludwig, T. E., Malygina, T., Mack, A., Mountford, J. C., Noggle, S., Pereira, L. V., Price, J., Sheldon, M., Srivastava, A., Stachelscheid, H., Velayudhan, S. R., Ward, N. J., Turner, M. L., Barry, J., and Song, J. (2018) Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines, *Regen. Med.*, **13**, 859-866, <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0095>.
9. Kobold, S., Guhr, A., Mah, N., Bultjer, N., Seltmann, S., Seiler Wulczyn, A. E. M., Stacey, G., Jie, H., Liu, W., Löser, P., and Kurtz, A. (2020) A manually curated database on clinical studies involving cell products derived from human pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, **15**, 546-555, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.014>.
10. Bolton, E. M., and Bradley, J. A. (2015) Avoiding immunological rejection in regenerative medicine, *Regen. Med.*, **10**, 287-304, <https://doi.org/10.2217/rme.15.11>.
11. Barrilleaux, B., and Knoepfler, P. S. (2011) Inducing iPSCs to escape the dish, *Cell Stem Cell*, **9**, 103-111, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.006>.
12. Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., and Xu, Y. (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells, *Nature*, **474**, 212-215, <https://doi.org/10.1038/nature10135>.
13. Zhao, T., Zhang, Z. N., Westenskow, P. D., Todorova, D., Hu, Z., Lin, T., Rong, Z., Kim, J., He, J., Wang, M., Clegg, D. O., Yang, Y. G., Zhang, K., Friedlander, M., and Xu, Y. (2015) Humanized mice reveal differential immunogenicity of cells derived from autologous induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **17**, 353-359, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.021>.
14. Nakamura, Y., Miyagawa, S., Yoshida, S., Sasawatari, S., Toyofuku, T., Toda, K., and Sawa, Y. (2019) Natural killer cells impede the engraftment of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells in syngeneic mouse model, *Sci. Rep.*, **9**, 10840, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47134-3>.
15. Bogomiakova, M. E., Sekretova, E. K., Anufrieva, K. S., Khabarova, P. O., Kazakova, A. N., Bobrovsky, P. A., Grigoryeva, T. V., Ereemeev, A. V., Lebedeva, O. S., Bogomazova, A. N., and Lagarkova, M. A. (2023) iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors, *Stem Cell Res. Ther.*, **14**, 77, <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03308-5>.
16. Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., Sugiura, M., Ideno, H., Shimada, A., Nifuji, A., and Abe, M. (2013) Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells, *Nature*, **494**, 100-104, <https://doi.org/10.1038/nature11807>.
17. Dhodapkar, K. M., Feldman, D., Matthews, P., Radfar, S., Pickering, R., Turkula, S., Zebroski, H., and Dhodapkar, M. V. (2010) Natural immunity to pluripotency antigen OCT4 in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8718-8723, <https://doi.org/10.1073/pnas.0915086107>.
18. Guha, P., Morgan, J. W., Mostoslavsky, G., Rodrigues, N. P., and Boyd, A. S. (2013) Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **12**, 407-412, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.006>.
19. de Almeida, P. E., Meyer, E. H., Kooreman, N. G., Diecke, S., Dey, D., Sanchez-Freire, V., Hu, S., Ebert, A., Odegaard, J., Mordwinkin, N. M., Brouwer, T. P., Lo, D., Montoro, D. T., Longaker, M. T., Negrin, R. S., and Wu, J. C. (2014) Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance, *Nat. Commun.*, **5**, 3903, <https://doi.org/10.1038/ncomms4903>.
20. Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Okita, K., Hotta, A., Kawasaki, T., Hayashi, T., Onoe, H., Shiina, T., Yamanaka, S., and Takahashi, J. (2013) Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a non-human primate, *Stem Cell Rep.*, **1**, 283-292, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.08.007>.
21. Emborg, M. E., Liu, Y., Xi, J., Zhang, X., Yin, Y., Lu, J., Joers, V., Swanson, C., Holden, J. E., and Zhang, S. C. (2013) Induced pluripotent stem cell-derived neural cells survive and mature in the nonhuman primate brain, *Cell Rep.*, **3**, 646-650, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.016>.
22. Hallett, P. J., Deleidi, M., Astradsson, A., Smith, G. A., Cooper, O., Osborn, T. M., Sundberg, M., Moore, M. A., Perez-Torres, E., Brownell, A. L., Schumacher, J. M., Spealman, R. D., and Isacson, O. (2015) Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease, *Cell Stem Cell*, **16**, 269-274, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.018>.
23. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., and Olanow, C. W. (2008) Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease, *Nat. Med.*, **14**, 504-506, <https://doi.org/10.1038/nm1747>.
24. Mendez, I., Viñuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J. Q., and Isacson, O. (2008) Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years, *Nat. Med.*, **14**, 507-509, <https://doi.org/10.1038/nm1752>.
25. Strnadel, J., Carromeu, C., Bardy, C., Navarro, M., Platoshyn, O., Glud, A. N., Marsala, S., Kafka, J., Miyanochara, A., Kato, T., Jr, Tadokoro, T., Hefferan, M. P., Kamizato, K., Yoshizumi, T., Juhas, S., Juhasova, J., Ho, C. S., Kheradmand, T., Chen, P., Bohaciakova, D., Hruska-Plochan, M., Todd, A. J., Driscoll, S. P., Glenn, T. D., Pfaff, S. L., Klima, J., Ciacchi, J., Curtis, E., Gage, F. H., Bui, J., Yamada, K., Muotri, A. R., and Marsala, M. (2018) Survival of syngeneic and

- allogeneic iPSC-derived neural precursors after spinal grafting in minipigs, *Sci. Transl. Med.*, **10**, eaam6651, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam6651>.
26. Lu, M., Peng, L., Ming, X., Wang, X., Cui, A., Li, Y., Wang, X., Meng, D., Sun, N., Xiang, M., and Chen, S. (2019) Enhanced wound healing promotion by immune response-free monkey autologous iPSCs and exosomes vs. their allogeneic counterparts, *EBioMedicine*, **42**, 443-457, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.011>.
 27. Benabdallah, B., Désaulniers-Langevin, C., Goyer, M. L., Colas, C., Maltais, C., Li, Y., Guimond, J. V., Tremblay, J. P., Haddad, E., and Beauséjour, C. (2021) Myogenic progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cell are immune-tolerated in humanized mice, *Stem Cells Transl. Med.*, **10**, 267-277, <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0452>.
 28. Rossbach, B., Hariharan, K., Mah, N., Oh, S. J., Volk, H. D., Reinke, P., and Kurtz, A. (2022) Human iPSC-derived renal cells change their immunogenic properties during maturation: implications for regenerative therapies, *Cells*, **11**, 1328, <https://doi.org/10.3390/cells11081328>.
 29. Ljunggren, H. G., and Kärre, K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition, *Immunol. Today*, **11**, 237-244, <https://doi.org/10.1016/0167-569990097-s>.
 30. Lanier, L. L. (2005) NK cell recognition, *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 225-274, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526>.
 31. Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L., Degli-Esposti, M. A., and Hayakawa, Y. (2005) Activation of NK cell cytotoxicity, *Mol. Immunol.*, **42**, 501-510, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034>.
 32. Dressel, R., Nolte, J., Elsner, L., Novota, P., Guan, K., Streckfuss-Bömeke, K., Hasenfuss, G., Jaenisch, R., and Engel, W. (2010) Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells, *FASEB J.*, **24**, 2164-2177, <https://doi.org/10.1096/fj.09-134957>.
 33. Kruse, V., Hamann, C., Monecke, S., Cyganek, L., Elsner, L., Hübscher, D., Walter, L., Streckfuss-Bömeke, K., Guan, K., and Dressel, R. (2015) Human induced pluripotent stem cells are targets for allogeneic and autologous natural Killer (NK) cells and killing is partly mediated by the activating NK receptor DNAM-1, *PLoS One*, **10**, e0125544, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125544>.
 34. Drukker, M., Katz, G., Urbach, A., Schuldiner, M., Markel, G., Itskovitz-Eldor, J., Reubinoff, B., Mandelboim, O., and Benvenisty, N. (2002) Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9864-9869, <https://doi.org/10.1073/pnas.142298299>.
 35. Frenzel, L. P., Abdullah, Z., Kriegeskorte, A. K., Dieterich, R., Lange, N., Busch, D. H., Krönke, M., Utermöhlen, O., Hescheler, J., and Sarić, T. (2009) Role of natural-killer group 2 member D ligands and intercellular adhesion molecule 1 in natural killer cell-mediated lysis of murine embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *Stem Cells*, **27**, 307-316, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0528>.
 36. Gröschel, C., Hübscher, D., Nolte, J., Monecke, S., Sasse, A., Elsner, L., Paulus, W., Trenkwalder, C., Polić, B., Mansouri, A., Guan, K., and Dressel, R. (2017) Efficient killing of murine pluripotent stem cells by natural killer (NK) cells requires activation by cytokines and partly depends on the activating NK receptor NKG2D, *Front. Immunol.*, **8**, 870, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00870>.
 37. Dressel, R., Schindehütte, J., Kuhlmann, T., Elsner, L., Novota, P., Baier, P. C., Schillert, A., Bickeböller, H., Herrmann, T., Trenkwalder, C., Paulus, W., and Mansouri, A. (2008) The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and *in vitro* differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response, *PLoS One*, **3**, e2622, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002622>.
 38. Benabdallah, B., Désaulniers-Langevin, C., Colas, C., Li, Y., Rousseau, G., Guimond, J. V., Haddad, E., and Beauséjour, C. (2019) Natural killer cells prevent the formation of teratomas derived from human induced pluripotent stem cells, *Front. Immunol.*, **10**, 2580, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02580>.
 39. Melendez, E., Chondronasiou, D., Mosteiro, L., Martínez de Villarreal, J., Fernández-Alfara, M., Lynch, C. J., Grimm, D., Real, F. X., Alcamí, J., Climent, N., Pietrocola, F., and Serrano, M. (2022) Natural killer cells act as an extrinsic barrier for *in vivo* reprogramming, *Development*, **149**, dev200361, <https://doi.org/10.1242/dev.200361>.
 40. Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., Manzanares, M., Ortega, S., and Serrano, M. (2013) Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features, *Nature*, **502**, 340-345, <https://doi.org/10.1038/nature12586>.
 41. Cisneros, T., Dillard, D. W., Qu, X., Arredondo-Guerrero, J., Castro, M., Schaffert, S., Martin, R., Esquivel, C. O., Krams, S. M., and Martinez, O. M. (2019) Differential role of natural killer group 2D in recognition and cytotoxicity of hepatocyte-like cells derived from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, *Am. J. Transplant.*, **19**, 1652-1662, <https://doi.org/10.1111/ajt.15217>.
 42. Phillips, L. K., Gould, E. A., Babu, H., Krams, S. M., Palmer, T. D., and Martinez, O. M. (2013) Natural killer cell-activating receptor NKG2D mediates innate immune targeting of allogeneic neural progenitor cell grafts, *Stem Cells*, **31**, 1829-1839, <https://doi.org/10.1002/stem.1422>.

43. Zheng, D., Wang, X., and Xu, R. H. (2016) Concise review: one stone for multiple birds: generating universally compatible human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **34**, 2269-2275, <https://doi.org/10.1002/stem.2407>.
44. Богомякова М. Е., Еремеев А. В., Лагарькова М. А. (2019) «Свой среди чужих»: можно ли создать гипоиммуногенные линии плюрипотентных стволовых клеток? *Молекулярная биология*, **53**, 725-740, <https://doi.org/10.1134/S0026898419050045>.
45. Riobolobos, L., Hirata, R. K., Turtle, C. J., Wang, P. R., Gornalusse, G. G., Zavajlevski, M., Riddell, S. R., and Russell, D. W. (2013) HLA engineering of human pluripotent stem cells, *Mol. Ther.*, **21**, 1232-1241, <https://doi.org/10.1038/mt.2013.59>.
46. Wang, D., Quan, Y., Yan, Q., Morales, J. E., and Wetsel, R. A. (2015) Targeted disruption of the β 2-microglobulin gene minimizes the immunogenicity of human embryonic stem cells, *Stem Cells Transl. Med.*, **4**, 1234-1245, <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0049>.
47. Bogomiakova, M. E., Sekretova, E. K., Eremeev, A. V., Shuvalova, L. D., Bobrovsky, P. A., Zerkalenskova, E. A., Lebedeva, O. S., and Lagarkova, M. A. (2021) Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing, *Stem Cell Res.*, **55**, 102451, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102451>.
48. Chen, H., Li, Y., Lin, X., Cui, D., Cui, C., Li, H., and Xiao, L. (2015) Functional disruption of human leukocyte antigen II in human embryonic stem cell, *Biol. Res.*, **48**, 59, <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0051-6>.
49. Mattapally, S., Pawlik, K. M., Fast, V. G., Zumaquero, E., Lund, F. E., Randall, T. D., Townes, T. M., and Zhang, J. (2018) Human leukocyte antigen class I and II knockout human induced pluripotent stem cell-derived cells: universal donor for cell therapy, *J. Am Heart Assoc.*, **7**, e010239, <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010239>.
50. Petrus-Reurer, S., Winblad, N., Kumar, P., Gorchs, L., Chrobok, M., Wagner, A. K., Bartuma, H., Lardner, E., Aronson, M., Plaza Reyes, Á., André, H., Alici, E., Kaipe, H., Kvanta, A., and Lanner, F. (2020) Generation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells lacking human leukocyte antigen class I and II, *Stem Cell Rep.*, **14**, 648-662, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.02.006>.
51. Lanza, R., Russell, D. W., and Nagy, A. (2019) Engineering universal cells that evade immune detection, *Nat. Rev. Immunol.*, **19**, 723-733, <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0200-1>.
52. Kim, A., Lee, K. G., Kwon, Y., Lee, K. I., Yang, H. M., Habib, O., Kim, J., Kim, S. T., Kim, S. J., Kim, J. S., and Hwang, D. Y. (2021) Off-the-shelf, immune-compatible human embryonic stem cells generated via CRISPR-mediated genome editing, *Stem Cell Rev Rep*, **17**, 1053-1067, <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10113-7>.
53. Wang, B., Iriguchi, S., Waseda, M., Ueda, N., Ueda, T., Xu, H., Minagawa, A., Ishikawa, A., Yano, H., Ishi, T., Ito, R., Goto, M., Takahashi, R., Uemura, Y., Hotta, A., and Kaneko, S. (2021) Generation of hypoimmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells, *Nat. Biomed. Eng.*, **5**, 429-440, <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00730-z>.
54. Gornalusse, G. G., Hirata, R. K., Funk, S. E., Riobolobos, L., Lopes, V. S., Manske, G., Prunkard, D., Colunga, A. G., Hanafi, L. A., Clegg, D. O., Turtle, C., and Russell, D. W. (2017) HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells, *Nat. Biotechnol.*, **35**, 765-772, <https://doi.org/10.1038/nbt.3860>.
55. Han, X., Wang, M., Duan, S., Franco, P. J., Kenty, J. H., Hedrick, P., Xia, Y., Allen, A., Ferreira, L. M. R., Strominger, J. L., Melton, D. A., Meissner, T. B., and Cowan, C. A. (2019) Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 10441-10446, <https://doi.org/10.1073/pnas.1902566116>.
56. Deuse, T., Hu, X., Gravina, A., Wang, D., Tediashvili, G., De, C., Thayer, W. O., Wahl, A., Garcia, J. V., Reichenspurner, H., Davis, M. M., Lanier, L. L., and Schrepfer, S. (2019) Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 252-258, <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0016-3>.
57. Shi, L., Li, W., Liu, Y., Chen, Z., Hui, Y., Hao, P., Xu, X., Zhang, S., Feng, H., Zhang, B., Zhou, S., Li, N., Xiao, L., Liu, L., Ma, L., and Zhang, X. (2020) Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells via expression of membrane-bound and secreted β 2m-HLA-G fusion proteins, *Stem Cells*, **38**, 1423-1437, <https://doi.org/10.1002/stem.3269>.
58. Moffett, A., and Colucci, F. (2015) Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction, *Immunol. Rev.*, **267**, 283-297, <https://doi.org/10.1111/imr.12323>.
59. Ichise, H., Nagano, S., Maeda, T., Miyazaki, M., Miyazaki, Y., Kojima, H., Yawata, N., Yawata, M., Tanaka, H., Saji, H., Masuda, K., and Kawamoto, H. (2017) NK cell alloreactivity against KIR-ligand-mismatched HLA-haploidentical tissue derived from HLA haplotype-homozygous iPSCs, *Stem Cell Rep.*, **9**, 853-867, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.020>.
60. Zamir, M. R., Shahi, A., Salehi, S., and Amirzargar, A. (2022) Natural killer cells and killer cell immunoglobulin-like receptors in solid organ transplantation: Protectors or opponents? *Transplant. Rev. (Orlando)*, **36**, 100723, <https://doi.org/10.1016/j.trre.2022.100723>.
61. Song, C., Wang, L., Li, Q., Liao, B., Qiao, W., Li, Q., Dong, N., and Li, L. (2022) Generation of individualized immunocompatible endothelial cells from HLA-I-matched human pluripotent stem cells, *Stem Cell Res. Ther.*, **13**, 48, <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02720-7>.

62. Villard, J. (2011) The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation, *J. Innate Immun.*, **3**, 395-402, <https://doi.org/10.1159/000324400>.
63. Pontrelli, P., Rascio, F., Castellano, G., Grandaliano, G., Gesualdo, L., and Stallone, G. (2020) The role of natural killer cells in the immune response in kidney transplantation, *Front. Immunol.*, **11**, 1454, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01454>.
64. Adenugba, A. (2017) NK cells in transplantation, *Transplantation*, **101**, 2262-2264, <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001914>.
65. Bhutani, K., Nazer, K. L., Williams, R., Tran, H., Dai, H., Džakula, Ž., Cho, E. H., Pang, A. W. C., Rao, M., Cao, H., Schork, N. J., and Loring, J. F. (2016) Whole-genome mutational burden analysis of three pluripotency induction methods, *Nat. Commun.*, **7**, 10536, <https://doi.org/10.1038/ncomms10536>.
66. Popp, B., Krumbiegel, M., Grosch, J., Sommer, A., Uebe, S., Kohl, Z., Plötz, S., Farrell, M., Trautmann, U., Kraus, C., Ekici, A. B., Asadollahi, R., Regensburger, M., Günther, K., Rauch, A., Edenhofer, F., Winkler, J., Winner, B., and Reis, A. (2018) Need for high-resolution genetic analysis in iPSC: results and lessons from the ForIPS consortium, *Sci. Rep.*, **8**, 17201, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35506-0>.
67. Sugiura, M., Kasama, Y., Araki, R., Hoki, Y., Sunayama, M., Uda, M., Nakamura, M., Ando, S., and Abe, M. (2014) Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations arise during the initial stages of the conversion of these cells, *Stem Cell Rep.*, **2**, 52-63, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.006>.
68. Kang, X., Yu, Q., Huang, Y., Song, B., Chen, Y., Gao, X., He, W., Sun, X., and Fan, Y. (2015) Effects of integrating and non-integrating reprogramming methods on copy number variation and genomic stability of human induced pluripotent stem cells, *PLoS One*, **10**, e0131128, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131128>.
69. Cheng, L., Hansen, N. F., Zhao, L., Du, Y., Zou, C., Donovan, F. X., Chou, B. K., Zhou, G., Li, S., Dowe, S. N., Ye, Z., NISC Comparative Sequencing Program, Chandrasekharappa, S. C., Yang, H., Mullikin, J. C., and Liu, P. P. (2012) Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression, *Cell Stem Cell*, **10**, 337-344, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.005>.
70. Weltner, J., Balboa, D., Katayama, S., Bepalov, M., Krjutškov, K., Jouhilahti, E. M., Trokovic, R., Kere, J., and Otonkoski, T. (2018) Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators, *Nat. Commun.*, **9**, 2643, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05067-x>.
71. Liu, X., Li, W., Fu, X., and Xu, Y. (2017) The immunogenicity and immune tolerance of pluripotent stem cell derivatives, *Front. Immunol.*, **8**, 645, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00645>.
72. Hanna, J. H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues, *Cell*, **143**, 508-525, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.008>.
73. D'Antonio, M., Benaglio, P., Jakubosky, D., Greenwald, W. W., Matsui, H., Donovan, M. K. R., Li, H., Smith, E. N., D'Antonio-Chronowska, A., and Frazer, K. A. (2018) Insights into the mutational burden of human induced pluripotent stem cells from an integrative multi-omics approach, *Cell Rep.*, **24**, 883-894, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.091>.
74. Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., Van Loo, P., McLaren, S., Wedge, D. C., Fullam, A., Alexandrov, L. B., Tubio, J. M., Stebbings, L., Menzies, A., Widaa, S., Stratton, M. R., Jones, P. H., and Campbell, P. J. (2015) Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin, *Science*, **348**, 880-886, <https://doi.org/10.1126/science.aaa6806>.
75. Wang, K., Guzman, A. K., Yan, Z., Zhang, S., Hu, M. Y., Hamaneh, M. B., Yu, Y. K., Tolu, S., Zhang, J., Kanavy, H. E., Ye, K., Bartholdy, B., and Bouhassira, E. E. (2019) Ultra-high-frequency reprogramming of individual long-term hematopoietic stem cells yields low somatic variant induced pluripotent stem cells, *Cell Rep.*, **26**, 2580-2592.e7, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.021>.
76. Rouhani, F. J., Zou, X., Danecek, P., Badja, C., Amarante, T. D., Koh, G., Wu, Q., Memari, Y., Durbin, R., Martincorena, I., Bassett, A. R., Gaffney, D., and Nik-Zainal, S. (2022) Substantial somatic genomic variation and selection for BCOR mutations in human induced pluripotent stem cells, *Nat. Genet.*, **54**, 1406-1416, <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01147-3>.
77. Genovese, G., Kähler, A. K., Handsaker, R. E., Lindberg, J., Rose, S. A., Bakhoum, S. F., Chambert, K., Mick, E., Neale, B. M., Fromer, M., Purcell, S. M., Svantesson, O., Landén, M., Höglund, M., Lehmann, S., Gabriel, S. B., Moran, J. L., Lander, E. S., Sullivan, P. F., Sklar, P., Grönberg, H., Hultman, C. M., and McCarroll, S. A. (2014) Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence, *N. Engl. J. Med.*, **371**, 2477-2487, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405>.
78. Lo Sardo, V., Ferguson, W., Erikson, G. A., Topol, E. J., Baldwin, K. K., and Torkamani, A. (2017) Influence of donor age on induced pluripotent stem cells, *Nat. Biotechnol.*, **35**, 69-74, <https://doi.org/10.1038/nbt.3749>.
79. Kang, E., Wang, X., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Folmes, C. D., Gutierrez, N. M., Lee, Y., Van Dyken, C., Ahmed, R., Li, Y., Koski, A., Hayama, T., Luo, S., Harding, C. O., Amato, P., Jensen, J., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Terzic, A., Wolf, D. P., Huang, T., and Mitalipov, S. (2016) Age-related accumulation of somatic mitochondrial

- DNA mutations in adult-derived human iPSCs, *Cell Stem Cell*, **18**, 625-636, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.005>.
80. Wei, W., Gaffney, D. J., and Chinnery, P. F. (2021) Cell reprogramming shapes the mitochondrial DNA landscape, *Nat. Commun.*, **12**, 5241, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25482-x>.
81. Kosanke, M., Davenport, C., Szepes, M., Wiehlmann, L., Kohn, T., Dorda, M., Gruber, J., Menge, K., Sievert, M., Melchert, A., Gruh, I., Göhring, G., and Martin, U. (2021) iPSC culture expansion selects against putatively actionable mutations in the mitochondrial genome, *Stem Cell Rep.*, **16**, 2488-2502, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.08.016>.
82. Deuse, T., Hu, X., Agbor-Enoh, S., Koch, M., Spitzer, M. H., Gravina, A., Alawi, M., Marishta, A., Peters, B., Kosaloglu-Yalcin, Z., Yang, Y., Rajalingam, R., Wang, D., Nashan, B., Kieffmann, R., Reichenspurner, H., Valantine, H., Weissman, I. L., and Schrepfer, S. (2019) De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans, *Nat Biotechnol.*, **37**, 1137-1144, <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0227-7>.
83. Araki, R., Hoki, Y., Suga, T., Obara, C., Sunayama, M., Imadome, K., Fujita, M., Kamimura, S., Nakamura, M., Wakayama, S., Nagy, A., Wakayama, T., and Abe, M. (2020) Genetic aberrations in iPSCs are introduced by a transient G1/S cell cycle checkpoint deficiency, *Nat. Commun.*, **11**, 197, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13830-x>.
84. Wang, B., Miyagoe-Suzuki, Y., Yada, E., Ito, N., Nishiyama, T., Nakamura, M., Ono, Y., Motohashi, N., Segawa, M., Masuda, S., and Takeda, S. (2011) Reprogramming efficiency and quality of induced pluripotent stem cells (iPSCs) generated from muscle-derived fibroblasts of mdx mice at different ages, *PLoS Curr.*, **3**, RRN1274, <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1274>.
85. Yoshihara, M., Araki, R., Kasama, Y., Sunayama, M., Abe, M., Nishida, K., Kawaji, H., Hayashizaki, Y., and Murakawa, Y. (2017) Hotspots of *de novo* point mutations in induced pluripotent stem cells, *Cell Rep.*, **21**, 308-315, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.060>.
86. Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M. A., Kiskinis, E., Lee, J. H., Loh, Y. H., Manos, P. D., Montserrat, N., Panopoulos, A. D., Ruiz, S., Wilbert, M. L., Yu, J., Kirkness, E. F., Izpisua Belmonte, J. C., Rossi, D. J., Thomson, J. A., Eggan, K., Daley, G. Q., Goldstein, L. S., and Zhang, K. (2011) Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells, *Nature*, **471**, 63-67, <https://doi.org/10.1038/nature09805>.
87. Ji, J., Ng, S. H., Sharma, V., Neculai, D., Hussein, S., Sam, M., Trinh, Q., Church, G. M., McPherson, J. D., Nagy, A., and Batada, N. N. (2012) Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells, *Stem Cells*, **30**, 435-440, <https://doi.org/10.1002/stem.1011>.
88. Rouhani, F. J., Nik-Zainal, S., Wuster, A., Li, Y., Conte, N., Koike-Yusa, H., Kumasaka, N., Vallier, L., Yusa, K., and Bradley, A. (2016) Mutational history of a human cell lineage from somatic to induced pluripotent stem cells, *PLoS Genet.*, **12**, e1005932, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005932>.
89. Kwon, E. M., Connelly, J. P., Hansen, N. F., Donovan, F. X., Winkler, T., Davis, B. W., Alkadi, H., Chandrasekharappa, S. C., Dunbar, C. E., Mullikin, J. C., and Liu, P. (2017) iPSCs and fibroblast subclones from the same fibroblast population contain comparable levels of sequence variations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1964-1969, <https://doi.org/10.1073/pnas.1616035114>.
90. Kosanke, M., Osetek, K., Haase, A., Wiehlmann, L., Davenport, C., Schwarzer, A., Adams, F., Kleppa, M. J., Schambach, A., Merkert, S., Wunderlich, S., Menke, S., Dorda, M., and Martin, U. (2021) Reprogramming enriches for somatic cell clones with small-scale mutations in cancer-associated genes, *Mol. Ther.*, **29**, 2535-2553, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.007>.
91. International Stem Cell Initiative, Amps, K., Andrews, P. W., Anyfantis, G., Armstrong, L., Avery, S., Baharvand, H., Baker, J., Baker, D., Munoz, M. B., Beil, S., Benvenisty, N., Ben-Yosef, D., Biancotti, J. C., Bosman, A., Brena, R. M., Brison, D., Caisander, G., Camarasa, M. V., Chen, J., and Zhou, Q. (2011) Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 1132-1144, <https://doi.org/10.1038/nbt.2051>.
92. Merkle, F. T., Ghosh, S., Kamitaki, N., Mitchell, J., Avior, Y., Mello, C., Kashin, S., Mekhoubad, S., Ilic, D., Charlton, M., Saphier, G., Handsaker, R. E., Genovese, G., Bar, S., Benvenisty, N., McCarroll, S. A., and Eggan, K. (2017) Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations, *Nature*, **545**, 229-233, <https://doi.org/10.1038/nature22312>.
93. Hasaart, K. A. L., Manders, F., Ubels, J., Verheul, M., van Roosmalen, M. J., Groenen, N. M., Oka, R., Kuijk, E., Lopes, S. M. C. S., and Boxtel, R. V. (2022) Human induced pluripotent stem cells display a similar mutation burden as embryonic pluripotent cells *in vivo*, *iScience*, **25**, 103736, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103736>.
94. Kuijk, E., Jager, M., van der Roest, B., Locati, M. D., Van Hoeck, A., Korzelius, J., Janssen, R., Besselink, N., Boymans, S., van Bortel, R., and Cuppen, E. (2020) The mutational impact of culturing human pluripotent and adult stem cells, *Nat. Commun.*, **11**, 2493, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16323-4>.
95. Thompson, O., von Meyenn, F., Hewitt, Z., Alexander, J., Wood, A., Weightman, R., Gregory, S., Krueger, F., Andrews, S., Barbaric, I., Gokhale, P. J., Moore, H. D., Reik, W., Milo, M., Nik-Zainal, S., Yusa, K., and Andrews, P. W.

- (2020) Low rates of mutation in clinical grade human pluripotent stem cells under different culture conditions, *Nat. Commun.*, **11**, 1528, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15271-3>.
96. Avior, Y., Lezmi, E., Eggan, K., and Benvenisty, N. (2021) Cancer-related mutations identified in primed human pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **28**, 10-11, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.013>.
 97. Merkle, F. T., Ghosh, S., Genovese, G., Handsaker, R. E., Kashin, S., Meyer, D., Karczewski, K. J., O'Dushlaine, C., Pato, C., Pato, M., MacArthur, D. G., McCarroll, S. A., and Eggan, K. (2022) Whole-genome analysis of human embryonic stem cells enables rational line selection based on genetic variation, *Cell Stem Cell*, **29**, 472-486.e7, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.01.011>.
 98. Puigdevall, P., Jerber, J., Danecek, P., Castellano, S., and Kilpinen, H. (2023) Somatic mutations alter the differentiation outcomes of iPSC-derived neurons, *Cell Genom.*, **3**, 100280, <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2023.100280>.
 99. Ohm, J. E., Mali, P., Van Neste, L., Berman, D. M., Liang, L., Pandiyan, K., Briggs, K. J., Zhang, W., Argani, P., Simons, B., Yu, W., Matsui, W., Van Criekinge, W., Rassool, F. V., Zambidis, E., Schuebel, K. E., Cope, L., Yen, J., Mohammad, H. P., Cheng, L., and Baylin, S. B. (2010) Cancer-related epigenome changes associated with reprogramming to induced pluripotent stem cells, *Cancer Res.*, **70**, 7662-7673, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1361>.
 100. Planello, A. C., Ji, J., Sharma, V., Singhania, R., Mbabaali, F., Müller, F., Alfaro, J. A., Bock, C., De Carvalho, D. D., and Batada, N. N. (2014) Aberrant DNA methylation reprogramming during induced pluripotent stem cell generation is dependent on the choice of reprogramming factors, *Cell Regen.*, **3**, 4, <https://doi.org/10.1186/2045-9769-3-4>.
 101. Weissbein, U., Plotnik, O., Vershkov, D., and Benvenisty, N. (2017) Culture-induced recurrent epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells, *PLoS Genet.*, **13**, e1006979, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006979>.
 102. Ruiz, S., Diep, D., Gore, A., Panopoulos, A. D., Montserrat, N., Plongthongkum, N., Kumar, S., Fung, H. L., Giorgetti, A., Bilic, J., Batchelder, E. M., Zaehres, H., Kan, N. G., Schöler, H. R., Mercola, M., Zhang, K., and Izpisua Belmonte, J. C. (2012) Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 16196-16201, <https://doi.org/10.1073/pnas.1202352109>.
 103. Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C. M., Clark, A. T., Baxter, T., Pyle, A. D., Teitell, M. A., Pelegrini, M., Plath, K., and Lowry, W. E. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures, *Cell Stem Cell*, **5**, 111-123, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.008>.
 104. Poetsch, M. S., Strano, A., and Guan, K. (2022) Human induced pluripotent stem cells: from cell origin, genomic stability, and epigenetic memory to translational medicine, *Stem Cells*, **40**, 546-555, <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxac020>.
 105. Buckberry, S., Liu, X., Poppe, D., Tan, J. P., Sun, G., Chen, J., Nguyen, T. V., de Mendoza, A., Pflueger, J., Frazer, T., Vargas-Landín, D. B., Paynter, J. M., Smits, N., Liu, N., Ouyang, J. F., Rossello, F. J., Chy, H. S., Rackham, O. J. L., Laslett, A. L., Breen, J., Faulkner, G. J., Nefzger, C. M., Polo, J. M., and Lister, R. (2023) Transient naive reprogramming corrects hiPS cells functionally and epigenetically, *Nature*, **620**, 863-872, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06424-7>.
 106. Wang, X., Qin, J., Zhao, R. C., and Zenke, M. (2014) Reduced immunogenicity of induced pluripotent stem cells derived from Sertoli cells, *PLoS One*, **9**, e106110, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106110>.
 107. Liu, P., Chen, S., Li, X., Qin, L., Huang, K., Wang, L., Huang, W., Li, S., Jia, B., Zhong, M., Pan, G., Cai, J., and Pei, D. (2013) Low immunogenicity of neural progenitor cells differentiated from induced pluripotent stem cells derived from less immunogenic somatic cells, *PLoS One*, **8**, e69617, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069617>.
 108. Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., and Kershaw, M. H. (2011) Activating and inhibitory receptors of natural killer cells, *Immunol. Cell Biol.*, **89**, 216-224, <https://doi.org/10.1038/icb.2010.78>.
 109. Netter, P., Anft, M., and Watzl, C. (2017) Termination of the activating NK Cell immunological synapse is an active and regulated process, *J. Immunol.*, **199**, 2528-2535, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700394>.
 110. Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T., and Old, L. J. (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 615-625, <https://doi.org/10.1038/nrc1669>.
 111. Hong, Y., Zhao, Y., Li, H., Yang, Y., Chen, M., Wang, X., Luo, M., and Wang, K. (2023) Engineering the maturation of stem cell-derived cardiomyocytes, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **11**, 1155052, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1155052>.
 112. Tricot, T., Verfaillie, C. M., and Kumar, M. (2022) Current status and challenges of human induced pluripotent stem cell-derived liver models in drug discovery, *Cells*, **11**, 442, <https://doi.org/10.3390/cells11030442>.
 113. Diane, A., Mohammed, L. I., and Al-Siddiqi, H. H. (2023) Islets in the body are never flat: transitioning from two-dimensional (2D) monolayer culture to three-dimensional (3D) spheroid for better efficiency in the generation of functional hPSC-derived pancreatic β cells *in vitro*, *Cell Commun. Signal.*, **21**, 151, <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01171-8>.
 114. Ma, H., Folmes, C. D., Wu, J., Morey, R., Mora-Castilla, S., Ocampo, A., Ma, L., Poulton, J., Wang, X., Ahmed, R., Kang, E., Lee, Y., Hayama, T., Li, Y., Van Dyken, C., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Koski, A., Mitalipov, N., Amato, P., Wolf, D. P., Huang, T., Terzic, A., Laurent, L. C., Izpisua Belmonte, J. C., and Mitalipov, S. (2015) Meta-

- bolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease, *Nature*, **524**, 234-238, <https://doi.org/10.1038/nature14546>.
115. Cacchiarelli, D., Trapnell, C., Ziller, M. J., Soumillon, M., Cesana, M., Karnik, R., Donaghey, J., Smith, Z. D., Ratanasirintrawoot, S., Zhang, X., Ho Sui, S. J., Wu, Z., Akopian, V., Gifford, C. A., Doench, J., Rinn, J. L., Daley, G. Q., Meissner, A., Lander, E. S., and Mikkelsen, T. S. (2015) Integrative analyses of human reprogramming reveal dynamic nature of induced pluripotency, *Cell*, **162**, 412-424, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.016>.
116. Choi, J., Lee, S., Mallard, W., Clement, K., Tagliazucchi, G. M., Lim, H., Choi, I. Y., Ferrari, F., Tsankov, A. M., Pop, R., Lee, G., Rinn, J. L., Meissner, A., Park, P. J., and Hochedlinger, K. (2015) A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 1173-1181, <https://doi.org/10.1038/nbt.3388>.
117. Idelson, M., Alper, R., Obolensky, A., Yachimovich-Cohen, N., Rachmilewitz, J., Ejzenberg, A., Beider, E., Banin, E., and Reubinoff, B. (2018) Immunological properties of human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells, *Stem Cell Rep.*, **11**, 681-695, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.009>.
118. Yamasaki, S., Sugita, S., Horiuchi, M., Masuda, T., Fujii, S., Makabe, K., Kawasaki, A., Hayashi, T., Kuwahara, A., Kishino, A., Kimura, T., Takahashi, M., and Mandai, M. (2021) Low immunogenicity and immunosuppressive properties of human ESC- and iPSC-derived retinas, *Stem Cell Rep.*, **16**, 851-867, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.02.021>.
119. Edo, A., Sugita, S., Futatsugi, Y., Sho, J., Onishi, A., Kiuchi, Y., and Takahashi, M. (2020) Capacity of retinal ganglion cells derived from human induced pluripotent stem cells to suppress T-cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7831, <https://doi.org/10.3390/ijms21217831>.
120. Liu, J., Götherström, C., Forsberg, M., Samuelsson, E. B., Wu, J., Calzarossa, C., Hovatta, O., Sundström, E., and Åkesson, E. (2013) Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials *in vitro*, *Stem Cell Res.*, **10**, 325-337, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.01.001>.
121. Itakura, G., Ozaki, M., Nagoshi, N., Kawabata, S., Nishiyama, Y., Sugai, K., Iida, T., Kashiwagi, R., Ookubo, T., Yastake, K., Matsubayashi, K., Kohyama, J., Iwanami, A., Matsumoto, M., Nakamura, M., and Okano, H. (2017) Low immunogenicity of mouse induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells, *Sci. Rep.*, **7**, 12996, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13522-w>.
122. Ozaki, M., Iwanami, A., Nagoshi, N., Kohyama, J., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Nishiyama, Y., Kawabata, S., Sugai, K., Iida, T., Matsubayashi, K., Isoda, M., Kashiwagi, R., Toyama, Y., Matsumoto, M., Okano, H., and Nakamura, M. (2017) Evaluation of the immunogenicity of human iPS cell-derived neural stem/progenitor cells *in vitro*, *Stem Cell Res.*, **19**, 128-138, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.01.007>.
123. Fujii, S., Yoshida, S., Inagaki, E., Hatou, S., Tsubota, K., Takahashi, M., Shimmura, S., and Sugita, S. (2019) Immunological properties of neural crest cells derived from human induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev.*, **28**, 28-43, <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0058>.
124. Mehler, V. J., Burns, C. J., Stauss, H., Francis, R. J., and Moore, M. L. (2020) Human iPSC-derived neural crest stem cells exhibit low immunogenicity, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, **16**, 161-171, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.12.015>.
125. Kimura, T., Yamashita, A., Ozono, K., and Tsumaki, N. (2016) Limited immunogenicity of human induced pluripotent stem cell-derived cartilages, *Tissue Eng. Part A*, **22**, 1367-1375, <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0189>.
126. Wong, K. G., Ryan, S. D., Ramnarine, K., Rosen, S. A., Mann, S. E., Kulick, A., De Stanchina, E., Müller, F. J., Kacmarczyk, T. J., Zhang, C., Betel, D., and Tomishima, M. J. (2017) CryoPause: a new method to immediately initiate experiments after cryopreservation of pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, **9**, 355-365, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.010>.
127. Ji, J., Sharma, V., Qi, S., Guarch, M. E., Zhao, P., Luo, Z., Fan, W., Wang, Y., Mbabaali, F., Neculai, D., Esteban, M. A., McPherson, J. D., and Batada, N. N. (2014) Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, **2**, 44-51, <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.004>.
128. Martin, M. J., Muotri, A., Gage, F., and Varki, A. (2005) Human embryonic stem cells express an immunogenic non-human sialic acid, *Nat. Med.*, **11**, 228-232, <https://doi.org/10.1038/nm1181>.
129. Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., and Muchmore, E. (2003) Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12045-12050, <https://doi.org/10.1073/pnas.2131556100>.
130. Rodríguez-Pizà, I., Richaud-Patin, Y., Vassena, R., González, F., Barrero, M. J., Veiga, A., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J. C. (2010) Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions, *Stem Cells*, **28**, 36-44, <https://doi.org/10.1002/stem.248>.
131. Swistowski, A., Peng, J., Liu, Q., Mali, P., Rao, M. S., Cheng, L., and Zeng, X. (2010) Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions, *Stem Cells*, **28**, 1893-1904, <https://doi.org/10.1002/stem.499>.

132. Chung, T. L., Turner, J. P., Thaker, N. Y., Kolle, G., Cooper-White, J. J., Grimmond, S. M., Pera, M. F., and Wolvetang, E. J. (2010) Ascorbate promotes epigenetic activation of CD30 in human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **28**, 1782-1793, <https://doi.org/10.1002/stem.500>.
133. Lagarkova, M. A., Volchkov, P. Y., Philonenko, E. S., Pfannkuche, K., Prokhorovich, M. A., Zabolotina, T., Hescheler, J., and Kiselev, S. L. (2008) CD 30 is a marker of undifferentiated human embryonic stem cells rather than a biomarker of transformed hESCs, *Cell Cycle*, **7**, 3610-3612, <https://doi.org/10.4161/cc.7.22.6981>.
134. Kaneko, S., and Yamanaka, S. (2013) To be immunogenic, or not to be: that's the iPSC question, *Cell Stem Cell*, **12**, 385-386, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.008>.
135. Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., Kawamata, S., and Takahashi, M. (2017) Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration, *N. Engl. J. Med.*, **376**, 1038-1046, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368>.
136. Takagi, S., Mandai, M., Gocho, K., Hirami, Y., Yamamoto, M., Fujihara, M., Sugita, S., Kurimoto, Y., and Takahashi, M. (2019) Evaluation of transplanted autologous induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium in exudative age-related macular degeneration, *Ophthalmol. Retina*, **3**, 850-859, <https://doi.org/10.1016/j.oret.2019.04.021>.
137. Schweitzer, J. S., Song, B., Herrington, T. M., Park, T. Y., Lee, N., Ko, S., Jeon, J., Cha, Y., Kim, K., Li, Q., Henchcliffe, C., Kaplitt, M., Neff, C., Rapalino, O., Seo, H., Lee, I. H., Kim, J., Kim, T., Petsko, G. A., Ritz, J., Cohen, B. M., Kong, S. W., Leblanc, P., Carter, B. S., and Kim, K. S. (2020) Personalized iPSC-derived dopamine progenitor cells for Parkinson's disease, *N. Engl. J. Med.*, **382**, 1926-1932, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1915872>.
138. Sugimoto, N., Kanda, J., Nakamura, S., Kitano, T., Hishizawa, M., Kondo, T., Shimizu, S., Shigemasa, A., Hirai, H., Arai, Y., Minami, M., Tada, H., Momose, D., Koh, K. R., Nogawa, M., Watanabe, N., Okamoto, S., Handa, M., Sawaguchi, A., Matsuyama, N., and Eto, K. (2022) iPLAT1: the first-in-human clinical trial of iPSC-derived platelets as a phase 1 autologous transfusion study, *Blood*, **140**, 2398-2402, <https://doi.org/10.1182/blood.2022017296>.
139. Hu, X., White, K., Olroyd, A. G., DeJesus, R., Dominguez, A. A., Dowdle, W. E., Frier, A. M., Young, C., Wells, F., Chu, E. Y., Ito, C. E., Krishnapura, H., Jain, S., Ankala, R., McGill, T. J., Lin, A., Egenberger, K., Gagnon, A., Michael Rukstalis, J., Högberg, N. J., and Schrepfer, S. (2024) Hypoimmune induced pluripotent stem cells survive long term in fully immunocompetent, allogeneic rhesus macaques, *Nat. Biotechnol.*, **42**, 413-423, <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01784-x>.
140. Deuse, T., Hu, X., Agbor-Enoh, S., Jang, M. K., Alawi, M., Saygi, C., Gravina, A., Tediashvili, G., Nguyen, V. Q., Liu, Y., Valentine, H., Lanier, L. L., and Schrepfer, S. (2021) The SIRPα-CD47 immune checkpoint in NK cells, *J. Exp. Med.*, **218**, e20200839, <https://doi.org/10.1084/jem.20200839>.
141. Harding, J., Vintersten-Nagy, K., Yang, H., Tang, J. K., Shutova, M., Jong, E. D., Lee, J. H., Massumi, M., Oussenko, T., Izadifar, Z., Zhang, P., Rogers, I. M., Wheeler, M. B., Lye, S. J., Sung, H. K., Li, C., Izadifar, M., and Nagy, A. (2023) Immune-privileged tissues formed from immunologically cloaked mouse embryonic stem cells survive long term in allogeneic hosts, *Nat. Biomed. Eng.*, <https://doi.org/10.1038/s41551-023-01133-y>.
142. Viacyste. CRISPR Therapeutics and ViaCyte, Inc. announce first patient dosed in phase 1 clinical trial of novel gene-edited cell replacement therapy for treatment of type 1 diabetes (T1D). February 2, 2022, URL: <https://crisprtx.com/about-us/press-releases-and-presentations/crispr-therapeutics-and-viacyte-inc-announce-first-patient-dosed-in-phase-1-clinical-trial-of-novel-gene-edited-cell-replacement-therapy-for-treatment-of-type-1-diabetes-t1d>.
143. González, B. J., Creusot, R. J., Sykes, M., and Egli, D. (2020) How safe are universal pluripotent stem cells? *Cell Stem Cell*, **26**, 307-308, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.02.006>.
144. Harding, J., Vintersten-Nagy, K., and Nagy, A. (2020) Universal stem cells: making the unsafe safe, *Cell Stem Cell*, **27**, 198-199, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.07.004>.
145. Zimmer, J., Andrès, E., Donato, L., Hanau, D., Hentges, F., and de la Salle, H. (2005) Clinical and immunological aspects of HLA class I deficiency, *QJM*, **98**, 719-727, <https://doi.org/10.1093/qjmed/hci112>.
146. Hara, A., Aoki, H., Taguchi, A., Niwa, M., Yamada, Y., Kunisada, T., and Mori, H. (2008) Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter, *Stem Cells Dev.*, **17**, 619-627, <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0235>.
147. Liang, Q., Monetti, C., Shutova, M. V., Neely, E. J., Hacibekiroglu, S., Yang, H., Kim, C., Zhang, P., Li, C., Nagy, K., Mileikovsky, M., Gyongy, I., Sung, H. K., and Nagy, A. (2018) Linking a cell-division gene and a suicide gene to define and improve cell therapy safety, *Nature*, **563**, 701-704, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0733-7>.
148. Wu, Y., Chang, T., Long, Y., Huang, H., Kandeel, F., and Yee, J. K. (2019) Using gene editing to establish a safeguard system for pluripotent stem-cell-based therapies, *iScience*, **22**, 409-422, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.038>.
149. Viacyste. CRISPR Therapeutics and ViaCyte present positive *in vitro* data towards a potential immune-evasive cell replacement therapy for diabetes at EASD 2019. September 17, 2019, URL: <https://crisprtx.com/about-us/press-releases-and-presentations/crispr-therapeutics-and-via-cyte-present-positive-in-vitro-data-towards-a-potential-immune-evasive-cell-replacement-therapy-for-diabetes-at-easd-2019>.

DYSREGULATION OF IMMUNE TOLERANCE TO AUTOLOGOUS iPSCs AND THEIR DIFFERENTIATED DERIVATIVES

Review

M. E. Bogomiakova^{1,2*}, A. N. Bogomazova^{1,2}, and M. A. Lagarkova^{1,3}

¹ *Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia; e-mail: margbog@rcpcm.ru*

² *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia*

³ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) due to their ability to differentiate into the desired cell type are a promising tool for solving the problems of transplantation medicine. In addition, the reprogramming technology makes it possible to obtain a personalized, i.e., patient-specific, cell product whose transplantation should not cause problems related to histocompatibility of transplanted tissues and organs. At the same time, inconsistent information about the main advantage of autologous iPSC derivatives – lack of immunogenicity – still casts doubt on the possibility of using such cells beyond immunosuppressive therapy protocols. This review is devoted to the immunogenic properties of syngeneic and autologous iPSCs and their derivatives, as well as to discussion of the reasons of dysregulation of their immune tolerance.

Keywords: induced pluripotent stem cells, immune response, immunogenicity, immunotolerance, T-cells, NK-cells, differentiation

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ И ФУНКЦИЙ МАКРОФАГОВ В ГОМЕОСТАЗЕ И ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Обзор

© 2024 Т.Р. Юракова¹, Е.А. Горшкова¹, М.А. Носенко², М.С. Друцкая^{1,3*}

¹ ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: marinadru@gmail.com

² Тринити-колледж Дублина, Институт биомедицинских наук Тринити,
D02F306 Дублин, Ирландия

³ НТУ «Сириус», Центр генетики и наук о жизни,
354340 Федеральная территория Сириус, Краснодарский край, Россия

Поступила в редакцию 27.11.2023

После доработки 06.02.2024

Принята к публикации 08.02.2024

В последнее время особое внимание уделяют изучению связи иммунологических процессов с изменениями клеточного обмена веществ. Это взаимодействие лежит в основе, с одной стороны, поддержания гомеостаза и целостности тканей, с другой – воспаления как неотъемлемой части иммунного ответа. Метаболические адаптации не только обеспечивают иммунные реакции энергией, но и влияют на функции иммунных клеток путем контроля транскрипционных и посттранскрипционных программ. В связи с этим изучение метаболизма иммунных клеток способствует поиску новых подходов к лечению целого ряда заболеваний, в том числе связанных с метаболическими нарушениями. Ключевую роль в поддержании гомеостаза и регуляции воспаления играют макрофаги – клетки врожденной иммунной системы, характеризующиеся высокой функциональной пластичностью. В зависимости от фенотипа и происхождения они могут как выполнять регуляторные функции, так и способствовать развитию воспаления и усугублять течение заболевания. Поэтому то, как именно происходит адаптация миелоидных клеток в ответ на воздействие факторов микроокружения, может определять силу и характер реакции организма в целом. В обзоре рассмотрено влияние метаболических изменений в макрофагах на их функциональные свойства, в том числе поляризацию. В контексте воспалительных и метаболических заболеваний особое внимание уделено роли иммунометаболических адаптаций миелоидных клеток в поддержании гомеостаза тканей и протекании различных патологических процессов. В заключительной части обзора рассмотрены способы модуляции метаболизма макрофагов в качестве потенциального терапевтического подхода.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: провоспалительные цитокины, поляризация макрофагов, иммунометаболизм.

DOI: 10.31857/S0320972524050047 **EDN:** YPEDJL

ВВЕДЕНИЕ

Основной фокус большинства иммунологических исследований как в клеточных, так и в животных моделях долгое время был сосредоточен на функциях иммунных клеток с точки зрения механизмов распознавания и элиминации антигенов, продукции активных веществ и цитокинов. С развитием этой области науки иммунный ответ все чаще стали рассматривать как системную реакцию организма, приводящую к функциональным изме-

нениям в тканях и органах, а также к перестройке метаболизма в целом. Первые открытия о связи метаболизма и иммунной системы были сделаны еще в прошлом столетии, когда физиолог Отто Варбург отметил, что повышение клеточного гликолиза характерно не только для опухолевых клеток, но и для активированных лейкоцитов [1, 2]. На сегодняшний день метаболические адаптации рассматриваются как неотъемлемая часть иммунной реакции [3–8]. Открытие и описание регуляторных путей, отвечающих за метаболический контроль иммунологических процессов (таких как инфекционные и опухолевые заболевания,

* Адресат для корреспонденции.

регенерация тканей) на клеточном, тканевом и организменном уровнях, привело к появлению новой междисциплинарной области исследований – иммунометаболизму [3, 8]. Иммунометаболические нарушения лежат в основе множества заболеваний современного человека, включая ожирение, диабет, сепсис, а также аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний [3]. В связи с этим становится важным понимание того, как физиологическое микроокружение иммунных клеток внутри конкретных тканей и органов регулирует их функцию. В этом отношении наибольший интерес среди иммунных клеток представляют макрофаги, которые обнаруживаются почти во всех тканях животных и являются неотъемлемым звеном поддержания тканевого гомеостаза [9]. В обзоре будет рассмотрена связь функциональных и метаболических особенностей макрофагов в гомеостазе, а также проведены параллели с их иммунометаболическими нарушениями в контексте ряда заболеваний. Наконец, в обзоре обсуждаются возможные пути терапии, основанные на модуляции метаболизма макрофагов.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МАКРОФАГОВ

Первоначально макрофаги рассматривали в основном как часть «моноклеарной фагоцитирующей системы», ответственной за удаление патогенов и апоптотических клеток. В современной иммунологии представление о функциях и происхождении макрофагов было существенным образом расширено. Так, было показано, что эти клетки играют важную роль в поддержании гомеостаза, закладке тканей в эмбриогенезе, заживлении ран, а также могут осуществлять тканеспецифичные функции [10]. От тканерезидентных макрофагов зависит нормальное развитие и функционирование мозга, костей, яичников и жировой ткани. На уровне всего организма макрофаги участвуют в контроле системного метаболизма и адаптации к холоду [11, 12]. Наконец, макрофагам отводят существенную роль в развитии ряда метаболических заболеваний, таких как атеросклероз [13], остеопороз, ожирение и диабет 2-го типа [14, 15], также

известен патогенный вклад макрофагов при фиброзе [16] и образовании опухолей [17].

Тканерезидентные макрофаги в разных органах могут существенно отличаться как фенотипически, так и функционально. Внутри одного органа или ткани популяция макрофагов также характеризуется функциональной гетерогенностью, которая зависит от расположения клеток, состояния ткани, происхождения и многих других факторов. Тканерезидентные макрофаги могут дифференцироваться из трех типов предшественников: гемопоэтических стволовых клеток желточного мешка, печени плода и костного мозга [18, 19]. При этом доля макрофагов, происходящих из разных волн миграции, будет варьировать в зависимости от органа [20] (рис. 1, а и б).

Макрофаги могут приобретать различные фенотипы в зависимости от сигналов, присутствующих в окружающей их среде [21]. В общем случае принято выделять два характерных фенотипа макрофагов: провоспалительные (M1) и противовоспалительные (M2). M1-Макрофаги индуцируют и поддерживают воспаление: выделяют провоспалительные цитокины, активируют клетки эндотелия и способствуют привлечению других иммунных клеток в очаг воспаления. M2-Макрофаги осуществляют реакции разрешения воспалительного процесса: фагоцитируют клетки, подвергшиеся апоптозу, запускают депонирование коллагена, координируют восстановление тканей и высвобождение противовоспалительных цитокинов [22]. Важно отметить, что такое четкое разделение фенотипов M1 и M2 наблюдается в основном в опытах *in vitro* при использовании определенных сочетаний стимулов. В физиологических условиях большое влияние на фенотип макрофагов оказывает как разнообразие сигнальных молекул, так и микроокружение конкретной ткани, из-за чего в чистом виде M1- и M2-фенотипы не встречаются [23]. В зависимости от контекста макрофаги могут приобретать промежуточный или уникальный фенотип, а также, как правило, они представлены в виде смешанной гетерогенной популяции M1 и M2 [23]. В связи с этим поляризацию макрофагов *in vivo* более корректно рассматривать как сложный, развивающийся во времени, тканеспецифичный процесс (рис. 1) [24–26].

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; 2-ДГ – 2-дезоксиглюкоза; ДМФ – диметилфумарат; ЖК – жирные кислоты; ПФП – пентозофосфатный путь; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; ACLY – АТФ-цитратлиаза; AMPK – АМР-активируемая протеинкиназа; ARG1 – аргиназа 1; BPTES – блокатор бис-2-(5-фенилацетамидо-1,3,4-тиадиазол-2-ил) этилсульфида; CPT – карнитин-пальмитоил-трансфераза; IDH – изоцитратдегидрогеназа; iNOS – NO-синтаза GS – глутаминсинтетаза; 2-HG – 2-гидроксиглутарат; HIF-1 α – индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа; LDHA – лактатдегидрогеназа; LPS – липополисахарид; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; NOX – NADPH-оксидаза; 4-OI – 4-октилитаконат; OXPHOS – окислительное фосфорилирование; PGE₂ – простагландин E2; PKM2 – пируваткиназа M2; SDH – сукцинатдегидрогеназа; TLR – толл-подобные рецепторы.

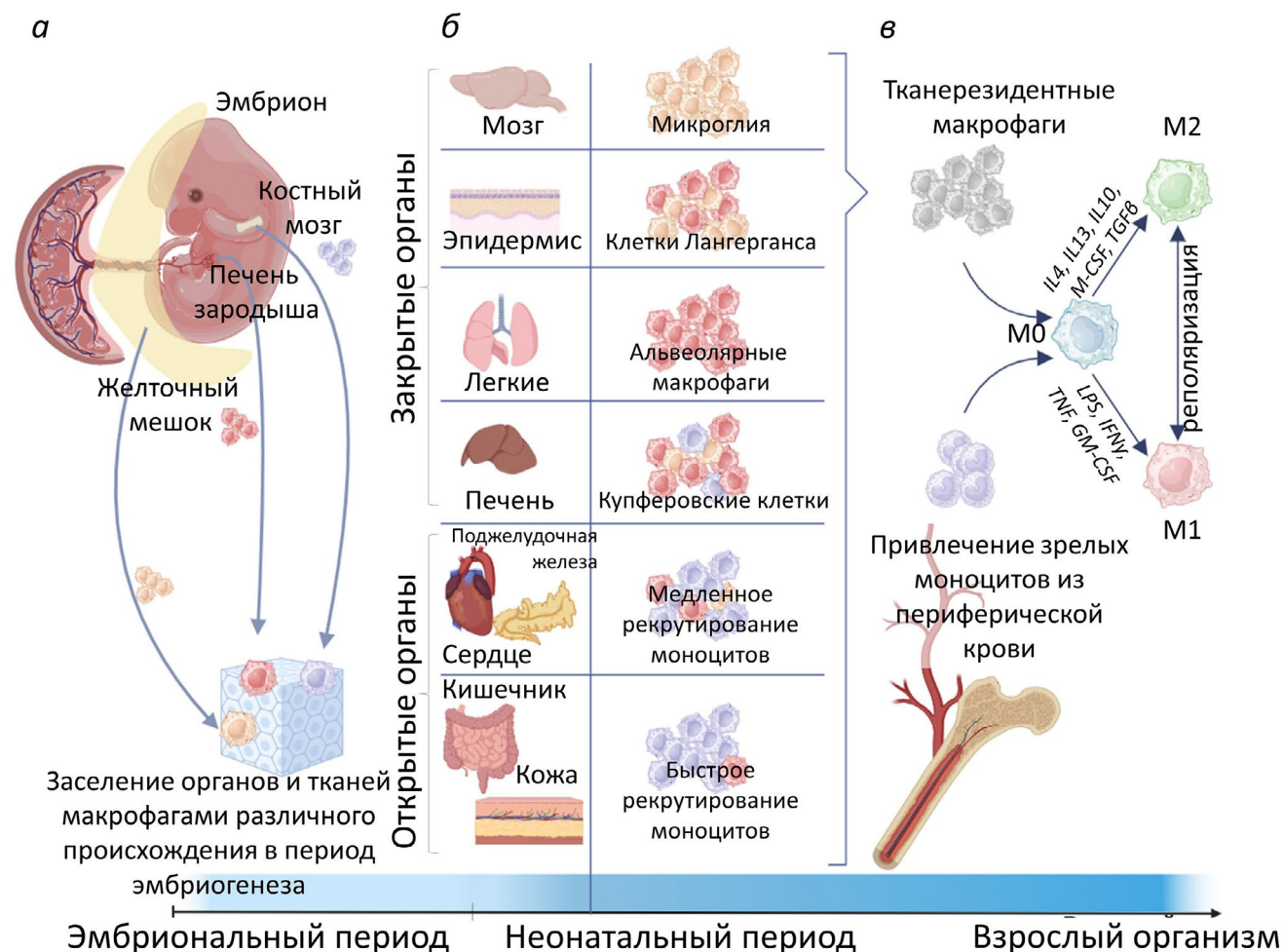


Рис. 1. Дифференцировка и поляризация макрофагов. *а* – Тканерезидентные макрофаги дифференцируются из трех типов предшественников: гемопоэтических стволовых клеток желточного мешка, печени плода и костного мозга. *б* – Тканерезидентные макрофаги различных органов отличаются по происхождению. В закрытых органах тканерезидентные макрофаги закладываются во время эмбриогенеза, во взрослом возрасте моноциты периферической крови в них практически не мигрируют. В открытых органах с разной скоростью (медленно или быстро) происходит рекрутирование моноцитов и замена ими тканерезидентных макрофагов, заложенных во время эмбриогенеза. *в* – Фенотип тканерезидентных макрофагов является комбинацией программ их дифференцировки и поляризации. Под влиянием сигналов, присутствующих в среде, макрофаги поляризуются в провоспалительный (M1) или противовоспалительный (M2) фенотипы. Рисунок сделан с помощью программы BioRender по ранее опубликованным материалам [20, 24–26]

На молекулярном уровне выделяют два этапа «принятия решения о поляризации» [27]. Первый этап принятия решения об изменении функционального состояния M1/M2 предполагает активацию сигнальных путей, ассоциированных либо с рецепторами врожденного иммунитета (PAMP), либо со стимулами, полученными от Т-клеток [28, 29]. Сигналы, приводящие к поляризации макрофагов *in vivo*, зачастую трудно определить [21]. Для поляризации M1-макрофагов *in vitro* обычно используют бактериальный эндотоксин, липополисахарид (LPS) или комбинацию LPS с IFN γ , основным Th1-ассоциированным цитокином, а для M2-макрофагов – IL-4 или комбинацию IL-4 и IL-13, то есть Th2-ассоциированные цитокины [22]. Транскрипционные факторы IRE,

STAT и NF- κ B играют ключевую роль в контроле поляризации M1/M2. Примечательно, что регуляторы M1 (NF- κ B-p50-p65, STAT1, IRF5, SOCS3 и HIF-1 α) имеют антагонистические взаимодействия с регуляторами M2 (NF- κ B-p50-p65, STAT6, IRF4, SOCS1 и HIF-2). Второй этап «принятия решения о поляризации» происходит на уровне взаимодействия транскрипционных факторов [30] и тесно связан с активностью двух основных регуляторов клеточного метаболизма: AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) и мишени рапамицина млекопитающих (mTOR). Важнейшим результатом второго этапа является изменение экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом. Изменения затрагивают множество метаболических путей: гликолиз, цикл Кребса, окислительное фосфорилирование,

пентозо-фосфатный путь, образование NADPH и активных форм кислорода (АФК), биосинтез нуклеотидов, аминокислот и метаболизм азота.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ МАКРОФАГОВ ПРИ ПОЛЯРИЗАЦИИ

В общем виде для удовлетворения своих потребностей в аденозинтрифосфате (АТФ) и NADPH М1-макрофаги используют аэробный гликолиз и пентозофосфатный путь (ПФП), при этом цикл Кребса разобщается в двух точках, а клеточное дыхание и, в частности, окислительное фосфорилирование (ОХРНOS) снижается. Также происходят изменения в метаболизме жирных кислот (ЖК): их синтез увеличивается, а бета-окисление подавляется. М2-Макрофаги мало зависят от гликолиза в качестве источника энергии и используют в основном ОХРНOS, разобщения цикла Кребса у них не происходит. Глюкоза при этой поляризации поступает в основном в ПФП и используется для синтеза УДФ-N-ацетилглюкозамина (UDP-GlcNAc) [31]. В метаболизме ЖК в М1-макрофагах наблюдаются противоположные изменения: их синтез снижается, а окисление увеличивается [22, 30]. По изменению характерных для М1- или М2-фенотипа свойств (табл. 1) на фоне фармацевтической или генетической блокировки различных ферментов, задействованных в метаболических путях, можно оценить вклад того или иного метаболического пути в поляризацию. Рассмотрим подробнее метаболические изменения, происходящие при поляризации макрофагов.

Метаболизм глюкозы. Глюкоза важна как для М1-, так и для М2-поляризации [32, 33], однако ее распределение между метаболическими путями отличается для типов активации. М1-Макрофаги значительно повышают потребление глюкозы за счет увеличения экспрессии транспортера GLUT1 [34], тогда как поступление глюкозы в М2-макрофаги не изменяется по сравнению с неактивированными клетками [35]. В иммунометаболизме наибольшее внимание уделено гликолизу как метаболическому пути, сопряженному с продукцией АТФ. Однако последние данные указывают на важную роль ПФП и гликозилирования в метаболизме активированных иммунных клеток. Для изучения роли глюкозы, как правило, используют ее аналог 2-дезоксиглюкозу (2-ДГ), однако ее действие не является специфичным, поскольку приводит к блокировке всех путей катаболизма глюкозы в иммунных клетках, а не только гликолиза [36]. Как следствие, 2-ДГ нарушает поляризацию как М1-, так и М2-макрофагов, из чего в ряде исследований был сделан недостоверный вывод о значительном вкладе гликолиза в оба вида поляризации макрофагов.

Более детальное исследование показывает, что гликолиз критически важен именно для М1-макрофагов [31]. Так, активация М1-макрофагов сопряжена с увеличением экспрессии нескольких вариантов ключевого фермента гликолиза фосфофруктокиназы (PFK1-M и PFK2) [35, 37]. Реакция, катализируемая этим ферментом, является необратимой и характерной только для гликолиза. Увеличение экспрессии PFK-M связано с подавлением продукции микроРНК-21 при стимуляции макро-

Таблица 1. Свойства М1- и М2-макрофагов

Свойство поляризации	М1 (LPS + IFN γ)	М2 (IL-4 + IL-13)
Стимулы	LPS + IFN γ ; бактериальные продукты LPS и другие лиганды TLR; цитокины Th1-лимфоцитов (IFN γ , TNF)	IL-4 + IL-13; базофилы; тучные клетки; Th2-лимфоциты
Факторы, выделяемые клеткой	TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23; АФК, PGE $_2$	IL-10, TGF β , IGF-1, VEGF-A, EGF, PDGF
Поверхностные маркеры	CD80, CD86, CD11b, MHCII	маннозный рецептор (CD206), CD36, IL1R α , CD163, CD36, RELM α (FIZZ1 – у человека), MMP
Сигнальные пути	NF- κ B (p50-p65), STAT1, IRF5, HIF-1 α , SOCS3, AP1; активация инфламмосомы	NF- κ B (p50-p65), STAT6, IRF4, HIF2, SOCS1, GATA3, PPAR γ , (у мышей – также Ym1)
Функции	уничтожение бактерий; резистентность к опухолям; Th1-ответ; способность убивать патогены и презентировать антигены Т-лимфоцитам	противовоспалительный ответ; реконструирование тканей; заживление ран; ангиогенез

фагов IFN γ [37]. Подавление PFK2 приводило к снижению экспрессии NO-синтазы (iNOS) и митоген-индуцибельной формы циклооксигеназы (COX2) M1-макрофагами [35]. Также M1-, но не M2-макрофаги, повышали экспрессию регулятора фосфофруктокиназы (PFKFB3), ингибирование которого препятствует увеличению гликолиза и активации M1-макрофагов [38]. Ингибирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), одного из ключевых ферментов гликолиза, подавляет продукцию IL-1 β аналогично 2-ДГ [32, 39]. Наконец, подавление экспрессии генов ферментов лактатдегидрогеназы (LDHA) и киназы пируватдегидрогеназы 1 (PDK1) также вызывало снижение продукции IL-1 β макрофагами [40]. Причины, по которым гликолиз является критическим для M1-макрофагов, не до конца ясны. Предположительно, это связано с подавлением окислительного фосфорилирования при M1-поляризации, что требует компенсаторного усиления гликолиза для обеспечения продукции АТФ. В M2-макрофагах, в которых OXPHOS в полной мере сохраняет свою активность, гликолиз не является критически необходимым для поддержания энергетического баланса [36].

Важнейшим транскрипционным фактором, регулирующим гликолиз, является индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа (HIF-1 α) [41]. HIF-1 α контролирует экспрессию генов ферментов гликолиза, транспортера глюкозы GLUT1, воспалительных медиаторов, LDHA и PDK. LDHA катализирует превращение пирувата в лактат, а PDK инактивирует пируватдегидрогеназу (PDH) и уменьшает поступление пирувата в цикл Кребса. Превращение пирувата в лактат важно для M1-макрофагов, поскольку обеспечивает возобновление пула NAD $^{+}$ для поддержания реакций гликолиза. Экспрессия HIF-1 α регулируется сигналами от рецепторов врожденного иммунитета и провоспалительных цитокинов через NF- κ B [42–44], а также от факторов роста, например, GM-CSF, активируют HIF-1 α за счет PI3K/AKT/mTOR пути [45–49]. Хотя в присутствии кислорода HIF-1 α становится неактивным, он может быть стабилизирован за счет сукцината, вырабатываемого в митохондриях при разобщении цикла Кребса [22, 32].

Дифференциальная регуляция гликолиза в M1- и M2-макрофагах также осуществляется за счет экспрессии различных изоформ пируваткиназы M2 (PKM2) [35, 50, 51]. Существует две конфигурации фермента PKM2: тетрамер белка является функциональным участником гликолиза, тогда как димер не обладает ферментативной активностью, а вместо этого локализуется в ядре и выполняет функцию транскрипционного фактора, регулируя экспрессию HIF-1 α -зависимых генов, в том числе IL-1 β . Стабилизация тетрамерной формы PKM2 с помощью малой молекулы TEPP-46 снижает акти-

вацию M1-макрофагов и делает их фенотипически более похожими на M2 [50].

Пентозофосфатный путь. ПФП, так же как и гликолиз, происходит в цитоплазме. Окислительная фаза ПФП играет важную роль в метаболизме M1-макрофагов [32, 52]. В окислительной фазе ПФП глюкоза-6-фосфат превращается в рибулозу-5-фосфат, что сопровождается образованием NADPH из N и NADP $^{+}$. С одной стороны, NADPH участвует в синтезе глутатиона, который обладает антиоксидантными свойствами и защищает клетку от окислительного стресса; с другой стороны, NADPH является субстратом для многих ферментов (например, NADPH-оксидазы), продуцирующих АФК, которые, в свою очередь, важны для уничтожения патогенов M1-макрофагами [22, 53]. NADPH также необходим для синтеза ЖК и простагландинов.

В случае M2-макрофагов ПФП оказывается не так важен и задействован лишь ограниченно. Так, из рибозо-5-фосфата, полученного в ходе окислительной стадии ПФП, синтезируется UDP-GlcNAc, участвующий в N-гликозилировании маннозного рецептора, обильно представленного на поверхности M2-макрофагов [54]. UDP-GlcNAc также синтезируется независимо от ПФП из глюкозо-1-фосфата. Этот путь тоже значительно активирован при M2-поляризации [31]. Важность N-гликозилирования для M2-фенотипа макрофагов подтверждается опытами с использованием туникамицина, ингибитора N-гликозилирования [31]. С другой стороны, недавно было показано, что активация ПФП подавляет эффероцитоз, то есть фагоцитоз толерогенных апоптотических клеток, характерный для M2-макрофагов [55].

Окислительное фосфорилирование. В условиях нормоксии OXPHOS, как правило, является основным источником АТФ в клетке, в том числе для неактивированных макрофагов. Независимо от типа поляризации, энергетические потребности клетки увеличиваются, однако активность OXPHOS в M1- и M2-макрофагах оказывается различной. M1-Макрофаги характеризуются подавлением OXPHOS, тогда как при M2-поляризации, напротив, происходит увеличение активности электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) [56]. Подавление OXPHOS в M1-макрофагах вызвано продукцией NO, способного блокировать ЭТЦ, и препятствует их реполяризации в M2-фенотип [57]. Кроме того, распознавание живых бактерий макрофагами приводит к уменьшению количества активных комплексов I и III ЭТЦ за счет продукции АФК [58]. При M2-поляризации активация STAT6 приводит к повышению экспрессии генов, вовлеченных в окисление ЖК и OXPHOS [59]. Подавление OXPHOS, в свою очередь, препятствует экспрессии ряда маркеров M2, таких как аргиназа 1 (ARG1) и маннозный рецептор.

Работа ЭТЦ неразрывно связана с продукцией АФК. Образование митохондриальных АФК происходит в результате утечки электронов через I, II и III комплексы при нарушении работы ЭТЦ или мембранного потенциала митохондрий и зависит от метаболического состояния этой органеллы [60, 61]. Интересно, что снижение дыхания при M1-поляризации ассоциировано с увеличением продукции митохондриальных АФК, которые стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов [62]. Так, активация макрофагов LPS приводит к продукции АФК, по-видимому, за счет обратного транспорта электронов от сукцинатдегидрогеназного комплекса в ЭТЦ. Кроме того, активация толл-подобных рецепторов (TLR) 1, 2, и 4 приводила к увеличению продукции митохондриальных АФК за счет транслокации TRAF6 в митохондрии [63]. Помимо этого, продукция АФК макрофагами в ответ на встречу с патогеном или активацию провоспалительными цитокинами связана с активацией ферментов NADPH-оксидаз (NOX) и не зависит от цианидов, блокирующих IV комплекс дыхательной цепи. Продукция АФК клетками врожденной иммунной системы, в том числе макрофагами, необходима для борьбы с патогенами, однако длительный воспалительный процесс увеличивает выработку АФК, вызывая окислительный стресс, который приводит к дисфункции эндотелия сосудов и другим нарушениям [64].

Цикл Кребса, или цикл трикарбоновых кислот, – центральный метаболический путь, задействованный в обеспечении клетки энергией АТФ. АТФ важен для многих процессов, протекающих в макрофагах при активации, включая пролиферацию, синтез цитокинов и других провоспалительных медиаторов, миграцию и фагоцитоз. Кроме того, M2-макрофагам АТФ необходим для поддержания высокого уровня гликозилирования лектиновых и маннозного рецепторов. Промежуточные метаболиты цикла Кребса также играют значительную роль в активации и поляризации макрофагов. Их накопление в клетке может происходить за счет «разрывов» цикла Кребса на некоторых участках в связи с ингибированием изоцитратдегидрогеназы (IDH) или сукцинатдегидрогеназы (SDH). Наиболее полно охарактеризовано влияние на поляризацию макрофагов таких промежуточных метаболитов цикла Кребса, как цитрат, итаконат, сукцинат, фумарат и альфа-кетоглутарат [65, 66].

Цитрат появляется в цикле Кребса за счет конденсации оксалоацетата и ацетил-КоА, образующегося из пирувата или за счет катаболизма ЖК. Для M1-макрофагов характерно накопление цитрата в цитозоле в связи с подавлением IDH на уровне транскрипции и сверхэкспрессией митохондриального переносчика цитрата (CIC) [67]. Несмотря

на то что цитрат может подавлять гликолиз, воздействуя на фосфофруктокиназы и, опосредованно, на пируваткиназу, а также стимулировать глюконеогенез [68], по всей видимости, для M1-макрофагов участие цитрата является значимым в регуляции синтеза ЖК. Цитрат выступает субстратом для АТФ-цитратлиазы (ACLY), которая является важным источником ацетил-КоА, поступающего в цикл синтеза ЖК. При блокировке ACLY отмечается снижение продукции простагландина E2 (PGE₂), NO и АФК, играющих существенную роль в воспалении и окислительном стрессе [69].

Итаконат – один из самых представленных метаболитов при поляризации клеток в M1 [31]. Образование итаконата из *цис*-аконитата происходит под действием фермента аконитатдекарбоксилазы 1 (ACOD1), повышение экспрессии которого характерно для M1-макрофагов. С одной стороны, итаконат является конкурентным ингибитором SDH, тем самым обеспечивая прерывание цикла Кребса и подавление OXPHOS в провоспалительных макрофагах [70, 71]. С другой стороны, итаконат способен ковалентно связываться с аминокислотными остатками цистеина в составе различных белков [72], подавляя их биологические функции. Так, итаконат алкилирует цистеины альдозазы (фруктозо-1,6-бисфосфатаз, ALDOA), GAPDH и LDHA – ключевых ферментов гликолиза, что приводит к подавлению активности этих ферментов, уменьшает потребление глюкозы клетками и продукцию лактата [72]. Алкилируя белок KEAP1, итаконат активирует транскрипционный фактор NRF2, тем самым стимулируя экспрессию генов, вовлеченных в защиту от окислительного стресса [73]. Наконец, итаконат подавляет продукцию NO и провоспалительных цитокинов TNF, IL-6, IL-1 β , IL-12 и IL-18 M1-макрофагами [70, 74]. Регуляция продукции цитокинов итаконатом частично связана с подавлением I κ B ζ , регулятора транскрипционной активности NF- κ B. В культуре макрофагов итаконат усиливает продукцию ATF3, что, в свою очередь, приводит к супрессии I κ B ζ на посттранскрипционном уровне [75]. Интересно, что в случае IL-1 β итаконат не только подавляет экспрессию гена *Il1b*, но и препятствует продукции цитокина на посттрансляционном уровне за счет снижения активности каспазы-1 [76], а некоторые производные итаконата непосредственно алкилируют NLRP3, препятствуя сборке инфламмосомы [77]. Суммарно, итаконат, по всей видимости, задействован в петле обратной регуляции развития M1-фенотипа у макрофагов, замедляя и ограничивая активацию M1-ассоциированных генетических программ, что может играть важную роль в контроле иммунного ответа. M2-Макрофаги не способны сами производить итаконат, но могут поглощать его из среды [78].

Недавно было показано, что экзогенный итаконат способен подавлять дифференцировку M2-макрофагов за счет ингибирования сигнального пути IL-4, опосредованного JAK1/STAT6 [79]. Кроме того, есть данные о влиянии производимого макрофагами итаконата на опухолевые клетки [80] и Т-клетки [81]. Таким образом, будучи специфическим метаболитом M1-поляризации, итаконат тем не менее способен оказывать широкий спектр действий на окружающие клетки, внося вклад в формирование микроокружения M1-макрофагов.

Сукцинат образуется в цикле Кребса из сукцинила-КоА под действием сукцинил-КоА-лигазы и превращается в фумарат под действием SDH, которая одновременно является ферментом цикла Кребса и вторым комплексом митохондриальной дыхательной цепи. При M1-поляризации накапливающийся итаконат снижает активность SDH, что приводит к накоплению сукцината в митохондриях [70]. Сукцинат может транспортироваться через дикарбоксилатный транспортер (DIC, SLC25A10) из митохондрии в цитоплазму клетки, где выполняет ряд функций. Во-первых, сукцинат ингибирует пролил-гидролазу (PHD) и тем самым блокирует деградацию HIF-1 α в присутствии кислорода. Это приводит к накоплению HIF-1 α и активации аэробного гликолиза – так называемый эффект Варбурга, а также приводит к продукции провоспалительных цитокинов, например, IL-1 β [32]. Во-вторых, он обуславливает посттрансляционные изменения белков за счет сукцинилирования лизина. Например, сукцинилирование пируваткиназы в M1-макрофагах приводит к HIF-1 α -опосредованному увеличению продукции IL-1 β [82]. Наконец, сукцинат выполняет роль межклеточного медиатора воспаления: он выделяется воспалительными макрофагами и взаимодействует с рецепторами SUCNR1/GPR91, связанными с G-белком, что приводит к увеличению продукции IL-1 β [83, 84]. Интересно, что экспрессия рецепторов к сукцинату увеличивается на поверхности макрофагов в ответ на сигналы воспаления, такие как LPS, TNF и IFN γ [67].

Продуктом SDH является фумарат. Тем не менее, несмотря на подавление активности SDH, в M1-макрофагах содержание фумарата значительно повышено. Это связано с тем, что в провоспалительных макрофагах возрастает экспрессия аргининосукцинат-синтетазы (ASS1), фермента цикла мочевины. ASS1 катализирует синтез аргининосукцината, который далее разлагается на аргинин и фумарат. Именно фумарат, полученный как побочный продукт цикла мочевины, оказывает существенное влияние на повышающийся при воспалении общий уровень фумарата. Более того, по некоторым данным, фумарат и аргининосукцинат являются одними из наиболее высоко-

продуцируемых метаболитов в активированных макрофагах по сравнению с неактивированными клетками [85]. Фумарат подавляет продукцию IL-10, за счет чего увеличивается продукция TNF. Эффект фумарата на продукцию IL-10 может быть связан с подавлением сигнального пути ERK и передачи сигналов PI3K [85].

Альфа-кетоглутарат (α -KG) образуется в цикле Кребса путем конвертации изоцитрата под действием IDH и также играет важную роль в иммунных процессах [86]. В первую очередь, α -KG – ключевой кофактор нескольких семейств гистоновых деметилаз: JMJD (Jumonji-C-domain-containing histone demethylases) и TET (ten-eleven translocation) [87, 88], чем обусловлена его вовлеченность в процессы эпигенетического репрограммирования. Так, за счет действия на JMJD3 α -KG способствует транскрипции IL-4-зависимых генов. С другой стороны, экзосомальный α -KG также участвует в M2-поляризации, активируя TET-опосредованное деметилирование ДНК, что приводит к подавлению путей STAT3/NF- κ B [89]. Наконец, α -KG стимулирует окисление ЖК, характерное для M2-макрофагов. Интересно, что высокое отношение α -KG к сукцинату способствует M2-поляризации, тогда как низкое – напротив, провоспалительному M1-фенотипу. Поскольку α -KG является кофактором, а сукцинат – ингибитором JMJD3, это позволяет им регулировать деметилирование H3K27 [90].

Наряду с α -KG, в эпигенетической регуляции участвует 2-гидроксиглутарат (2-HG), имеющий хиральные L- и D-изоформы. Синтез 2-HG может происходить в результате неспецифичной активности нескольких ферментов, включая малатдегидрогеназу (MDH), LDHA, а также при помощи мутантной изоформы IDH1/2mut, встречающейся в опухолевых клетках [91, 92]. 2-HG, сукцинат и фумарат ингибируют действие α -KG на эпигенетическом уровне [93, 94], поэтому соотношение между этими соединениями, особенно 2-HG/ α -KG, важно для протекания ряда иммунологических процессов. 2-HG накапливается в тканях в условиях гипоксии или низкого pH [95], а также в M1-макрофагах в ответ на активацию LPS [96]. В опытах *in vitro* было показано, что L-2-HG инактивирует HIF-пролил-гидроксилазу, стабилизирует HIF-1 α и, таким образом, способствует продукции IL-1 β и активации гликолиза [96]. D-2-HG, также образующийся в M1-клетках, напротив, способствует подавлению воспалительных процессов во время поздней стадии ответа на LPS *in vitro* и является регулятором местных и системных воспалительных реакций *in vivo* [97].

Метаболизм аминокислот важен не только для гомеостаза и синтеза белков, но и многих других иммунных процессов, включая поляризацию

макрофагов [98]. Недостаток аминокислот в среде приводит к нарушениям в миграции, делении, созревании и выполнении эффекторных функций иммунными клетками. Наиболее глубоко изучено влияние аргинина, глутамина, глицина и серина на функции макрофагов.

Активированным макрофагам аргинин необходим как субстрат для двух конкурирующих ферментов – ARG1 и индуцированной iNOS. Как правило, экспрессия ARG1 повышена в M2-макрофагах: фермент превращает аргинин в мочевины и орнитин, дающий начало синтезу полиаминов, задействованных в репарации тканей. Интересно, что ARG1, способствуя формированию противовоспалительного фенотипа макрофагов, приводит к подавлению пролиферации Т-клеток и продукции цитокинов [94]. Орнитин также критически важен для иммунных функций макрофагов в контексте инфекции *Mycobacterium tuberculosis* [99, 100]. Экспрессия iNOS в макрофагах увеличивается под действием провоспалительных стимулов, таких как LPS, TNF и IFN γ . iNOS превращает аргинин в оксид азота и цитруллин: NO спонтанно реагирует с кислородом и АФК, приводя к появлению соединений азота и кислорода, имеющих антимикробную активность и регуляторные функции. Под действием аргининосукцинатсинтазы 1 цитруллин превращается в аргининосукцинат, который распадается до аргинина и, таким образом, поддерживает продукцию NO. Помимо образования АФК, NO вовлечен в ремоделирование ЭТЦ митохондрий, происходящее во время M1-поляризации. Так, в ответ на активацию макрофагов LPS/IFN γ вместе с индукцией NO снижается активность комплексов I и II, а кратковременное воздействие NO на макрофаги приводит к обратимому ингибированию IV комплекса, в силу того что NO конкурирует с кислородом за каталитический центр фермента [101, 102]. Хотя нарушения в работе I комплекса способствуют увеличению продукции АФК в митохондриях и экспрессии провоспалительных факторов, таких как IL-1 β и TNF [103], последние исследования показали, что данный процесс не связан непосредственно с действием NO [104, 105]. Судя по всему, на более поздних стадиях активации NO имеет регуляторные функции за счет способности ингибировать митохондриальные комплексы и уменьшать их количество [106]. Более того, воздействие NO на ЭТЦ приводит к изменению морфологии митохондрий и является одной из причин, препятствующих реполяризации M1-макрофагов в зависящий от дыхания M2-фенотип [57].

Не менее важную роль в жизни макрофагов играет глутамин, необходимый для синтеза аминокислот и нуклеотидов, производства NADPH и энергии, а также во многих других процессах биосинтеза [107, 108]. В зависимости от того, в какие

метаболические пути вступит глутамин, он стимулирует либо M1-, либо M2-поляризацию макрофагов. С одной стороны, глутамин может поступать в цикл Кребса через α -KG, тем самым стимулируя синтез сукцината в M1-макрофагах [32], что в том числе критически важно для стабилизации HIF-1 α и поддержания гликолиза [109]. При этом повышенный биосинтез сукцината сопровождается увеличением экспрессии гена, кодирующего переносчик глутамина SLC3A2, и поглощением глутамина [110, 111]. Интересно отметить, что часть сукцината в LPS-активированных макрофагах производится за счет шунта гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) – пути, идущего в обход цикла Кребса, в ходе которого глутамин используется для последовательного синтеза глутамата, ГАМК, янтарного полуальдегида и в конечном итоге сукцината. Ингибирование ключевого фермента этого пути, ГАМК-трансаминазы, значительно уменьшает количество производимого из глутамина сукцината и, как следствие, предотвращает стабилизацию HIF-1 α и секрецию IL-1 β в ответ на LPS [32]. В то же время дефицит глутамина в среде или ингибирование глутаминазы с помощью ее селективного блокатора бис-2-(5-фенилацетида-1,3,4-тиадиазол-2-ил) этилсульфида (BPTES) при активации макрофагов LPS предотвращает формирование толерантности к эндотоксину [90], что также было продемонстрировано на мышинной модели токсического шока [112]. Отметим, что толерантность к эндотоксину – важный механизм поддержания гомеостаза, при котором макрофаги становятся невосприимчивы к повторяющимся стимуляциям LPS, что помогает защитить организм от возможной чрезмерной активации иммунной системы [113]. Таким образом, глутамин участвует как в воспалительном ответе M1-макрофагов на LPS, так и в их последующей отрицательной регуляции за счет формирования толерантности.

Метаболизм глутамина также может способствовать M2-поляризации в основном за счет стимуляции накопления α -KG [90]. Кроме того, глутамин, как и глюкоза, необходим для синтеза UDP-GlcNAc [31], используемого M2-макрофагами для гликозилирования маннозного рецептора и RELM α [31]. M2-Поляризованные макрофаги не только поглощают глутамин из окружающей среды, но и синтезируют его из глутамата и аммиака с помощью глутаминсинтетазы (GS). Данный фермент имеет основополагающее значение для приобретения M2-фенотипа: он практически не обнаруживается в M1-макрофагах и высоко экспрессирован в M2-макрофагах, особенно в ответ на IL-10 [114], поэтому как недостаток глутамина в среде, так и ингибирование глутаминазы с помощью BPTES приводит к нарушению альтернативной поляризации макрофагов [31, 90].

Серин и глицин играют существенную роль в регуляции окислительно-восстановительного (редокс) баланса, так как участвуют в синтезе глутатиона. Поддержание редокс-баланса важно в контексте M1-поляризации макрофагов, так как продуцируемые ими АФК вызывают окислительный стресс [63, 115, 116]. В ответ на него запускается транскрипционный фактор NRF2, который уменьшает активность LPS-индуцированного NF- κ B, в том числе за счет регуляции метаболизма глутатиона [117, 118]. Интересно, что для производства глутатиона может быть необходимо превращение серина в глицин [119]. Вместе с этим известно, что в LPS-активированных макрофагах эндогенный синтез серина приводит к продукции S-аденозил-метионина, который задействован в эпигенетической регуляции экспрессии IL-1 β [119].

Синтез и окисление жирных кислот. ЖК необходимы для синтеза клеточных мембран и различных биоактивных веществ, например, эйкозаноидов. Кроме того, ЖК – еще одна важнейшая «энергетическая валюта» организма, окисление которой приводит к синтезу АТФ. Поляризация макрофагов также сильно зависит от метаболизма ЖК. Так, показано, что для M1-макрофагов характерны процессы анаболизма ЖК: при активации TLR, в том числе в присутствии IFN γ , наблюдается накопление триацилглицеридов в виде жировых капель, диацилглицеридов и сложных эфиров холестерина [120, 121], что коррелирует с фенотипом, так называемых «пенных клеток» – макрофагов, ассоциированных с атеросклерозом, гранулемами и другими воспалительными патологиями [122]. Накоплению жиров предшествует повышение уровня липогенеза за счет активности транскрипционного фактора SREBP-1 [123], ACLY, производящей ацетил-КоА из цитрата для последующего участия в составе синтазы жирных кислот (FAS) [124]. В моделях с генетическим нокаутом упомянутых факторов и ферментов, а также некоторых других переносчиков (UCP2 [125], ACC [126]), задействованных в анаболизме ЖК, наблюдалось понижение способности макрофагов к провоспалительному ответу, в основном за счет нарушения работы инфламмосомы. В одной из недавних работ было показано, что жировые капли в M1-макрофагах служат источником выработки PGE $_2$ который, в свою очередь, усиливает фагоцитоз, продукцию IL-1 β и IL-6 в макрофагах. При блокировке DGAT1 (переносчика, участвующего в депонировании ЖК) также понижается воспалительный ответ макрофагов *in vitro* и *in vivo* [120].

Альтернативно активированные макрофаги, как было отмечено выше, сохраняют цикл Кребса интактным, поддерживая более высокие уровни окислительного фосфорилирования, при этом считается, что предпочтительным источником

ацетил-КоА в M2-макрофагах являются именно жирные кислоты. Бета-окисление происходит в митохондриях, и поступление ЖК внутрь органеллы обеспечивают карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (CPT1, на внешней мембране) и 2 (CPT2, на внутренней мембране митохондрии). В недавних экспериментах с фармакологической и генетической блокировкой CPT1 и CPT2 было показано, что ингибирование бета-окисления не приводит к неспособности приобретать M2-фенотип в макрофагах мыши [127] и человека [128], вопреки ранее сформировавшемуся мнению [129]. Интересно, что бета-окисление также важно для инфламмосомы, как и синтез ЖК: активацию NLRP3 можно ингибировать путем ограничения активности NADPH-оксидазы 4 (NOX4), которая, в свою очередь, регулирует CPT1A [130]. Суммарно, можно сказать, что баланс синтеза и окисления ЖК является важнейшим регулятором активации инфламмосомы и, следовательно, воспалительного ответа M1-макрофагов [131]. Роль метаболизма ЖК в формировании M2-фенотипа макрофагов на сегодняшний день подвергается пересмотру, однако его модуляция до сих пор рассматривается как перспективная терапия для перепрограммирования M2-подобных макрофагов, ассоциированных с опухолями [132, 133].

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПЕРЕПРОГРАМИРОВАНИЯ МАКРОФАГОВ ПРИ ПОЛЯРИЗАЦИИ

Перепрограммирование вышеописанных метаболических путей при активации макрофагов во многом зависит от ключевых мастер-регуляторов клеточного метаболизма – факторов mTOR и AMPK [134–136]. mTOR образует два типа комплексов – mTORC1 и mTORC2 [137]. mTORC1 интегрирует информацию, поступающую от внеклеточных (факторы роста, клеточный стресс) и внутриклеточных стимулов (концентрация аминокислот в лизосомах, уровень сахаров и липидов), и передает их дальше, активируя HIF-1 α , PPAR γ , SREBP-1 и MYC, тем самым способствуя делению клеток, активации биосинтеза нуклеиновых кислот, белков, липидов и подавляя катаболические процессы и аутофагию [136, 137]. Баланс сигналов mTORC1/mTORC2 критически важен для дифференцировки и поляризации макрофагов и контролируется каскадами, идущими от рецепторов врожденного иммунитета, цитокинов и факторов роста [138]. mTORC1 имеет важную роль в M1-поляризации, тогда как mTORC2, по-видимому, важен для обоих типов активации макрофагов [137]. Роль mTORC1 во многом связана с его способностью регулировать анаболизм, а значит,

Таблица 2. Связь метаболических изменений и поляризации макрофагов

Метаболический путь и факторы	M1 (LPS + IFN γ)	M2 (IL-4 + IL-13)
Гликолиз	сильно активирован; участвует в поддержании провоспалительных свойств макрофагов	активирован; важен для ответа макрофагов на IL-4
GLUT1	↑	–
PFK	↑	–
PFKFB3	↑	–
PKM2	димер	тетрамер
Пентозофосфатный путь	активирован; необходим для генерации АФК через NADPH-оксидазу, продукцию NO и синтез нуклеотидов и белков	участвует в синтезе UDP-GlcNAC
Окислительная фаза ПФП: PGD	↑	–
Неокислительная фаза ПФП: CARKL	↓	↓
Цикл Кребса и OXPHOS	ослаблен за счет NO и итаконата; обратный транспорт электронов, производство АФК, стабилизация HIF-1 α ; экспрессия IL-1 β	усиление OXPHOS; интактный цикл Кребса
Морфология митохондрий	преобладание фрагментированных митохондрий	преобладание митохондриальных сетей
Цитрат = первый разрыв цикла		
IDH	↓	–
CIC	↑	–
ACLY	↑	–
Итаконат ACOD1	↑	–
Сукцинат = второй разрыв цикла		
SDH	↓	–
Метаболизм аминокислот		
Аргинин		
iNOS	↑	↓
ARG1	↓	↑
Триптофан		
IDO	↓	↑
Глутамин		
GS	↓	↑
PHD	↑	↓
Метаболизм липидов	синтез жирных кислот↑	окисление жирных кислот↑
SREBP	↑	–
LXR	–	↑

Примечание. «↑», зеленый цвет – увеличение по сравнению с M0; «–», серый цвет – не изменяется по сравнению с M0; «↓», красный цвет – снижение по сравнению с M0.

координировать выработку большого количества факторов, опосредующих функции активированных макрофагов. Так, активация SREBP-1 за счет mTORC1 критически важна для продукции цитокинов, синтеза липидов и липидных медиаторов, а также фагоцитоза. Кроме того, SREBP-1 также контролирует продукцию NADPH в ПФП [136], необходимого для синтеза АФК. Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR имеет важное значение для стимуляции гликолиза и пролиферации клеток [136, 139]. Наконец, mTOR также связан с метаболизмом глутамина. Известно, что сигнальный путь mTORC2/IRF4 вовлечен в метаболическое перепрограммирование, происходящее во время альтернативной активации макрофагов [140]. Интересно, что mTORC1 также может способствовать M2-поляризации, в частности, за счет стимуляции синтеза UDP-GlcNAc и N-гликозилирования лектинов [31]. Более того, mTORC1-зависимый синтез липидных медиаторов в зависимости от экспрессии COX2 в M1-макрофагах или COX1 в M2-макрофагах участвует в производстве как провоспалительных, так и противовоспалительных медиаторов [141].

AMPK, так же как mTOR, участвует в интеграции различных сигналов и регулирует метаболизм клетки за счет опосредованной ферментами посттрансляционной модификации белков-мишеней [142]. Данные мастер-регуляторы действуют взаимодополняюще: в то время как mTOR детектирует количество питательных веществ и запускает анаболические процессы, AMPK детектирует нехватку энергии и активирует катаболические процессы, направленные на синтез АТФ [143]. Так, в условиях нехватки энергии, например, во время голодания, AMPK реагирует на внутриклеточный уровень AMP и фосфорилирования белков RAPTOR и TSC2 и подавляет сигнальные пути, связанные с mTORC1 [144]. Как следствие, в макрофагах активация AMPK, как правило, приводит к снижению воспалительного ответа и M1-поляризации [145–149]. Так, отсутствие AMPK приводит к гиперполяризации макрофагов в сторону M1 в ответ на стимуляцию LPS и, кроме того, к увеличению экспрессии ключевых ферментов, вовлеченных в синтез итаконата, метаболизм глюкозы, аргинина, простагландинов и холестерина, что, как следствие, приводит к увеличению продукции PGE₂ и NO, IL-6, IL-12 и снижению продукции IL-10 [150]. Помимо этого, AMPK необходима для приобретения макрофагами M2-фенотипа, например, во время регенерации мышечной ткани [146].

Суммируя все вышеизложенное, метаболические изменения играют огромную роль в поляризации макрофагов и выполнении ими иммунологических функций (табл. 2). Эти процессы являются не только взаимосвязанными, но и взаимообуслов-

ленными. Так, с одной стороны, регуляция иммунометаболических ферментов осуществляется за счет нутриентов и метаболитов, таких как аминокислоты, цитрат, сукцинат, итаконат, жирные кислоты и др. Этот способ контроля, возникший еще на ранних этапах эволюции, успешно работает до сих пор. С другой стороны, регуляция функций клетки в целом, в том числе ее иммунной активности, в соответствии с потребностями организма и условиями окружающей среды, невозможна без более сложных механизмов, эволюционно появившихся чуть позднее. К таким механизмам относится интегрирование внутриклеточных сигналов с последующей посттрансляционной модификацией белков и эпигенетической модификацией генов, осуществляемые, например, mTOR и AMPK [142]. Таким образом, иммунометаболическая адаптация макрофагов к поступающим сигналам лежит в основе поддержания гомеостаза не только отдельных тканей, но и всего организма. Как следствие, нарушения этого процесса могут приводить к развитию различных заболеваний и неадаптивных состояний.

МОДУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА МАКРОФАГОВ КАК СПОСОБ ТЕРАПИИ

Нарушение иммунометаболических функций макрофагов как фактор патологии. За последнее время было существенно расширено представление о роли макрофагов в контексте различных патологических процессов [23, 151] (рис. 2). Так, с одной стороны, M2-макрофаги участвуют в обеспечении метаболического контроля, а M1-макрофаги, напротив, ассоциированы с метаболическими патологиями, такими как диабет, ожирение, метаболический синдром и инсулинорезистентность. С другой стороны, M-макрофаги опосредуют противоопухолевые эффекты, в то время как M2-макрофаги создают иммуносупрессорное окружение и способствуют развитию опухолей. M2-Макрофаги ответственны за поддержание гомеостаза тканей и заживление ран, однако избыточная или продолжительная активация как M1-, так и M2-макрофагов способна приводить к повреждению тканей и нарушению их функций в таких заболеваниях, как артрит, атеросклероз, гломерулонефрит и атопический дерматит. Обеспечивая защиту организма от бактерий, вирусов и макропаразитов, макрофаги в то же время способны вызывать цитокиновый шторм и несбалансированный ответ на безвредные факторы окружающей среды, участвуя в патогенезе аллергии и астмы. Таким образом, поскольку макрофаги играют ключевую роль в целом ряде заболеваний, они становятся важным объектом для поиска новых подходов к терапии.

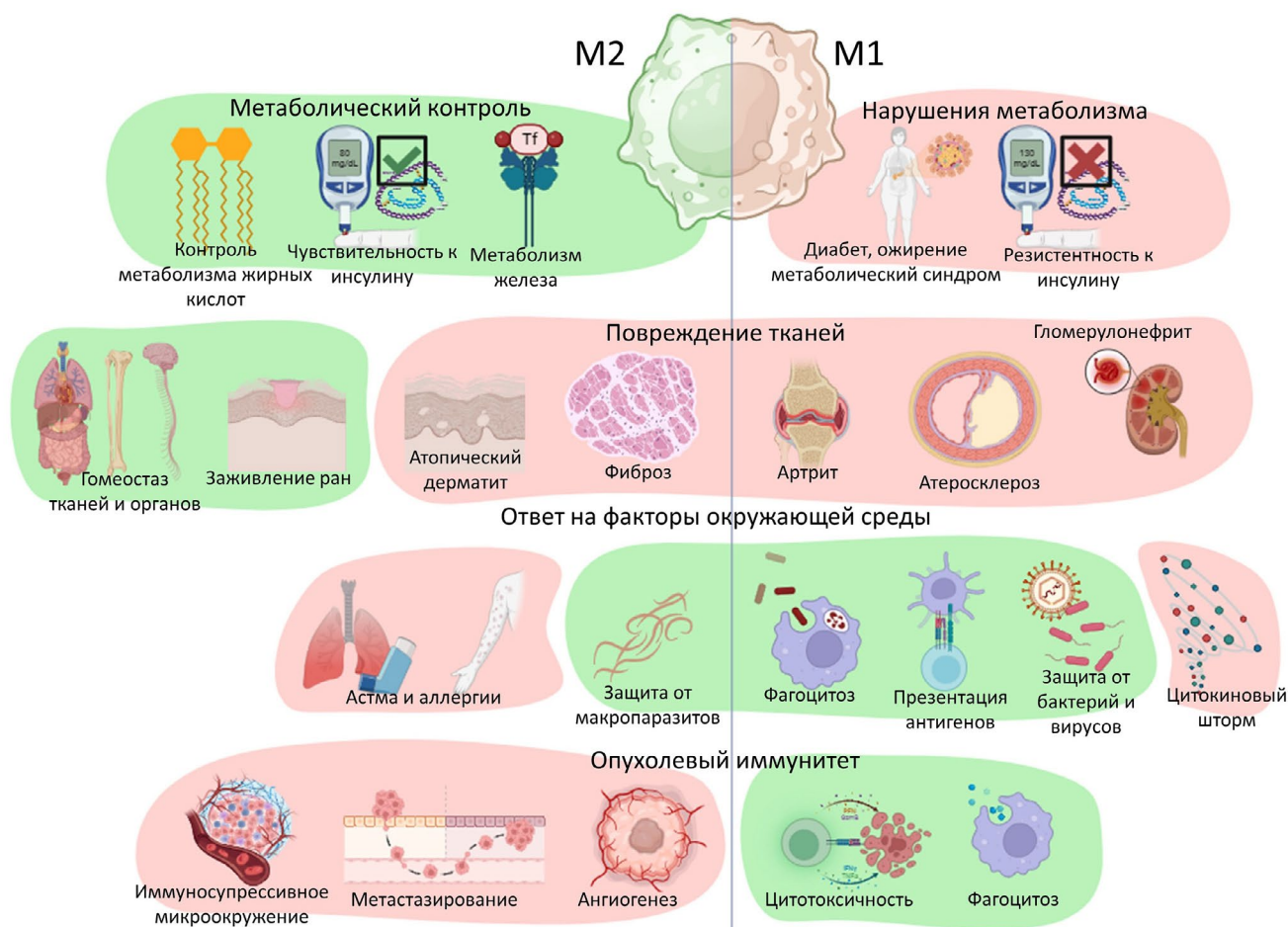


Рис. 2. Поляризация макрофагов в норме и патологии. Розовым обозначены процессы, в которых данный вид поляризации сопряжен с патологией, зеленым – процессы, в которых макрофаги играют физиологическую роль. Рисунок сделан с помощью программы BioRender по ранее опубликованным материалам [23, 151]

В предыдущих разделах было подробно описано, что макрофаги при активации и поляризации подвержены метаболическим адаптациям. Соответственно, воздействие на метаболизм макрофагов влечет за собой изменения в направлении и силе их поляризации. При этом из-за уникальных особенностей метаболизма активированных макрофагов такие воздействия будут специфичными и не должны затрагивать другие клетки в организме, что открывает перспективы для использования такого подхода в терапии воспалительных заболеваний, в которых важную роль играют макрофаги. Далее мы рассмотрим, как модуляция конкретных метаболических путей макрофагов может находить терапевтическое применение.

МОДУЛЯЦИЯ mTOR И AMPK

Как было отмечено выше, mTOR участвует как в M1-, так и в M2-поляризации макрофагов [134]. Так, культивирование макрофагов с рапамицином, ингибитором mTORC1, способствует приобретению

ими противовоспалительного фенотипа, тогда как активация mTORC1, напротив, – воспалительного [138]. В соответствии с этим, в модели CLP-индуцированного сепсиса рапамицин, воздействуя на M1-макрофаги, способствовал защите мышей от гибели [152]. По всей видимости, действие рапамицина обусловлено его способностью вызывать аутофагию, что приводит к уменьшению продукции IL-1 β и IL-18 в M1-макрофагах. Данная регуляция осуществляется на посттранскрипционном уровне и связана с уменьшением митохондриальных АФК и про-IL-1 β [153]. Модуляция mTOR также находит применение в терапии язвенного колита. Так, диосцин, стероидный сапонин, одновременно ингибирует сигналы через mTORC1/HIF-1 α и активирует mTORC2/PPAR- γ , что приводит к подавлению аэробного гликолиза, увеличению окисления ЖК, смещению поляризации макрофагов с M1 в M2 и, как следствие, защищает мышей от DSS-индуцируемого язвенного колита [154]. С другой стороны, в ряде работ применение рапамицина, наоборот, приводило к смещению равновесия в сторону M1. Так, комбинация рапамицина и гидроксихлоро-

хина вызывала удаление противовоспалительных M2-макрофагов в модели глиобластомы и увеличивала эффективность чек-пойнт ингибиторов [155]. Кроме того, блокировка mTOR способствовала M1-поляризации макрофагов и обеспечивала стабилизацию бляшки в артериях при прогрессирующем атеросклерозе [156]. Аналогичный эффект в атеросклерозе способен вызывать и другой блокатор mTOR, триоксид мышьяка [157].

Воздействие на AMPK представляет еще один способ модуляции метаболизма макрофагов. Клинически используемым препаратом, нацеленным на AMPK, является метформин. Метформин ингибирует I комплекс ЭТЦ, контролирующей выработку АТР и АФК. Блокировка выработки АТР приводит к увеличению АМР и соотношения АДР/АТР, что, как следствие, активирует AMPK [158]. Известно, что метформин подавляет LPS-индуцированную продукцию IL-1 β и способствует выработке IL-10 [115]. В ряде исследований было показано, что метформин может регулировать функции макрофагов в атеросклерозе за счет подавления дифференцировки моноцитов, снижения воспаления, окислительного стресса и апоптоза [159]. Важно отметить, что метформин может регулировать функции макрофагов через AMPK-независимые пути, такие как NF- κ B, ABCG5/8, SIRT1, FOXO1/FABP4 и HMGB1. В перспективе комбинирование метформина с другими лекарственными средствами, влияющими на функции макрофагов (такими как ингибиторы SGLT2, статины и ингибиторы IL-1 β), может усилить и расширить его терапевтический потенциал [159].

Блокировка гликолиза. Значительная часть выводов о роли гликолиза в поляризации макрофагов сделана с использованием ингибитора 2-ДГ, который, как уже было сказано выше, имеет ряд других эффектов, помимо подавления гликолиза [54]. Повышенной специфичностью могут обладать новые блокаторы, основанные на модификациях 2-ДГ [160]. На данный момент изучается возможность использования таких лекарств для терапии рака, тогда как их влияние на метаболизм макрофагов еще предстоит выяснить. Недавние исследования показали, что раковые и иммунные клетки могут накапливать димерную форму фермента PKM2, способную регулировать экспрессию HIF-1 α -зависимых генов [50, 161]. Малая молекула TERT-46 ингибирует этот процесс, восстанавливая ферментативную активность PKM2 и принося многообещающие результаты в экспериментальных моделях рака и инфекционных заболеваний [50, 162]. TERT-46 подавляет активацию M1-макрофагов и улучшает в них биогенез митохондрий [163]. Еще один подход заключается в ингибировании непосредственно HIF-1 α . Селективный блокатор HIF-1 α , PX-478, показал эффективность в подавлении роста

опухолевых клеток [164], а также в мышинной модели атеросклероза [165]. Тем не менее детальное действие этого ингибитора на поляризацию макрофагов еще предстоит выяснить.

Использование метаболитов цикла Кребса в терапии. Перепрограммирование цикла Кребса, ассоциированных с ним генов и метаболитов, связано с воспалительными процессами или злокачественной трансформацией [70, 166, 167]. Диметилмалонат и 4-октилитаконат (4-OI) представляют собой небольшие молекулы, нацеленные на SDH и уменьшающие воспаление в нескольких экспериментальных моделях [73, 168]. Как было отмечено выше, итаконат и производные соединения активируют NRF2, что приводит к усилению антиоксидантного ответа, и стимулируют экспрессию ATF3, ограничивающего выработку цитокинов [73, 75]. В частности, 4-OI нацелен на путь NRF2/KEAP1 и может предотвращать цитокиновый шторм при острой инфекции у мышей [73]. Кроме того, недавно было показано, что итаконат ингибирует инфламмасому NLRP3 [77]. Обладая большим иммуномодуляторным потенциалом, итаконат и его производные потенциально могут быть использованы в терапии. В недавнем исследовании была продемонстрирована способность итаконата влиять также на M2-поляризацию макрофагов за счет ингибирования сигнального пути JAK1/STAT6. Снижение тяжести течения стероид-резистентной астмы у мышей, которым вводили 4-OI, свидетельствует о терапевтическом потенциале этого метаболита в Th2-зависимых заболеваниях [79].

Диметилфумарат (ДМФ) является производным фумарата, который, как считается, влияет на путь NRF2 и гликолиз, и в настоящее время используется в качестве иммуномодулирующего препарата для лечения рассеянного склероза и псориаза у пациентов [169–171]. Также ДМФ ингибирует NF- κ B, ERK и другие сигнальные пути. В макрофагах ДМФ активирует NRF2 для защиты клеток от окислительного стресса и способствует возникновению противовоспалительного фенотипа [172]. ДМФ также воздействует на гликолиз за счет снижения активности GAPDH, что позволяет предположить, что ДМФ также может быть использован для модуляции иммунометаболизма во время инфекционных заболеваний [170].

Модуляция метаболизма аминокислот и жирных кислот. Различное потребление аргинина M1- и M2-макрофагами является основой для потенциальной селективной терапии, направленной на этот метаболит. Так, ингибирование iNOS с помощью аминуганидина предотвращало продукцию NO макрофагами и снижало симптомы заболевания в мышинной модели рассеянного склероза [173]. Другие ингибиторы iNOS показали эффективность в моделях ишемической болезни

почек и воспаления легких у мышей [174, 175]. В то же время ингибирование ARG1 с помощью CB-1158 смещало баланс поляризации макрофагов в сторону M1 в мышинной модели опухолеобразования, что приводило к подавлению иммуносупрессорного микроокружения и большей эффективности противоопухолевой терапии [176, 177]. На данный момент в рамках ряда клинических испытаний изучается эффективность ингибирования ARG1 для лечения рака (NCT02903914, NCT03910530, NCT03314935, NCT03837509, NCT03361228). Ингибирование ферментов, участвующих в метаболизме глутамина, с помощью BPTEs или CB-839 показало положительные результаты в моделях рассеянного склероза [178] и ревматоидного артрита [179]. Наконец, дефицит аминокислот также может быть использован в качестве метода воздействия на макрофаги. Например, ограничение серина ослабляет чрезмерную активацию макрофагов при эндотоксемии [180], что может быть полезно в лечении сепсиса. Галофугинон, имитирующий нехватку аминокислот за счет активации GCN2, уменьшает воспаление кишечника [181] и индуцирует аутофагию [182].

Роль метаболизма жирных кислот в формировании патологического фенотипа макрофагов не до конца понятна. В последние годы активно изучается влияние агентов, снижающих экспрессию либо блокирующих активность карнитин-пальмитоилтрансфераз, таких как этаноксир [183], на развитие колит-ассоциированного рака [184, 185], бронхиальной астмы [186] и обструктивной болезни легких [187]. Часть работ подчеркивает связь синтеза и окисления ЖК с работой инфламмосомы NLRP3, которая, в свою очередь, существенно вовлечена в процессы хронического воспаления и канцерогенеза [184].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммарно, данные последних десятилетий однозначно указывают на тесную связь метабо-

лизма и функциональных особенностей иммунных клеток, в том числе макрофагов, при их активации. Становится понятно, что метаболические потребности активированных клеток неразрывно связаны с их функциональными особенностями. В связи с этим клеточный метаболизм про- и противовоспалительных иммунных клеток существенно отличается. В то же время многие аспекты клеточного метаболизма макрофагов остаются недостаточно изученными, а применение лекарств, направленных на репрограммирование метаболизма, осложняется ограниченной специфичностью имеющихся ингибиторов. Известные на сегодняшний день ингибиторы, как правило, воздействуют на центральные процессы, будь то катаболизм глюкозы в случае 2-ДГ или ингибирование ключевого сигнального пути mTOR. Разработка более специфичных лекарств, нацеленных на конкретные метаболические пути, позволит, с одной стороны, более детально изучить их роль в поляризации макрофагов, а с другой стороны – откроет новые перспективы для иммунометаболической терапии заболеваний, в патогенез которых вовлечены макрофаги.

Вклад авторов. Друцкая М.С. – концепция и руководство работой; Юракова Т.Р., Горшкова Е.А., Носенко М.А. – поиск литературных источников и их обсуждение; Юракова Т.Р., Носенко М.А. – написание текста; Друцкая М.С., Горшкова Е.А. – редактирование текста статьи; Юракова Т.Р. – составление рисунков.

Благодарности. Авторы благодарны Анисову Д. за дискуссию и ценные замечания.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30032).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells, *Science*, **123**, 309-314, <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
2. Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927) The metabolism of tumors in the body, *J. Gen. Physiol.*, **8**, 519-530, <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>.
3. Lercher, A., Baazim, H., and Bergthaler, A. (2020) Systemic immunometabolism: challenges and opportunities, *Immunity*, **53**, 496-509, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.08.012>.
4. Febbraio, M. A., Hiscock, N., Sacchetti, M., Fischer, C. P., and Pedersen, B. K. (2004) Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction, *Diabetes*, **53**, 1643-1648, <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.7.1643>.
5. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, **259**, 87-91, <https://doi.org/10.1126/science.7678183>.

6. Wieman, H. L., Wofford, J. A., and Rathmell, J. C. (2007) Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking, *Mol. Biol. Cell.*, **18**, 1437-1446, <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-07-0593>.
7. Pearce, E. L., Walsh, M. C., Cejas, P. J., Harms, G. M., Shen, H., Wang, L. S., Jones, R. G., and Choi, Y. (2009) Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism, *Nature*, **460**, 103-107, <https://doi.org/10.1038/nature08097>.
8. Wang, A., Luan, H. H., and Medzhitov, R. (2019) An evolutionary perspective on immunometabolism, *Science*, **363**, <https://doi.org/10.1126/science.aar3932>.
9. Gordon, S., Crocker, P. R., Morris, L., Lee, S. H., Perry, V. H., and Hume, D. A. (1986) Localization and function of tissue macrophages, *Ciba Found Symp.*, **118**, 54-67, <https://doi.org/10.1002/9780470720998.ch5>.
10. Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2016) Tissue biology perspective on macrophages, *Nat. Immunol.*, **17**, 9-17, <https://doi.org/10.1038/ni.3320>.
11. Wynn, T. A., Chawla, A., and Pollard, J. W. (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease, *Nature*, **496**, 445-455, <https://doi.org/10.1038/nature12034>.
12. Gordon, S., Pluddemann, A., and Martinez Estrada, F. (2014) Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions, *Immunol. Rev.*, **262**, 36-55, <https://doi.org/10.1111/imr.12223>.
13. Moore, K. J., and Tabas, I. (2011) Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis, *Cell*, **145**, 341-355, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.005>.
14. Chawla, A., Nguyen, K. D., and Goh, Y. P. (2011) Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease, *Nat. Rev. Immunol.*, **11**, 738-749, <https://doi.org/10.1038/nri3071>.
15. Olefsky, J. M., and Glass, C. K. (2010) Macrophages, inflammation, and insulin resistance, *Annu. Rev. Physiol.*, **72**, 219-246, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135846>.
16. Wynn, T. A., and Barron, L. (2010) Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis, *Semin. Liver Dis.*, **30**, 245-257, <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>.
17. Noy, R., and Pollard, J. W. (2014) Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy, *Immunity*, **41**, 49-61, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>.
18. Ginhoux, F., and Jung, S. (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis, *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 392-404, <https://doi.org/10.1038/nri3671>.
19. Epelman, S., Lavine, K. J., and Randolph, G. J. (2014) Origin and functions of tissue macrophages, *Immunity*, **41**, 21-35, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>.
20. Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. (2015) Macrophages: development and tissue specialization, *Annu. Rev. Immunol.*, **33**, 643-675, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>.
21. Hussell, T., and Bell, T. J. (2014) Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context, *Nat. Rev. Immunol.*, **14**, 81-93, <https://doi.org/10.1038/nri3600>.
22. Viola, A., Munari, F., Sanchez-Rodriguez, R., Scolaro, T., and Castegna, A. (2019) The metabolic signature of macrophage responses, *Front. Immunol.*, **10**, 1462, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>.
23. Sica, A., and Mantovani, A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas, *J. Clin. Invest.*, **122**, 787-795, <https://doi.org/10.1172/JCI59643>.
24. Ginhoux, F., and Williams, M. (2016) Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis, *Immunity*, **44**, 439-449, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>.
25. Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2015) Ontogeny of tissue-resident macrophages, *Front. Immunol.*, **6**, 486, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00486>.
26. Wculek, S. K., Dunphy, G., Heras-Murillo, I., Mastrangelo, A., and Sancho, D. (2022) Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology, *Cell. Mol. Immunol.*, **19**, 384-408, <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00791-9>.
27. Wang, N., Liang, H., and Zen, K. (2014) Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance, *Front. Immunol.*, **5**, 614, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>.
28. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., and Hill, A. M. (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm, *J. Immunol.*, **164**, 6166-6173, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>.
29. Biswas, S. K., and Mantovani, A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm, *Nat. Immunol.*, **11**, 889-896, <https://doi.org/10.1038/ni.1937>.
30. Geiss, C., Salas, E., Guevara-Coto, J., Regnier-Vigouroux, A., and Mora-Rodriguez, R. A. (2022) Multistability in macrophage activation pathways and metabolic implications, *Cells*, **11**, <https://doi.org/10.3390/cells11030404>.
31. Jha, A. K., Huang, S. C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K. M., Ashall, J., Everts, B., Pearce, E. J., Driggers, E. M., and Artyomov, M. N. (2015) Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization, *Immunity*, **42**, 419-430, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.005>.
32. Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K.,

- Walmsley, S., Beasley, F. C., et al. (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha, *Nature*, **496**, 238-242, <https://doi.org/10.1038/nature11986>.
33. Lin, J., Kong, Q., Hao, W., and Hu, W. (2020) High glucose contributes to the polarization of peritoneal macrophages to the M2 phenotype *in vivo* and *in vitro*, *Mol. Med. Rep.*, **22**, 127-134, <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11130>.
34. Fukuzumi, M., Shinomiya, H., Shimizu, Y., Ohishi, K., and Utsumi, S. (1996) Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1, *Infect. Immun.*, **64**, 108-112, <https://doi.org/10.1128/iai.64.1.108-112.1996>.
35. Rodriguez-Prados, J. C., Traves, P. G., Cuenca, J., Rico, D., Aragones, J., Martin-Sanz, P., Cascante, M., and Bosca, L. (2010) Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation, *J. Immunol.*, **185**, 605-614, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901698>.
36. Wang, F., Zhang, S., Vuckovic, I., Jeon, R., Lerman, A., Folmes, C. D., Dzeja, P. P., and Herrmann, J. (2018) Glycolytic stimulation is not a requirement for M2 macrophage differentiation, *Cell Metab.*, **28**, 463-475 e464, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.012>.
37. Hackett, E. E., Charles-Messance, H., O'Leary, S. M., Gleeson, L. E., Munoz-Wolf, N., Case, S., Wedderburn, A., Johnston, D. G. W., Williams, M. A., Smyth, A., Ouimet, M., Moore, K. J., Lavelle, E. C., Corr, S. C., Gordon, S. V., Keane, J., and Sheedy, F. J. (2020) *Mycobacterium tuberculosis* limits host glycolysis and IL-1beta by restriction of PFK-M via microRNA-21, *Cell Rep.*, **30**, 124-136 e124, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.015>.
38. Chen, R., Wang, J., Dai, X., Wu, S., Huang, Q., Jiang, L., and Kong, X. (2022) Augmented PFKFB3-mediated glycolysis by interferon-gamma promotes inflammatory M1 polarization through the JAK2/STAT1 pathway in local vascular inflammation in Takayasu arteritis, *Arthritis Res. Ther.*, **24**, 266, <https://doi.org/10.1186/s13075-022-02960-1>.
39. Galvan-Pena, S., Carroll, R. G., Newman, C., Hinchy, E. C., Palsson-McDermott, E., Robinson, E. K., Covarrubias, S., Nadin, A., James, A. M., Haneklaus, M., Carpenter, S., Kelly, V. P., Murphy, M. P., Modis, L. K., and O'Neill, L. A. (2019) Malonylation of GAPDH is an inflammatory signal in macrophages, *Nat. Commun.*, **10**, 338, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08187-6>.
40. Xie, M., Yu, Y., Kang, R., Zhu, S., Yang, L., Zeng, L., Sun, X., Yang, M., Billiar, T. R., Wang, H., Cao, L., Jiang, J., and Tang, D. (2016) PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation, *Nat. Commun.*, **7**, 13280, <https://doi.org/10.1038/ncomms13280>.
41. Wang, T., Liu, H., Lian, G., Zhang, S. Y., Wang, X., and Jiang, C. (2017) HIF 1alpha-induced glycolysis metabolism is essential to the activation of inflammatory macrophages, *Mediators Inflamm.*, **2017**, 9029327, <https://doi.org/10.1155/2017/9029327>.
42. Van Uden, P., Kenneth, N. S., and Rocha, S. (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB, *Biochem. J.*, **412**, 477-484, <https://doi.org/10.1042/BJ20080476>.
43. Blouin, C. C., Page, E. L., Soucy, G. M., and Richard, D. E. (2004) Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha, *Blood*, **103**, 1124-1130, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2427>.
44. Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G., and Karin, M. (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha, *Nature*, **453**, 807-811, <https://doi.org/10.1038/nature06905>.
45. Joshi, S., Singh, A. R., Zulcic, M., and Durden, D. L. (2014) A macrophage-dominant PI3K isoform controls hypoxia-induced HIF1alpha and HIF2alpha stability and tumor growth, angiogenesis, and metastasis, *Mol. Cancer Res.*, **12**, 1520-1531, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0682>.
46. Arranz, A., Doxaki, C., Vergadi, E., Martinez de la Torre, Y., Vaporidi, K., Lagoudaki, E. D., Ieronymaki, E., Androulidaki, A., Venihaki, M., Margioris, A. N., Stathopoulos, E. N., Tsiachlis, P. N., and Tsatsanis, C. (2012) Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9517-9522, <https://doi.org/10.1073/pnas.1119038109>.
47. Cheng, S. C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shephardson, K. M., Saeed, S., Kumar, V., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Martens, J. H., Rao, N. A., Aghajani-Refah, A., Manjeri, G. R., Li, Y., Ifrim, D. C., Arts, R. J., van der Veer, B. M., Deen, P. M., Logie, C., O'Neill, L. A., Willems, P., van de Veerdonk, F. L., et al. (2014) mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity, *Science*, **345**, 1250684, <https://doi.org/10.1126/science.1250684>.
48. Kelley, T. W., Graham, M. M., Doseff, A. I., Pomerantz, R. W., Lau, S. M., Ostrowski, M. C., Franke, T. F., and Marsh, C. B. (1999) Macrophage colony-stimulating factor promotes cell survival through Akt/protein kinase B, *J. Biol. Chem.*, **274**, 26393-26398, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26393>.
49. Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K., and Tsatsanis, C. (2017) Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization, *J. Immunol.*, **198**, 1006-1014, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601515>.
50. Palsson-McDermott, E. M., Curtis, A. M., Goel, G., Lauterbach, M. A., Sheedy, F. J., Gleeson, L. E., van den Bosch, M. W., Quinn, S. R., Domingo-Fernandez, R., Johnston, D. G., Jiang, J. K., Israelsen, W. J., Keane, J., Thomas, C., Clish, C., Vander Heiden, M., Xavier, R. J., and O'Neill, L. A. (2015) Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1alpha activity

- and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages, *Cell Metab.*, **21**, 65-80, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.005>.
51. Mills, E. L., and O'Neill, L. A. (2016) Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal, *Eur. J. Immunol.*, **46**, 13-21, <https://doi.org/10.1002/eji.201445427>.
 52. Baardman, J., Verberk, S. G. S., Prange, K. H. M., van Weeghel, M., van der Velden, S., Ryan, D. G., Wust, R. C. I., Neele, A. E., Speijer, D., Denis, S. W., Witte, M. E., Houtkooper, R. H., O'Neill, L. A., Knatko, E. V., Dinkova-Kostova, A. T., Lutgens, E., de Winther, M. P. J., and Van den Bossche, J. (2018) A defective pentose phosphate pathway reduces inflammatory macrophage responses during hypercholesterolemia, *Cell Rep.*, **25**, 2044-2052 e2045, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.092>.
 53. Yi, L., Liu, Q., Orandle, M. S., Sadiq-Ali, S., Koontz, S. M., Choi, U., Torres-Velez, F. J., and Jackson, S. H. (2012) p47(phox) directs murine macrophage cell fate decisions, *Am. J. Pathol.*, **180**, 1049-1058, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.11.019>.
 54. Haschemi, A., Kosma, P., Gille, L., Evans, C. R., Burant, C. F., Starkl, P., Knapp, B., Haas, R., Schmid, J. A., Jandl, C., Amir, S., Lubec, G., Park, J., Esterbauer, H., Bilban, M., Brizuela, L., Pospisilik, J. A., Otterbein, L. E., and Wagner, O. (2012) The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism, *Cell Metab.*, **15**, 813-826, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.023>.
 55. He, D., Mao, Q., Jia, J., Wang, Z., Liu, Y., Liu, T., Luo, B., and Zhang, Z. (2021) Pentose phosphate pathway regulates tolerogenic apoptotic cell clearance and immune tolerance, *Front. Immunol.*, **12**, 797091, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.797091>.
 56. Huang, S. C., Everts, B., Ivanova, Y., O'Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A. M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W. Y., O'Neill, C. M., Yan, C., Du, H., Abumrad, N. A., Urban, J. F., Jr., Artyomov, M. N., Pearce, E. L., and Pearce, E. J. (2014) Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages, *Nat. Immunol.*, **15**, 846-855, <https://doi.org/10.1038/ni.2956>.
 57. Van den Bossche, J., Baardman, J., Otto, N. A., van der Velden, S., Neele, A. E., van den Berg, S. M., Luque-Martin, R., Chen, H. J., Boshuizen, M. C., Ahmed, M., Hoeksema, M. A., de Vos, A. F., and de Winther, M. P. (2016) Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages, *Cell Rep.*, **17**, 684-696, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.008>.
 58. Garaude, J., Acin-Perez, R., Martinez-Cano, S., Enamorado, M., Ugolini, M., Nistal-Villan, E., Hervas-Stubbs, S., Pelegrin, P., Sander, L. E., Enriquez, J. A., and Sancho, D. (2016) Mitochondrial respiratory-chain adaptations in macrophages contribute to antibacterial host defense, *Nat. Immunol.*, **17**, 1037-1045, <https://doi.org/10.1038/ni.3509>.
 59. Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J. I., Zhang, L., Smith, K. L., Morel, C. R., Wagner, R. A., Greaves, D. R., Murray, P. J., and Chawla, A. (2006) Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation, *Cell Metab.*, **4**, 13-24, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.011>.
 60. Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Physiol.*, **552**, 335-344, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>.
 61. Suski, J. M., Lebiedzinska, M., Bonora, M., Pinton, P., Duszynski, J., and Wieckowski, M. R. (2012) Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation, *Methods Mol. Biol.*, **810**, 183-205, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_12.
 62. Bulua, A. C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K. Y., Sack, M. N., Kastner, D. L., and Siegel, R. M. (2011) Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS), *J. Exp. Med.*, **208**, 519-533, <https://doi.org/10.1084/jem.20102049>.
 63. West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M. C., Choi, Y., Shadel, G. S., and Ghosh, S. (2011) TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS, *Nature*, **472**, 476-480, <https://doi.org/10.1038/nature09973>.
 64. Agita, A., and Alsagaff, M. T. (2017) Inflammation, immunity, and hypertension, *Acta Med. Indones.*, **49**, 158-165.
 65. He, W., Miao, F. J., Lin, D. C., Schwandner, R. T., Wang, Z., Gao, J., Chen, J. L., Tian, H., and Ling, L. (2004) Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors, *Nature*, **429**, 188-193, <https://doi.org/10.1038/nature02488>.
 66. Hooftman, A., and O'Neill, L. A. J. (2019) The immunomodulatory potential of the metabolite itaconate, *Trends Immunol.*, **40**, 687-698, <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.007>.
 67. Infantino, V., Iacobazzi, V., Menga, A., Avantiaggiati, M. L., and Palmieri, F. (2014) A key role of the mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) in TNF α - and IFN γ -triggered inflammation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1839**, 1217-1225, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.013>.
 68. Icard, P., Coquerel, A., Wu, Z., Gligorov, J., Fuks, D., Fournel, L., Lincet, H., and Simula, L. (2021) Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells and tumors: An Update, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22126587>.

69. Infantino, V., Pierri, C. L., and Iacobazzi, V. (2019) Metabolic routes in inflammation: the citrate pathway and its potential as therapeutic target, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 7104-7116, <https://doi.org/10.2174/0929867325666180510124558>.
70. Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Bambouskova, M., Nair, S., Vincent, E. E., Loginicheva, E., Cervantes-Barragan, L., Ma, X., Huang, S. C., Griss, T., Weinheimer, C. J., Khader, S., Randolph, G. J., Pearce, E. J., Jones, R. G., Diwan, A., Diamond, M. S., and Artyomov, M. N. (2016) Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation, *Cell Metab.*, **24**, 158-166, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.004>.
71. Nemeth, B., Doczi, J., Csete, D., Kacso, G., Ravasz, D., Adams, D., Kiss, G., Nagy, A. M., Horvath, G., Tretter, L., Mocsai, A., Csepanyi-Komi, R., Iordanov, I., Adam-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2016) Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage, *FASEB J.*, **30**, 286-300, <https://doi.org/10.1096/fj.15-279398>.
72. Qin, W., Qin, K., Zhang, Y., Jia, W., Chen, Y., Cheng, B., Peng, L., Chen, N., Liu, Y., Zhou, W., Wang, Y. L., Chen, X., and Wang, C. (2019) S-glycosylation-based cysteine profiling reveals regulation of glycolysis by itaconate, *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 983-991, <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0323-5>.
73. Mills, E. L., Ryan, D. G., Prag, H. A., Dikovskaya, D., Menon, D., Zaslona, Z., Jedrychowski, M. P., Costa, A. S. H., Higgins, M., Hams, E., Szpyt, J., Runtsch, M. C., King, M. S., McGouran, J. F., Fischer, R., Kessler, B. M., McGettrick, A. F., Hughes, M. M., Carroll, R. G., Booty, L. M., et al. (2018) Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1, *Nature*, **556**, 113-117, <https://doi.org/10.1038/nature25986>.
74. Zhu, X., Guo, Y., Liu, Z., Yang, J., Tang, H., and Wang, Y. (2021) Itaconic acid exerts anti-inflammatory and antibacterial effects via promoting pentose phosphate pathway to produce ROS, *Sci. Rep.*, **11**, 18173, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97352-x>.
75. Bambouskova, M., Gorvel, L., Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Loginicheva, E., Johnson, K., Korenfeld, D., Mathyer, M. E., Kim, H., Huang, L. H., Duncan, D., Bregman, H., Keskin, A., Santeford, A., Apte, R. S., Sehgal, R., Johnson, B., Amarasinghe, G. K., Soares, M. P., Satoh, T., et al. (2018) Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the IkappaBzeta-ATF3 inflammatory axis, *Nature*, **556**, 501-504, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0052-z>.
76. Bambouskova, M., Potuckova, L., Paulenda, T., Kerndl, M., Mogilenko, D. A., Lizotte, K., Swain, A., Hayes, S., Sheldon, R. D., Kim, H., Kapadnis, U., Ellis, A. E., Isaguirre, C., Burdess, S., Laha, A., Amarasinghe, G. K., Chubukov, V., Roddy, T. P., Diamond, M. S., Jones, R. G., et al. (2021) Itaconate confers tolerance to late NLRP3 inflammasome activation, *Cell Rep.*, **34**, 108756, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108756>.
77. Hooftman, A., Angiari, S., Hester, S., Corcoran, S. E., Runtsch, M. C., Ling, C., Ruzek, M. C., Slivka, P. F., McGettrick, A. F., Banahan, K., Hughes, M. M., Irvine, A. D., Fischer, R., and O'Neill, L. A. J. (2020) The immunomodulatory metabolite itaconate modifies NLRP3 and inhibits inflammasome activation, *Cell Metab.*, **32**, 468-478 e467, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.016>.
78. Puchalska, P., Huang, X., Martin, S. E., Han, X., Patti, G. J., and Crawford, P. A. (2018) Isotope tracing untargeted metabolomics reveals macrophage polarization-state-specific metabolic coordination across intracellular compartments, *iScience*, **9**, 298-313, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.10.029>.
79. Runtsch, M. C., Angiari, S., Hooftman, A., Wadhwa, R., Zhang, Y., Zheng, Y., Spina, J. S., Ruzek, M. C., Argiriadi, M. A., McGettrick, A. F., Mendez, R. S., Zotta, A., Peace, C. G., Walsh, A., Chirillo, R., Hams, E., Fallon, P. G., Jayaraman, R., Dua, K., Brown, A. C., et al. (2022) Itaconate and itaconate derivatives target JAK1 to suppress alternative activation of macrophages, *Cell Metab.*, **34**, 487-501 e488, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.02.002>.
80. Weiss, J. M., Davies, L. C., Karwan, M., Ileva, L., Ozaki, M. K., Cheng, R. Y., Ridnour, L. A., Annunziata, C. M., Wink, D. A., and McVicar, D. W. (2018) Itaconic acid mediates crosstalk between macrophage metabolism and peritoneal tumors, *J. Clin. Invest.*, **128**, 3794-3805, <https://doi.org/10.1172/JCI99169>.
81. (2023) Myeloid-derived itaconate suppresses antitumor immunity, *Cancer Discov.*, **13**, 255, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-RW2022-213>.
82. Wang, F., Wang, K., Xu, W., Zhao, S., Ye, D., Wang, Y., Xu, Y., Zhou, L., Chu, Y., Zhang, C., Qin, X., Yang, P., and Yu, H. (2017) SIRT5 desuccinylates and activates pyruvate kinase M2 to block macrophage IL-1beta production and to prevent DSS-induced colitis in mice, *Cell Rep.*, **19**, 2331-2344, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.065>.
83. Kelly, B., and O'Neill, L. A. (2015) Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity, *Cell Res.*, **25**, 771-784, <https://doi.org/10.1038/cr.2015.68>.
84. Littlewood-Evans, A., Sarret, S., Apfel, V., Loesle, P., Dawson, J., Zhang, J., Muller, A., Tigani, B., Kneuer, R., Patel, S., Valeaux, S., Gommermann, N., Rubic-Schneider, T., Junt, T., and Carballido, J. M. (2016) GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis, *J. Exp. Med.*, **213**, 1655-1662, <https://doi.org/10.1084/jem.20160061>.
85. Hooftman, A., Peace, C. G., Ryan, D. G., Day, E. A., Yang, M., McGettrick, A. F., Yin, M., Montano, E. N., Huo, L., Toller-Kawahisa, J. E., Zecchini, V., Ryan, T. A. J., Bolado-Carrancio, A., Casey, A. M., Prag, H. A., Costa, A. S. H.,

- De Los Santos, G., Ishimori, M., Wallace, D. J., Venuturupalli, S., et al. (2023) Macrophage fumarate hydratase restrains mtRNA-mediated interferon production, *Nature*, **615**, 490-498, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05720-6>.
86. Zaslona, Z., and O'Neill, L. A. J. (2020) Cytokine-like roles for metabolites in immunity, *Mol. Cell*, **78**, 814-823, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.002>.
 87. Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins, *Nature*, **439**, 811-816, <https://doi.org/10.1038/nature04433>.
 88. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., and Rao, A. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science*, **324**, 930-935, <https://doi.org/10.1126/science.1170116>.
 89. Liu, Z., Gan, L., Zhang, T., Ren, Q., and Sun, C. (2018) Melatonin alleviates adipose inflammation through elevating alpha-ketoglutarate and diverting adipose-derived exosomes to macrophages in mice, *J. Pineal Res.*, **64**, <https://doi.org/10.1111/jpi.12455>.
 90. Liu, P. S., Wang, H., Li, X., Chao, T., Teav, T., Christen, S., Di Conza, G., Cheng, W. C., Chou, C. H., Vavakova, M., Muret, C., Debackere, K., Mazzone, M., Huang, H. D., Fendt, S. M., Ivanisevic, J., and Ho, P. C. (2017) alpha-ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming, *Nat. Immunol.*, **18**, 985-994, <https://doi.org/10.1038/ni.3796>.
 91. Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liao, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., Vander Heiden, M. G., and Su, S. M. (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature*, **462**, 739-744, <https://doi.org/10.1038/nature08617>.
 92. Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liao, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., Vander Heiden, M. G., and Su, S. M. (2010) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature*, **465**, 966, <https://doi.org/10.1038/nature09132>.
 93. Carey, B. W., Finley, L. W., Cross, J. R., Allis, C. D., and Thompson, C. B. (2015) Intracellular alpha-ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells, *Nature*, **518**, 413-416, <https://doi.org/10.1038/nature13981>.
 94. Sciacovelli, M., Goncalves, E., Johnson, T. I., Zecchini, V. R., da Costa, A. S., Gaude, E., Drubbel, A. V., Theobald, S. J., Abbo, S. R., Tran, M. G., Rajeeve, V., Cardaci, S., Foster, S., Yun, H., Cutillas, P., Warren, A., Gnanaprasadam, V., Gottlieb, E., Franze, K., Huntly, B., et al. (2016) Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition, *Nature*, **537**, 544-547, <https://doi.org/10.1038/nature19353>.
 95. Du, X., and Hu, H. (2021) The roles of 2-hydroxyglutarate, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 651317, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.651317>.
 96. Williams, N. C., Ryan, D. G., Costa, A. S. H., Mills, E. L., Jedrychowski, M. P., Cloonan, S. M., Frezza, C., and O'Neill, L. A. (2022) Signaling metabolite L-2-hydroxyglutarate activates the transcription factor HIF-1alpha in lipopolysaccharide-activated macrophages, *J. Biol. Chem.*, **298**, 101501, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101501>.
 97. De Goede, K. E., Harber, K. J., Gorki, F. S., Verberk, S. G. S., Groh, L. A., Keuning, E. D., Struys, E. A., van Weeghel, M., Haschemi, A., de Winther, M. P. J., van Dierendonck, X., and Van den Bossche, J. (2022) d-2-Hydroxyglutarate is an anti-inflammatory immunometabolite that accumulates in macrophages after TLR4 activation, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.*, **1868**, 166427, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166427>.
 98. Kieler, M., Hofmann, M., and Schabbauer, G. (2021) More than just protein building blocks: how amino acids and related metabolic pathways fuel macrophage polarization, *FEBS J.*, **288**, 3694-3714, <https://doi.org/10.1111/febs.15715>.
 99. Sivangala Thandi, R., Radhakrishnan, R. K., Tripathi, D., Paidipally, P., Azad, A. K., Schlesinger, L. S., Samten, B., Mulik, S., and Vankayalapati, R. (2020) Ornithine-A urea cycle metabolite enhances autophagy and controls *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Nat. Commun.*, **11**, 3535, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17310-5>.
 100. Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., and Deretic, V. (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages, *Cell*, **119**, 753-766, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.038>.
 101. Brown, G. C., and Cooper, C. E. (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase, *FEBS Lett.*, **356**, 295-298, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01290-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01290-3).
 102. Cleeter, M. W., Cooper, J. M., Darley-Usmar, V. M., Moncada, S., and Schapira, A. H. (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases, *FEBS Lett.*, **345**, 50-54, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00424-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00424-2).
 103. Jin, Z., Wei, W., Yang, M., Du, Y., and Wan, Y. (2014) Mitochondrial complex I activity suppresses inflammation and enhances bone resorption by shifting macrophage-osteoclast polarization, *Cell Metab.*, **20**, 483-498, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.011>.

104. McNeill, E., Crabtree, M. J., Sahgal, N., Patel, J., Chuaiphichai, S., Iqbal, A. J., Hale, A. B., Greaves, D. R., and Channon, K. M. (2015) Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation, *Free Radic. Biol. Med.*, **79**, 206-216, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.575>.
105. Seim, G. L., Britt, E. C., John, S. V., Yeo, F. J., Johnson, A. R., Eisenstein, R. S., Pagliarini, D. J., and Fan, J. (2019) Two-stage metabolic remodelling in macrophages in response to lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulation, *Nat. Metab.*, **1**, 731-742, <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0083-2>.
106. Palmieri, E. M., Gonzalez-Cotto, M., Baseler, W. A., Davies, L. C., Ghesquiere, B., Maio, N., Rice, C. M., Rouault, T. A., Cassel, T., Higashi, R. M., Lane, A. N., Fan, T. W., Wink, D. A., and McVicar, D. W. (2020) Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase, *Nat. Commun.*, **11**, 698, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14433-7>.
107. Byles, V., Covarrubias, A. J., Ben-Sahra, I., Lamming, D. W., Sabatini, D. M., Manning, B. D., and Horng, T. (2013) The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization, *Nat. Commun.*, **4**, 2834, <https://doi.org/10.1038/ncomms3834>.
108. Newsholme, P., Gordon, S., and Newsholme, E. A. (1987) Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages, *Biochem. J.*, **242**, 631-636, <https://doi.org/10.1042/bj2420631>.
109. Meiser, J., Kramer, L., Sapcaru, S. C., Battello, N., Ghelfi, J., D'Herouel, A. F., Skupin, A., and Hiller, K. (2016) Pro-inflammatory macrophages sustain pyruvate oxidation through pyruvate dehydrogenase for the synthesis of itaconate and to enable cytokine expression, *J. Biol. Chem.*, **291**, 3932-3946, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.676817>.
110. Funk, J. L., Feingold, K. R., Moser, A. H., and Grunfeld, C. (1993) Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation, *Atherosclerosis*, **98**, 67-82, [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(93\)90224-i](https://doi.org/10.1016/0021-9150(93)90224-i).
111. Hu, L., Yu, Y., Huang, H., Fan, H., Hu, L., Yin, C., Li, K., Fulton, D. J., and Chen, F. (2016) Epigenetic regulation of interleukin 6 by histone acetylation in macrophages and its role in paraquat-induced pulmonary fibrosis, *Front. Immunol.*, **7**, 696, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00696>.
112. Zhang, Q., Zhao, K., Shen, Q., Han, Y., Gu, Y., Li, X., Zhao, D., Liu, Y., Wang, C., Zhang, X., Su, X., Liu, J., Ge, W., Levine, R. L., Li, N., and Cao, X. (2015) Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6, *Nature*, **525**, 389-393, <https://doi.org/10.1038/nature15252>.
113. Biswas, S. K., and Lopez-Collazo, E. (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance, *Trends Immunol.*, **30**, 475-487, <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.009>.
114. Palmieri, E. M., Menga, A., Martin-Perez, R., Quinto, A., Riera-Domingo, C., De Tullio, G., Hooper, D. C., Lamers, W. H., Ghesquiere, B., McVicar, D. W., Guarini, A., Mazzone, M., and Castegna, A. (2017) Pharmacologic or genetic targeting of glutamine synthetase skews macrophages toward an M1-like phenotype and inhibits tumor metastasis, *Cell Rep.*, **20**, 1654-1666, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.054>.
115. Kelly, B., Tannahill, G. M., Murphy, M. P., and O'Neill, L. A. (2015) Metformin inhibits the production of reactive oxygen species from NADH:Ubiquinone oxidoreductase to limit induction of interleukin-1 β (IL-1 β) and boosts interleukin-10 (IL-10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages, *J. Biol. Chem.*, **290**, 20348-20359, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662114>.
116. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation, *Nature*, **469**, 221-225, <https://doi.org/10.1038/nature09663>.
117. Thimmulappa, R. K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S. P., Yamamoto, M., Kensler, T. W., and Biswal, S. (2006) Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis, *J. Clin. Invest.*, **116**, 984-995, <https://doi.org/10.1172/JCI25790>.
118. Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., and Yamamoto, M. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription, *Nat. Commun.*, **7**, 11624, <https://doi.org/10.1038/ncomms11624>.
119. Yu, W., Wang, Z., Zhang, K., Chi, Z., Xu, T., Jiang, D., Chen, S., Li, W., Yang, X., Zhang, X., Wu, Y., and Wang, D. (2019) One-carbon metabolism supports S-adenosylmethionine and histone methylation to drive inflammatory macrophages, *Mol. Cell*, **75**, 1147-1160 e1145, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.039>.
120. Castoldi, A., Monteiro, L. B., van Teijlingen Bakker, N., Sanin, D. E., Rana, N., Corrado, M., Cameron, A. M., Hassler, F., Matsushita, M., Caputa, G., Klein Geltink, R. I., Buscher, J., Edwards-Hicks, J., Pearce, E. L., and Pearce, E. J. (2020) Triacylglycerol synthesis enhances macrophage inflammatory function, *Nat. Commun.*, **11**, 4107, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17881-3>.
121. Morgan, P. K., Huynh, K., Pernes, G., Miotto, P. M., Mellett, N. A., Giles, C., Meikle, P. J., Murphy, A. J., and Lancaster, G. I. (2021) Macrophage polarization state affects lipid composition and the channeling of exogenous fatty acids into endogenous lipid pools, *J. Biol. Chem.*, **297**, 101341, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101341>.

122. Guerrini, V., and Gennaro, M. L. (2019) Foam cells: one size doesn't fit all, *Trends Immunol.*, **40**, 1163-1179, <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.10.002>.
123. Im, S. S., Yousef, L., Blaschitz, C., Liu, J. Z., Edwards, R. A., Young, S. G., Raffatellu, M., and Osborne, T. F. (2011) Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a, *Cell Metab.*, **13**, 540-549, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.001>.
124. Batista-Gonzalez, A., Vidal, R., Criollo, A., and Carreno, L. J. (2019) New insights on the role of lipid metabolism in the metabolic reprogramming of macrophages, *Front. Immunol.*, **10**, 2993, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02993>.
125. Van Dierendonck, X., Sancerni, T., Alves-Guerra, M. C., and Stienstra, R. (2020) The role of uncoupling protein 2 in macrophages and its impact on obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance, *J. Biol. Chem.*, **295**, 17535-17548, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014868>.
126. Yeudall, S., Upchurch, C. M., Seegren, P. V., Pavelec, C. M., Greulich, J., Lemke, M. C., Harris, T. E., Desai, B. N., Hoehn, K. L., and Leitinger, N. (2022) Macrophage acetyl-CoA carboxylase regulates acute inflammation through control of glucose and lipid metabolism, *Sci. Adv.*, **8**, eabq1984, <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq1984>.
127. Nomura, M., Liu, J., Rovira, II, Gonzalez-Hurtado, E., Lee, J., Wolfgang, M. J., and Finkel, T. (2016) Fatty acid oxidation in macrophage polarization, *Nat. Immunol.*, **17**, 216-217, <https://doi.org/10.1038/ni.3366>.
128. Divakaruni, A. S., Hsieh, W. Y., Minarrieta, L., Duong, T. N., Kim, K. K. O., Desousa, B. R., Andreyev, A. Y., Bowman, C. E., Caradonna, K., Dranka, B. P., Ferrick, D. A., Liesa, M., Stiles, L., Rogers, G. W., Braas, D., Ciaraldi, T. P., Wolfgang, M. J., Sparwasser, T., Berod, L., Bensinger, S. J., et al. (2018) Etomoxir inhibits macrophage polarization by disrupting CoA homeostasis, *Cell Metab.*, **28**, 490-503 e497, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.001>.
129. Van den Bossche, J., O'Neill, L. A., and Menon, D. (2017) Macrophage immunometabolism: where are we (going)? *Trends Immunol.*, **38**, 395-406, <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.03.001>.
130. Moon, J. S., Nakahira, K., Chung, K. P., DeNicola, G. M., Koo, M. J., Pabon, M. A., Rooney, K. T., Yoon, J. H., Ryter, S. W., Stout-Delgado, H., and Choi, A. M. (2016) NOX4-dependent fatty acid oxidation promotes NLRP3 inflammasome activation in macrophages, *Nat. Med.*, **22**, 1002-1012, <https://doi.org/10.1038/nm.4153>.
131. Olona, A., Leishman, S., and Anand, P. K. (2022) The NLRP3 inflammasome: regulation by metabolic signals, *Trends Immunol.*, **43**, 978-989, <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.10.003>.
132. Kumar, S., Mittal, S., Gupta, P., Singh, M., Chaluvally-Raghavan, P., and Pradeep, S. (2022) Metabolic reprogramming in tumor-associated macrophages in the ovarian tumor microenvironment, *Cancers (Basel)*, **14**, <https://doi.org/10.3390/cancers14215224>.
133. Wu, L., Zhang, X., Zheng, L., Zhao, H., Yan, G., Zhang, Q., Zhou, Y., Lei, J., Zhang, J., Wang, J., Xin, R., Jiang, L., Peng, J., Chen, Q., Lam, S. M., Shui, G., Miao, H., and Li, Y. (2020) RIPK3 orchestrates fatty acid metabolism in tumor-associated macrophages and hepatocarcinogenesis, *Cancer Immunol. Res.*, **8**, 710-721, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0261>.
134. Covarrubias, A. J., Aksoylar, H. I., and Horng, T. (2015) Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling, *Semin. Immunol.*, **27**, 286-296, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.08.001>.
135. Kang, S., and Kumanogoh, A. (2020) The spectrum of macrophage activation by immunometabolism, *Int. Immunol.*, **32**, 467-473, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa017>.
136. Dibble, C. C., and Manning, B. D. (2013) Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output, *Nat. Cell Biol.*, **15**, 555-564, <https://doi.org/10.1038/ncb2763>.
137. Weichhart, T., Hengstschlager, M., and Linke, M. (2015) Regulation of innate immune cell function by mTOR, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 599-614, <https://doi.org/10.1038/nri3901>.
138. Weichhart, T., Costantino, G., Poglitsch, M., Rosner, M., Zeyda, M., Stuhlmeier, K. M., Kolbe, T., Stulnig, T. M., Horl, W. H., Hengstschlager, M., Muller, M., and Saemann, M. D. (2008) The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response, *Immunity*, **29**, 565-577, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.012>.
139. Robey, R. B., and Hay, N. (2009) Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis, *Semin. Cancer Biol.*, **19**, 25-31, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.11.010>.
140. Huang, S. C., Smith, A. M., Everts, B., Colonna, M., Pearce, E. L., Schilling, J. D., and Pearce, E. J. (2016) Metabolic reprogramming mediated by the mTORC2-IRF4 signaling axis is essential for macrophage alternative activation, *Immunity*, **45**, 817-830, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.016>.
141. Biswas, S. K., and Mantovani, A. (2012) Orchestration of metabolism by macrophages, *Cell Metab.*, **15**, 432-437, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.11.013>.
142. Beltrao, P., Bork, P., Krogan, N. J., and van Noort, V. (2013) Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications, *Mol. Syst. Biol.*, **9**, 714, <https://doi.org/10.1002/msb.201304521>.
143. Stein, S. C., Woods, A., Jones, N. A., Davison, M. D., and Carling, D. (2000) The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation, *Biochem. J.*, **345 Pt 3**, 437-443.
144. O'Neill, L. A., and Hardie, D. G. (2013) Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation, *Nature*, **493**, 346-355, <https://doi.org/10.1038/nature11862>.

145. Nath, N., Khan, M., Rattan, R., Mangalam, A., Makkar, R. S., de Meester, C., Bertrand, L., Singh, I., Chen, Y., Viollet, B., and Giri, S. (2009) Loss of AMPK exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis disease severity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **386**, 16-20, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.106>.
146. Mounier, R., Theret, M., Arnold, L., Cuvellier, S., Bultot, L., Goransson, O., Sanz, N., Ferry, A., Sakamoto, K., Foretz, M., Viollet, B., and Chazaud, B. (2013) AMPK α 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration, *Cell Metab.*, **18**, 251-264, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.017>.
147. Sag, D., Carling, D., Stout, R. D., and Suttles, J. (2008) Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype, *J. Immunol.*, **181**, 8633-8641, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8633>.
148. Vasamsetti, S. B., Karnewar, S., Kanugula, A. K., Thatipalli, A. R., Kumar, J. M., and Kotamraju, S. (2015) Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis, *Diabetes*, **64**, 2028-2041, <https://doi.org/10.2337/db14-1225>.
149. Seneviratne, A., Cave, L., Hyde, G., Moestrup, S. K., Carling, D., Mason, J. C., Haskard, D. O., and Boyle, J. J. (2021) Metformin directly suppresses atherosclerosis in normoglycaemic mice via haematopoietic adenosine monophosphate-activated protein kinase, *Cardiovasc. Res.*, **117**, 1295-1308, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa171>.
150. Phair, I. R., Nisr, R. B., Howden, A. J. M., Sovakova, M., Alqurashi, N., Foretz, M., Lamont, D., Viollet, B., and Rena, G. (2023) AMPK integrates metabolite and kinase-based immunometabolic control in macrophages, *Mol. Metab.*, **68**, 101661, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101661>.
151. Kadomoto, S., Izumi, K., and Mizokami, A. (2021) Macrophage polarity and disease control, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, <https://doi.org/10.3390/ijms23010144>.
152. Wang, Z., Li, Y., Yang, X., Zhang, L., Shen, H., Xu, W., and Yuan, C. (2019) Protective effects of rapamycin induced autophagy on CLP septic mice, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **64**, 47-52, <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.01.009>.
153. Ko, J. H., Yoon, S. O., Lee, H. J., and Oh, J. Y. (2017) Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NF κ B pathways in autophagy- and p62-dependent manners, *Oncotarget*, **8**, 40817-40831, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17256>.
154. Wu, M. M., Wang, Q. M., Huang, B. Y., Mai, C. T., Wang, C. L., Wang, T. T., and Zhang, X. J. (2021) Dioscin ameliorates murine ulcerative colitis by regulating macrophage polarization, *Pharmacol. Res.*, **172**, 105796, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105796>.
155. Hsu, S. P. C., Chen, Y. C., Chiang, H. C., Huang, Y. C., Huang, C. C., Wang, H. E., Wang, Y. S., and Chi, K. H. (2020) Rapamycin and hydroxychloroquine combination alters macrophage polarization and sensitizes glioblastoma to immune checkpoint inhibitors, *J. Neurooncol.*, **146**, 417-426, <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03360-3>.
156. Sun, R. Z., Fan, Y., Liang, X., Gong, T. T., Wang, Q., Liu, H., Shan, Z. Y., and Lei, L. (2018) Rapamycin and FTY720 alleviate atherosclerosis by cross talk of macrophage polarization and autophagy, *Biomed. Res. Int.*, **2018**, 1010248, <https://doi.org/10.1155/2018/1010248>.
157. Fang, S., Wan, X., Zou, X., Sun, S., Hao, X., Liang, C., Zhang, Z., Zhang, F., Sun, B., Li, H., and Yu, B. (2021) Arsenic trioxide induces macrophage autophagy and atheroprotection by regulating ROS-dependent TFEB nuclear translocation and AKT/mTOR pathway, *Cell Death Dis.*, **12**, 88, <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03357-1>.
158. Ursini, F., Russo, E., Pellino, G., D'Angelo, S., Chiaravallotti, A., De Sarro, G., Manfredini, R., and De Giorgio, R. (2018) Metformin and autoimmunity: a "new deal" of an old drug, *Front. Immunol.*, **9**, 1236, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01236>.
159. Feng, X., Chen, W., Ni, X., Little, P. J., Xu, S., Tang, L., and Weng, J. (2021) Metformin, macrophage dysfunction and atherosclerosis, *Front. Immunol.*, **12**, 682853, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.682853>.
160. Pajak, B., Siwiak, E., Soltyska, M., Priebe, A., Zielinski, R., Fokt, I., Ziemniak, M., Jaskiewicz, A., Borowski, R., Domoradzki, T., and Priebe, W. (2019) 2-Deoxy-d-glucose and its analogs: from diagnostic to therapeutic agents, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, <https://doi.org/10.3390/ijms21010234>.
161. Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R. N., Pandey, A., and Semenza, G. L. (2011) Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1, *Cell*, **145**, 732-744, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.054>.
162. Anastasiou, D., Yu, Y., Israelsen, W. J., Jiang, J. K., Boxer, M. B., Hong, B. S., Tempel, W., Dimov, S., Shen, M., Jha, A., Yang, H., Mattaini, K. R., Metallo, C. M., Fiske, B. P., Courtney, K. D., Malstrom, S., Khan, T. M., Kung, C., Skoumbourdis, A. P., Veith, H., et al. (2012) Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis, *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 839-847, <https://doi.org/10.1038/nchembio.1060>.
163. Yi, Z., Wu, Y., Zhang, W., Wang, T., Gong, J., Cheng, Y., and Miao, C. (2020) Activator-mediated pyruvate kinase M2 activation contributes to endotoxin tolerance by promoting mitochondrial biogenesis, *Front. Immunol.*, **11**, 595316, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.595316>.
164. Welsh, S., Williams, R., Kirkpatrick, L., Paine-Murrieta, G., and Powis, G. (2004) Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 α , *Mol. Cancer Ther.*, **3**, 233-244.

165. Villa-Roel, N., Ryu, K., Gu, L., Fernandez Esmerats, J., Kang, D. W., Kumar, S., and Jo, H. (2022) Hypoxia inducible factor 1alpha inhibitor PX-478 reduces atherosclerosis in mice, *Atherosclerosis*, **344**, 20-30, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2022.01.002>.
166. Mills, E. L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A. S. H., Varma, M., Bryant, C. E., Tourlomousis, P., Dabritz, J. H. M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S. C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H. T., Szibor, M., Xavier, R. J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M. P., and O'Neill, L. A. (2016) Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages, *Cell*, **167**, 457-470 e413, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.064>.
167. Yen, K. E., Bittinger, M. A., Su, S. M., and Fantin, V. R. (2010) Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities, *Oncogene*, **29**, 6409-6417, <https://doi.org/10.1038/onc.2010.444>.
168. Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijevic, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., Logan, A., Nadtochiy, S. M., Ord, E. N. J., Smith, A. C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C. H., Dare, A. J., James, A. M., Rogatti, S., Hartley, R. C., Eaton, S., Costa, A. S. H., Brookes, P. S., et al. (2014) Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS, *Nature*, **515**, 431-435, <https://doi.org/10.1038/nature13909>.
169. Gross, C. C., Schulte-Mecklenbeck, A., Klinsing, S., Posevitz-Fejfar, A., Wiendl, H., and Klotz, L. (2016) Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **3**, e183, <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000183>.
170. Kornberg, M. D., Bhargava, P., Kim, P. M., Putluri, V., Snowman, A. M., Putluri, N., Calabresi, P. A., and Snyder, S. H. (2018) Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity, *Science*, **360**, 449-453, <https://doi.org/10.1126/science.aan4665>.
171. Mrowietz, U., Szepietowski, J. C., Loewe, R., van de Kerkhof, P., Lamarca, R., Ocker, W. G., Tebbs, V. M., and Pau-Charles, I. (2017) Efficacy and safety of LAS41008 (dimethyl fumarate) in adults with moderate-to-severe chronic plaque psoriasis: a randomized, double-blind, Fumaderm(R) - and placebo-controlled trial (BRIDGE), *Br. J. Dermatol.*, **176**, 615-623, <https://doi.org/10.1111/bjd.14947>.
172. Han, R., Xiao, J., Zhai, H., and Hao, J. (2016) Dimethyl fumarate attenuates experimental autoimmune neuritis through the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2/hemoxygenase-1 pathway by altering the balance of M1/M2 macrophages, *J. Neuroinflammation*, **13**, 97, <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0559-x>.
173. Cross, A. H., Misko, T. P., Lin, R. F., Hickey, W. F., Trotter, J. L., and Tilton, R. G. (1994) Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice, *J. Clin. Invest.*, **93**, 2684-2690, <https://doi.org/10.1172/JCI117282>.
174. Chatterjee, P. K., Patel, N. S., Sivarajah, A., Kvale, E. O., Dugo, L., Cuzzocrea, S., Brown, P. A., Stewart, K. N., Mota-Filipe, H., Britti, D., Yaqoob, M. M., and Thiernemann, C. (2003) GW274150, a potent and highly selective inhibitor of iNOS, reduces experimental renal ischemia/reperfusion injury, *Kidney Int.*, **63**, 853-865, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00802.x>.
175. Dugo, L., Marzocco, S., Mazzon, E., Di Paola, R., Genovese, T., Caputi, A. P., and Cuzzocrea, S. (2004) Effects of GW274150, a novel and selective inhibitor of iNOS activity, in acute lung inflammation, *Br. J. Pharmacol.*, **141**, 979-987, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705683>.
176. Miret, J. J., Kirschmeier, P., Koyama, S., Zhu, M., Li, Y. Y., Naito, Y., Wu, M., Malladi, V. S., Huang, W., Walker, W., Palakurthi, S., Dranoff, G., Hammerman, P. S., Pecot, C. V., Wong, K. K., and Akbay, E. A. (2019) Suppression of myeloid cell arginase activity leads to therapeutic response in a NSCLC mouse model by activating anti-tumor Immunity, *J. Immunother. Cancer*, **7**, 32, <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0504-5>.
177. Steggerda, S. M., Bennett, M. K., Chen, J., Emberley, E., Huang, T., Janes, J. R., Li, W., MacKinnon, A. L., Makkouk, A., Marguier, G., Murray, P. J., Neou, S., Pan, A., Parlati, F., Rodriguez, M. L. M., Van de Velde, L. A., Wang, T., Works, M., Zhang, J., Zhang, W., et al. (2017) Inhibition of arginase by CB-1158 blocks myeloid cell-mediated immune suppression in the tumor microenvironment, *J. Immunother. Cancer*, **5**, 101, <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0308-4>.
178. Kono, M., Yoshida, N., Maeda, K., and Tsokos, G. C. (2018) Transcriptional factor ICER promotes glutaminolysis and the generation of Th17 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 2478-2483, <https://doi.org/10.1073/pnas.1714717115>.
179. Takahashi, S., Saegusa, J., Sendo, S., Okano, T., Akashi, K., Irino, Y., and Morinobu, A. (2017) Glutaminase 1 plays a key role in the cell growth of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.*, **19**, 76, <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1283-3>.
180. Rodriguez, A. E., Ducker, G. S., Billingham, L. K., Martinez, C. A., Mainolfi, N., Suri, V., Friedman, A., Manfredi, M. G., Weinberg, S. E., Rabinowitz, J. D., and Chandel, N. S. (2019) Serine metabolism supports macrophage IL-1beta production, *Cell Metab.*, **29**, 1003-1011 e1004, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.014>.
181. Ravindran, R., Loebbermann, J., Nakaya, H. I., Khan, N., Ma, H., Gama, L., Machiah, D. K., Lawson, B., Hakimpour, P., Wang, Y. C., Li, S., Sharma, P., Kaufman, R. J., Martinez, J., and Pulendran, B. (2016) The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation, *Nature*, **531**, 523-527, <https://doi.org/10.1038/nature17186>.

182. Chen, G. Q., Gong, R. H., Yang, D. J., Zhang, G., Lu, A. P., Yan, S. C., Lin, S. H., and Bian, Z. X. (2017) Halofuginone dually regulates autophagic flux through nutrient-sensing pathways in colorectal cancer, *Cell Death Dis.*, **8**, e2789, <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.203>.
183. Wang, M., Wang, K., Liao, X., Hu, H., Chen, L., Meng, L., Gao, W., and Li, Q. (2021) Carnitine palmitoyltransferase system: a new target for anti-inflammatory and anticancer therapy? *Front. Pharmacol.*, **12**, 760581, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.760581>.
184. Qiao, S., Lv, C., Tao, Y., Miao, Y., Zhu, Y., Zhang, W., Sun, D., Yun, X., Xia, Y., Wei, Z., and Dai, Y. (2020) Arctigenin disrupts NLRP3 inflammasome assembly in colonic macrophages via downregulating fatty acid oxidation to prevent colitis-associated cancer, *Cancer Lett.*, **491**, 162-179, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.08.033>.
185. Peng, S., Chen, D., Cai, J., Yuan, Z., Huang, B., Li, Y., Wang, H., Luo, Q., Kuang, Y., Liang, W., Liu, Z., Wang, Q., Cui, Y., Wang, H., and Liu, X. (2021) Enhancing cancer-associated fibroblast fatty acid catabolism within a metabolically challenging tumor microenvironment drives colon cancer peritoneal metastasis, *Mol. Oncol.*, **15**, 1391-1411, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12917>.
186. Esteves, P., Blanc, L., Celle, A., Dupin, I., Maurat, E., Amoedo, N., Cardouat, G., Ousova, O., Gales, L., Bellvert, F., Begueret, H., Thumerel, M., Dupuy, J. W., Desbenoit, N., Marthan, R., Girodet, P. O., Rossignol, R., Berger, P., and Trian, T. (2021) Crucial role of fatty acid oxidation in asthmatic bronchial smooth muscle remodelling, *Eur. Respir. J.*, **58**, <https://doi.org/10.1183/13993003.04252-2020>.
187. Jiang, Z., Knudsen, N. H., Wang, G., Qiu, W., Naing, Z. Z. C., Bai, Y., Ai, X., Lee, C. H., and Zhou, X. (2017) Genetic control of fatty acid beta-oxidation in chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **56**, 738-748, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0282OC>.

METABOLIC CHANGES AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES IN HOMEOSTASIS AND IN INFLAMMATION

Review

T. R. Yurakova¹, E. A. Gorshkova¹, M. A. Nosenko², and M. S. Drutskaya^{1,3*}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: marinadru@gmail.com

² Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, D02F306 Dublin, Ireland

³ Division of Immunobiology and Biomedicine, Center of Genetics and Life Sciences,
Sirius University of Science and Technology, 354340 Federal Territory Sirius, Russia

Recently, special attention has been paid to studying the connection between immunological processes and changes in cellular metabolism. This interaction underlies, on the one hand, homeostasis and tissue integrity, and, on the other, inflammation as an integral part of the immune response. Metabolic adaptations are of particular importance because they not only provide energy to immune responses, but also influence immune cell function by controlling transcriptional and posttranscriptional programs. In this regard, understanding the metabolic pathways of immune cells contributes to the search of new approaches in the treatment of a number of diseases, including those associated with metabolic disorders. Macrophages, cells of the innate immune system characterized by high functional plasticity, play a key role in maintaining homeostasis and regulating inflammation. Depending on the phenotype and origin, they can either perform regulatory functions or contribute to the development of inflammation and aggravate the course of the disease. Therefore, exactly how myeloid cells adapt in response to microenvironmental factors can determine the strength and nature of the reaction of the body as a whole. The review examines the impact of metabolic changes in macrophages on their functional properties, including polarization. In the context of inflammatory and metabolic diseases, special attention is paid to the role of immunometabolic adaptations of myeloid cells in maintaining tissue homeostasis and the occurrence of various pathological processes. The final part of the review examines ways to modulate macrophage metabolism as a potential therapeutic approach.

Keywords: proinflammatory cytokines, macrophage polarization, immunometabolism

СЕНЕСЦЕНТНЫЕ МАКРОФАГИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ОПУХОЛЬЮ, ИХ МАРКЕРЫ И РОЛЬ В МИКРООКРУЖЕНИИ ОПУХОЛИ

Обзор

© 2024 Т.В. Пухальская^{1,2,3}, Т.Р. Юракова², Д.А. Богданова^{1,3}, О.Н. Демидов^{1,3,4*}

¹ АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», 354340 Сириус, Россия

² ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия

³ Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Inserm UMR1231, Университет Бургундии,
21000 Дижон, Франция; электронная почта: Oleg.Demidov@u-bourgogne.fr

Поступила в редакцию 21.12.2023

После доработки 27.04.2024

Принята к публикации 27.04.2024

Ассоциированные с опухолью макрофаги (ТАМ) представляют собой важный компонент микроокружения опухоли и наиболее распространенную популяцию иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. В значительной мере именно ТАМ могут определять направленность противоопухолевого иммунного ответа, усиливая его или, наоборот, способствуя формированию иммуносупрессивного микроокружения, позволяющего опухоли избегать контроля со стороны иммунной системы. Вследствие взаимодействия с опухолевыми клетками или другими клетками микроокружения, а также в результате действия противоопухолевых лекарственных средств у макрофагов может развиваться состояние сенесцентности. В данном обзоре мы попытались обобщить сведения, имеющиеся в литературе, о роли сенесцентных макрофагов в опухоли. В связи с разработкой в последнее время стратегий сенолитической терапии, направленной на удаление сенесцентных клеток из организма, представляется важным обсуждение функций сенесцентных макрофагов и потенциала использования сенолитических препаратов с точки зрения репрограммирования ТАМ для усиления противоопухолевого иммунного ответа и повышения эффективности лечения онкологических заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сенесцентные клетки, p16^{INK4}, p21^{cip1}, CD206, CXCR1, микроокружение опухоли, иммуносупрессия.

DOI: 10.31857/S0320972524050058 EDN: YPAVGF

ВВЕДЕНИЕ

Микроокружение опухоли (от англ. tumor microenvironment, TME) представляет собой сложную гетерогенную систему, включающую иммунные клетки, эндотелиальные и стромальные клетки, а также внеклеточный матрикс [1–7]. Недавние исследования с помощью анализа транскриптома одиночных клеток (от англ. single-cell analysis, SCA) показали, что до 90% клеток в микроокружении опухоли могут быть не трансформированы [8]. Состав TME варьирует в зависимости от типа и стадии опухоли; органа, в котором возникает пер-

вичный очаг; факторов, экспрессируемых опухолевыми клетками, и анамнеза пациента [9].

В последнее время все больше внимания уделяют влиянию клеточного старения или так называемого состояния сенесцентности (от англ. senescence) на рост и развитие опухоли [10]. Фенотип сенесцентных клеток гетерогенен и зависит от типа клеток, подверженных сенесцентности, и факторов, вызвавших данное состояние. Сенесцентность характеризуется, как правило, необратимой остановкой клеточного цикла, повышенной активностью лизосом, устойчивостью к апоптотическим стимулам, увеличением гликолиза, повышенным количеством повреждений ДНК, а также повышенной секрецией хемокинов, цитокинов

* Адресат для корреспонденции.

и факторов роста, объединенных под общим названием «секреторный фенотип, ассоциированный со старением» (от англ. senescence-associated secretory phenotype, SASP). Паракринно влияя на окружающие клетки, SASP может способствовать инициации эпителиально-мезенхимального перехода [11, 12], приобретению клетками плюрипотентности (стволовости) [13, 14], локальной инвазии тканей [15], ангиогенезу [16], активации фибробластов [17], иммуносупрессии [18, 19], усиленному метастазированию [20] и резистентности к терапии [21].

Исходя из вышеперечисленных функций, для детекции сенесцентных клеток наиболее часто используются такие маркеры, как повышенная экспрессия ингибиторов клеточного цикла, p16^{INK4} и p21^{cip1} [22]; увеличенная активность связанной со старением лизосомальной β -галактозидазы [23]; большее, по сравнению с остальными клетками, количество фосфорилированной формы гистона H2AX, отражающей наличие повреждений в ДНК; цитокины, характеризующие SASP, например, IL-6 [24]. Следует отметить, что на сегодняшний день не существует единого уникального маркера сенесцентности, и часто для подтверждения данного фенотипа клеток используется одновременно несколько методов.

Помимо спонтанного старения, в ТМЕ часто встречается старение, индуцируемое терапией. Различные исследования показали, что классическая цитотоксическая терапия, таргетная терапия и иммунотерапия также могут индуцировать клеточное старение [25]. Под воздействием этих факторов все типы клеток ТМЕ могут подвергаться сенесцентности и влиять на опухолевые клетки. Однако особый интерес в контексте сенесцентности представляют макрофаги, ассоциированные с опухолью (от англ. Tumor-associated macrophages, TAM), играющие важную роль в ТМЕ и составляющие наиболее распространенную популяцию иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль [26]. Как клетки иммунной системы, они во многом определяют иммунный ландшафт ТМЕ и могут способствовать прогрессированию заболевания [8]. Так, было показано, что наличие сенесцентных TAM в опухоли ассоциировано с плохим прогнозом течения болезни и эффективности терапии [27–29]. Несмотря на то что удаление или репрограммирование сенесцентных TAM представляется перспективным подходом к повышению эффективности

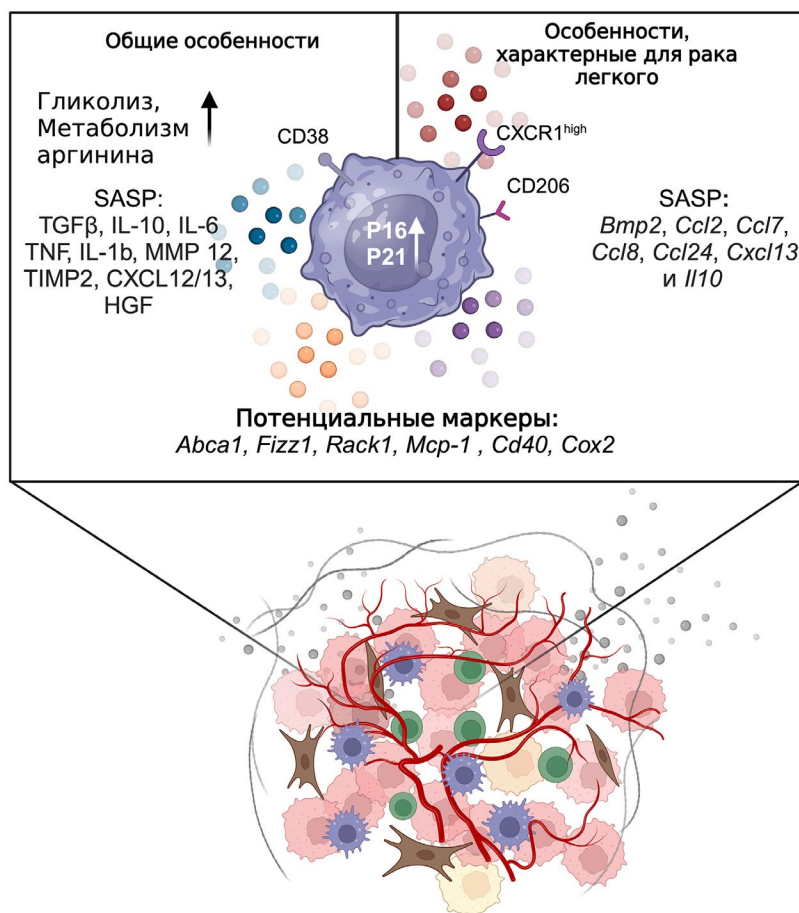
терапии онкологических заболеваний, до последнего времени практически отсутствовали сведения о фенотипе, характерном для сенесцентных макрофагов в ТМЕ, и молекулярных механизмах, лежащих в основе его формирования. Таким образом, своевременным представляется обсуждение прогресса в данной области, связанного с активным поиском универсальных маркеров для сенесцентных TAM и появлением в последние годы новых моделей для определения биологических эффектов данной субпопуляции клеток на рост и развитие опухоли.

СЕНЕСЦЕНТНЫЕ МАКРОФАГИ В ОПУХОЛИ

Как и другие типы клеток микроокружения опухоли, TAM могут подвергаться сенесцентности, однако потенциальные биологические механизмы появления сенесцентных макрофагов в опухоли и их прогностическая ценность в значительной степени неизвестны [28]. Сложность в изучении данного вопроса связана с тем, что фенотип макрофагов *in vivo* и *in vitro* при одном и том же типе опухоли может сильно различаться. Кроме того, гетерогенность механизмов и плеiotропность медиаторов сенесцентности при опухолевых заболеваниях дополнительно осложняются генетическим разнообразием опухолей человека и сложными взаимодействиями между опухолевыми клетками и клетками их микроокружения в процессе онкогенеза [30]. При этом клетки ТМЕ также могут иметь очень гетерогенный фенотип. Так, макрофаги *in vivo* характеризуются большим спектром субпопуляций, среди которых важной в терапевтическом плане представляется субпопуляция сенесцентных макрофагов. Ниже будут суммированы особенности сенесцентных макрофагов, которые в своей совокупности позволяют отличить данный тип клеток от других субпопуляций макрофагов (рисунок).

Фенотип сенесцентных TAM. Наиболее подробно описаны и изучены на сегодняшний день такие субпопуляции TAM, как провоспалительные M1-подобные и иммуносупрессивные M2-подобные макрофаги (подробнее M1- и M2-макрофаги обсуждаются в статье Юраковой и др. [31] в этом номере журнала «Биохимия»). Фенотип сенесцентных макрофагов в микроокружении опухоли нельзя отнести ни к традиционному, характерному

Принятые сокращения: BMDM – макрофаги, полученные из предшественников костного мозга; LCCM-BMDM – макрофаги, полученные из костного мозга мыши путем культивирования в кондиционной среде от фибробластов L929; M-CSF-BMDM – макрофаги, полученные из костного мозга мыши путем культивирования с рекомбинантным M-CSF; OXPHOS – окислительное фосфорилирование; TAM – макрофаги, ассоциированные с опухолью; TLR – toll-подобные рецепторы; ТМЕ – микроокружение опухоли; SASP – секреторный фенотип, ассоциированный со старением; SCA – анализ транскриптома одиночных клеток.



Потенциальные маркеры для сенесцентных TAM. Слева обозначены более универсальные маркеры, встречающиеся в разных моделях опухолевого генеза; справа обозначены маркеры, охарактеризованные для TAM рака легкого. Для сенесцентных TAM характерно совместное увеличение экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ p16^{INK4} и/или p21^{cip1}, аргиназы (Arg1), CD206, CXCR1, CD38; увеличенный метаболизм аргинина и увеличенный гликолиз. SASP сенесцентных TAM характеризуется такими секретируемыми молекулами, как TGF-β, IL-10, IL-6, TNF, IL-1β, MMP12, TIMP2, CXCL12, CXCL13, HGF. В модели рака легкого путем секвенирования на уровне одиночных клеток были выявлены специфические маркеры, характерные для сенесцентных TAM в легких: *Bmp2*, *Ccl2*, *Ccl7*, *Ccl8*, *Ccl24*, *Cxcl13* и *Il10*. Маркеры *Abca1*, *Fizz1*, *Rack1*, *Msp-1*, *Cd40*, *Cox2*. Создано с помощью BioRender.com

для M2 (высокая экспрессия *Arg1*), ни к M1 (высокая экспрессия *iNOS*) классу поляризации. Макрофаги в TME могут иметь различный фенотип, обусловленный типом опухоли, проведенным лечением и конкретной клинической картиной [32]. Таким образом, актуальной задачей представляется поиск специфических маркеров, которые позволили бы селективно отделить сенесцентные макрофаги от других TAM для разработки терапии, направленной на данную популяцию клеток. В табл. 1 обобщены имеющиеся данные и сравниваются маркеры, характерные для сенесцентных и M1/M2-макрофагов [33].

Старение сопровождается системным хроническим воспалением, которое характеризуется повышением экспрессии компонентов SASP: провоспалительных цитокинов IL-1α, IL-6 и TNF, С-реактивного белка, матриксных металлопротеиназ MMP-3 и MMP-9, модулирующих внеклеточный

матрикс, а также хемокинов CXCL-1 и CXCL-10, привлекающих нейтрофилы и моноциты соответственно [46, 54]. Все эти факторы могут влиять на опухолевые клетки и микроокружение. В недавнем систематическом обзоре Moss et al. [55] пришли к выводу, что маркеры провоспалительных (M1) макрофагов, включая CD11c, *iNOS*, МНС-II и CD80, чаще повышались с возрастом, однако остается невыясненным, как это соответствует картине в опухолевом микроокружении.

Другая часть данных сосредоточена на том, что сенесцентные макрофаги имеют M2-подобный фенотип. Считается, что макрофаги с M2-поляризацией демонстрируют повышенную экспрессию аргиназы-1 (*Arg1*), вовлеченной в метаболизм аргинина [33], и способствуют развитию немелкоклеточного рака легкого, а их присутствие в микроокружении коррелирует со снижением выживаемости пациентов, увеличением метастази-

Таблица 1. Сравнение маркеров, характерных для M1/M2- и сенесцентных макрофагов

Маркеры	M1 [34–37]	M2a [8, 34, 37, 38]	M2b [38, 39]	M2c [38, 40]	M2d [38, 41–43]	Сенесцентные макрофаги [8, 44–53]
TNF, IL-6	+	–	+	–	–	+
IL-10	–	+	+	+	+	+
TGF- β	–	+	–	+	–	+
IL-1	+	–	+	–	–	+
CD206	–	+	–	–	–	+
ARG1	–	+	–	+	+	+
iNOS	+	+	–	–	+	+/-
MHC-II, CD80	+	–	–	–	–	+/-
CD163	–	+	+	–	–	+
CD38	+	–	–	–	–	+
Экспрессия TLR-рецепторов	TLR2/4	–	–	TLR1/8	–	снижается экспрессия всех TLR

рования и усиленной пролиферацией опухолевых клеток [56, 57]. Кроме того, M2-подобным, иммуносупрессивным фенотипом обладают и стареющие TAM, что было показано в нескольких работах [8, 34, 37–43]. В результате транскриптомного анализа одиночных клеток образцов пациентов с рефрактерным раком мочевого пузыря [27] были определены кластеры генов, экспрессирующихся в сенесцентных макрофагах. Среди этих генов был выделен трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), характерный для иммуносупрессивного окружения в опухоли. Также была отмечена альдокеторедуктаза В (AKR1B1), играющая важную роль в воспалении и метаболизме различных химиотерапевтических препаратов, а также в клеточной дифференцировке, пролиферации и апоптозе [28, 58].

Как у людей, так и у мышей сенесцентные TAM демонстрируют снижение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC-II) и экспрессии toll-подобных рецепторов (TLR) [52], что сопровождается снижением фагоцитарной активности [59], эффероцитоза и аутофагии [46]. Это тоже характеризует стареющие макрофаги как более иммуносупрессивные клетки, несмотря на повышенную экспрессию SASP.

Также стоит обратить внимание на потенциально новые маркеры сенесцентности макрофагов (ABCA1, FIZZ1, RACK1, MCP-1, CD40, COX2), упомянутые в недавнем систематическом обзоре Moss et al. [55]. Возможно, что эти маркеры также играют определенную роль в сенесцентности TAM. Несмотря на то что не существует уникального

маркера для идентификации стареющих клеток, повышенная экспрессия ингибиторов циклин-зависимых киназ p16^{INK4a} и p21^{cip1} уже давно используется в качестве маркера стареющих клеток *in vitro* и *in vivo* как в мышиных, так и в человеческих моделях [48, 60, 61], в том числе и для макрофагов [49, 50, 62].

Метаболизм сенесцентных TAM. Помимо фенотипических характеристик, необходимо учитывать функциональные и метаболические характеристики стареющих макрофагов. Одна из особенностей сенесцентных клеток – сохранение метаболической активности для поддержания программы SASP и других специфических функций, несмотря на остановку клеточного цикла [63]. Как правило, в сенесцентных иммунных клетках происходит накопление дисфункциональных митохондрий, задействуется гликолиз вместо окислительного фосфорилирования (от англ. oxidative phosphorylation, OXPHOS), что приводит к несбалансированному биоэнергетическому состоянию [64].

Похожие метаболические адаптации характерны для провоспалительных M1-макрофагов, которые в основном используют гликолиз и демонстрируют сниженный OXPHOS, в то время как альтернативно активированные M2-макрофаги в основном зависят от OXPHOS [65, 66]. С функциональной точки зрения повышенный метаболизм глюкозы в TAM необходим для синтеза различных молекул, входящих в SASP, в том числе он способствует повышенной секреции катепсина-В макрофагами и прогрессированию опухоли [63, 67, 68]. Интересно отметить, что метаболические

адаптации других типов сенесцентных клеток могут отличаться от адаптаций сенесцентных ТАМ. Например, для сенесцентных эндотелиальных клеток [69], гепатоцитов [70, 71], β -клеток при диабете [72, 73], гемопоэтических стволовых клеток [74] характерно увеличение окислительного фосфорилирования. Однако для сенесцентных макрофагов более характерно увеличение гликолиза. Ингибирование данного метаболического пути может быть потенциальным подходом к сенолитической терапии [75].

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) представлен в организме в окисленном (NAD^+) и восстановленном состоянии (NADH). NAD – важный окислительно-восстановительный кофермент, который играет одну из ключевых ролей в энергетическом метаболизме [76], а также является субстратом для сиртуинов, PARP1 и эктоферментов CD38 и CD157 [77]. Неоднократно было показано, что уровень NAD^+ снижается с возрастом [78]. Более того, было показано, что для моноцитов и макрофагов пожилых людей характерно снижение дыхательной способности из-за недостаточного уровня NAD [64].

Активация CD38 в процессе старения может усилить передачу сигнала NF- κB в макрофагах [53, 79], что способствует индукции экспрессии факторов SASP [80]. Факторы SASP, такие как IL-6, секретируемые в микроокружении опухоли, могут активировать экспрессию CD38 в макрофагах [63]. Эктоферменты CD38 и CD157, в свою очередь, могут гидролизовать NAD^+ в опухолевых тканях и высвобождать внеклеточный аденозин, который участвует в иммуносупрессии [81]. Следовательно, стареющие клетки, экспрессирующие CD38, могут вызывать потерю NAD^+ , что может приводить к увеличению количества стареющих клеток посредством влияния факторов SASP по принципу положительной обратной связи.

Сигналинг NF- κB и митохондриальный Ca^{2+} (mCa^{2+}) играют важную роль в регуляции воспалительного ответа, индукции фенотипа SASP и поляризации макрофагов [82]. Связь между сигналингом NF- κB и метаболизмом кальция была обнаружена при анализе 700 транскриптомов человека. В результате анализа было выявлено, что возраст коррелирует с экспрессией генов митохондриального кальциевого транспортера (*MCU*) и его регуляторной субъединицы *MICU1*. Эти гены играют важную роль в передаче сигналов mCa^{2+} [47].

ВЛИЯНИЕ СЕНЕСЦЕНТНЫХ ТАМ НА ПРОГРЕССИЮ ОПУХОЛИ

В работах последнего года было продемонстрировано патогенное влияние сенесцентных мак-

рофагов на рост и развитие опухолей в моделях немелкоклеточного рака легкого. Haston et al. [8] была создана мышьяная модель p16-FDR, которая позволила обнаружить, что ТАМ и в меньшей степени эндотелиальные клетки – это основной пул сенесцентных клеток, населяющих KRAS-индуцированные опухоли легкого. Показано, что удаление p16^{INK4a+} сенесцентных клеток с помощью сенолитических подходов может увеличить продолжительность жизни мышей и задерживать рост опухоли [8, 83]. Сенесцентные ТАМ в модели p16-FDR демонстрировали фенотип CD206⁺p16^{INK4a+}, а также экспрессировали мРНК генов, кодирующих множество опухоль-стимулирующих факторов SASP, которые оказались уникальными в опухолях, формирующихся в легких (*Bmp2*, *Ccl2*, *Ccl7*, *Ccl8*, *Ccl24*, *Cxcl13* и *Il10*), и не характерными для ранее описанных классических факторов SASP, таких как *Tnf*, *Mcp1*, *Il6*, *Il1b*, *Il7*, *Mmp12*, *Timp2*, *Cxcl-12/13*, *Hgf* [8, 50, 51]. Работа Haston et al. [8] стала ключевой в области сенесцентных макрофагов в опухоли, поскольку до этого было не до конца понятно, действительно ли макрофаги обладают свойствами сенесцентности. Интересно, что аналогичный фенотип макрофагов, который наблюдался в KRAS-индуцированных опухолях легких у мыши, был также выявлен у пожилых мышей в возрасте 20–22 месяца.

В работе Prieto et al. [29] использовали ранее созданную трансгенную линию мышей (INK-ATTAC), в которых авторы методом SCA обнаружили популяцию сенесцентных альвеолярных макрофагов SIGLEC⁺p16^{INK4a+}CXCR1^{high}, локализующихся в тканях старых мышей и в опухолевых очагах в легких. Субпопуляция SIGLEC⁺p16^{INK4a+}CXCR1^{high} способствовала образованию аденом и ингибировала пролиферацию и инфильтрацию опухоли CD8⁺ лимфоцитами. Специфическое удаление сенесцентных клеток p16^{INK4a+} в модели INK-ATTAC предотвращало негативные эффекты, опосредованные стареющими клетками в ТМЕ, и задерживало онкогенез у KRAS-мышей [29].

Работы Prieto et al. [29] и Haston et al. [8] демонстрируют, что стратегия удаления сенесцентных макрофагов из ТМЕ имеет противоопухолевый потенциал. Данный подход может быть предложен в качестве вспомогательной терапии при лечении онкологических заболеваний.

В качестве препаратов для селективного удаления сенесцентных клеток предлагается использовать новый класс лекарственных средств – сенолитики (от англ. senolytics: senile – дряхлый; lytic – разрушающий). Сведения о наиболее популярных и широко используемых в настоящее время сенолитиках приведены нами в табл. 2. Некоторые из них уже одобрены в клинике в качестве терапии для лечения различных заболеваний, поэтому их репозиционирование с целью сеноли-

Таблица 2. Основные сенолитики, используемые в настоящее время

Сенолитик/Сеноморфик	Действие	Влияние на сениесцентные макрофаги	Ссылки
Дазатиниб + Кверцетин	ингибиторы Src/Abl HIF-1 α , PI3-киназа	оказывает	[84, 85]
ABT-263 (Навитоклакс)	ингибиторы белков семейства Bcl-2	оказывает	[86]
ABT-737	ингибиторы белков семейства Bcl-2	оказывает	[8]
Венетоклакс	белки семейства Bcl-2	не изучалось	[87]
Физетин	каскад PTEN/mTor	оказывает	[88]
SR12343	ингибитор NF- κ B	не изучалось	[89, 90]
Апигенин	IRAK1/I κ B α /NF- κ B	не изучалось	[91, 92]
Сердечные гликозиды	преимущественно ингибиторы Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	не изучалось	[93–95]

тической терапии может занять короткое время, и в ближайшее годы такие препараты можно будет применять для репрограммирования опухолевого окружения у онкологических больных.

РАЗНООБРАЗИЕ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕНЕСЦЕНТНЫХ ТАМ

В заключительном разделе обзора мы считаем важным обобщить существующие подходы моделирования ТАМ и обсудить, какие из них могут быть применимы для моделирования сениесцентных ТАМ. Так, в литературе встречаются следующие *in vitro* подходы: ассоциация первичных макрофагов или клеточных линий путем добавления кондиционной среды от опухолевых клеток [96], кокультивирование, культивирование в системе transwell [33, 97], выделение ТАМ непосредственно из опухолевой ткани и их последующее культивирование *in vitro* [98–100].

Человеческие ТАМ *in vitro*. Наиболее распространенный подход основан на использовании трансформированных моноцитарных линий человека, таких как THP-1 и U937, после стимуляции форбол-миристат-ацетатом. Полученные макрофаги культивируются с кондиционной средой от опухолевых клеток [101], иногда дополнительно используются факторы, способствующие развитию M2-подобного фенотипа (IL-4 и IL-10) [102]. Данный подход помогает стандартизировать модель, однако для исследования сениесцентных ТАМ имеет ряд недостатков, а именно изначальное праймирование клеток в сторону M2-подобного фенотипа, что ограничивает возможность отслеживания изменений в транскрипционном и метаболическом профиле в конкретной модели в ответ на ас-

социацию с опухолью и последующую индукцию старения.

Другой способ для создания ТАМ человека основан на получении предшественников макрофагов из периферической крови человека путем культивирования в присутствии человеческого гранулацитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и последующей активацией IFN- γ и липополисахаридом (LPS) для M1, тогда как для получения M2 и ТАМ макрофаги дифференцируют в среде, содержащей человеческий макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) с последующей стимуляцией IL-4 [103].

Интересно, что 2D *in vitro* система, где ТАМ получены путем добавления кондиционной среды от опухолевых клеток непосредственно к макрофагам, часто оказывается недостаточной, чтобы детектировать изменения, связанные с сениесцентными макрофагами. Так, например, только совместное культивирование макрофагов с опухолевыми клетками в работе Erukashvily et al. [104] позволило детектировать транскрипцию перичентромерных сателлитных повторов HS2/HS3, которые, вероятно, ассоциированы со старением. Данные отличия демонстрируют важность прямых межклеточных контактов между клетками микроокружения и клетками опухоли, что также важно учитывать при выборе модели ТАМ.

Мышиные ТАМ *in vitro*. На наш взгляд, *in vitro* модели ТАМ человека и мыши имеют ряд важных принципиальных отличий. Так, основной подход для получения мышиных ТАМ *in vitro* основан на использовании макрофагов, дифференцированных из клеток костного мозга (от англ. bone marrow-derived macrophages, BMDM). При моделировании ТАМ в литературе встречаются два возможных способа дифференцировки макрофагов:

Таблица 3. Мышиные модели для изучения сенесцентности

Название мышиной модели	Описание	Репортерная система/ (цвет сенесцентных клеток)	Система для удаления сенесцентных клеток	Индукцируемость системы	Ссылки
p16-3MR	ВАС трансген; репортерная каскада под регуляцией промотора <i>p16^{INK4a}</i>	Luciferase/mRFP (красный, ex584/em607)	<i>HSV-TK</i> + ганцикловир	только удаление клеток – ганцикловир	[114]
p16-Cre и p16-CREERT2	геномный Knock-in каскады в последний экзон <i>p16^{INK4a}</i> после СТОП-кодона	<i>Rosa26-mTmG</i> (зеленый, ex484/em510)	<i>Rosa26-lsl-DTA</i>	тамоксифен для <i>p16-CREERT2</i>	[62]
p16Ink4a-CreERT2	геномный Knock-in гена <i>CreERT2</i> в первый экзон <i>p16^{INK4a}</i>	<i>Rosa26-CAG-lsl-tdTomato</i> (оранжевый, ex554/em581)	<i>Rosa26-SA-lsl-DTR-IRES-tdTomato</i>	тамоксифен; тамоксифен + дифтерийный токсин	[115]
p21-Cre	<i>attP</i> трансген; репортерная каскада под регуляцией минимального промотора <i>p21^{cip1}</i> <i>p21-CreERT2-IRES-GFP</i>	<i>Rosa26-CAG-lsl-tdTomato</i> (оранжевый, ex554/em581); или (зеленый, ex484/em510)	<i>Rosa26-lsl-LUC / Rosa26-lsl-DTA</i>	тамоксифен	[48]
INK-ATTAC	трансген; репортерная каскада под регуляцией минимального промотора <i>p16^{INK4a}</i>	<i>FKBP-Casp8-IRES-EGFP</i> (зеленый, ex488/em507)	<i>FKBP-Casp8</i>	только удаление клеток – AP20187	[29, 116]
p16-FDR	геномный Knock-in каскады в последний экзон <i>p16^{INK4a}</i> после СТОП-кодона; <i>P16-P2A-FLPo-P2A-DTR-mCherry</i>	<i>Rosa26 frt-STOP-frt-EGFP</i> (зеленый, ex488/em507) или <i>DTR-mCherry</i> (красный, ex587/em610)	<i>DTR-mCherry</i>	только удаление клеток – дифтерийный токсин	[8]

Примечание. *HSV-TK* – ген тимидинкиназы вируса простого герпеса; *DTA* – ген дифтерийного токсина А; *DTR* – ген рецептора дифтерийного токсина; *FLPo* – ген оптимизированной флиппазы-рекомбиназы; *mTmG* – *loxP-tdTomato-STOP-loxP-GFP*; *FKBP-Casp8* – ген *FK506*, кодирующий белок, связывающий каспазу 8.

(1) путем добавления мышиного М-CSF (М-CSF-BMDM); (2) путем добавления кондиционной среды от клеточной линии L929 (LCCM) (LCCM-BMDM) [33]. Помимо М-CSF, LCCM содержит химерин (Rarres2), фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (Mif), остеопонтин, Ccl7, Ccl2, Cxcl1, Cx3cl1, Ccl9, Gerem1, трансформирующий фактор роста β (Tgf-β) [105]. Макрофаги, полученные этими двумя способами, различаются по ряду показателей, что было описано ранее, причем как при стимуляции LPS, так и в неактивированном состоянии. LCCM-BMDM при стимуляции LPS секретируют Tnf, Il-6 и Il-12 на более низком уровне, по сравнению с М-CSF-BMDM, и демонстрируют увеличение показателей гликолиза, имеют увеличенную массу митохондрий с более высоким процентом дисфункциональных митохондрий. Также была продемонстрирована секреция Il-10

в неактивированном состоянии LCCM-BMDM по сравнению с М-CSF-BMDM [106]. Это важно учитывать при работе с моделью сенесцентных TAM *in vitro*, поскольку увеличение экспрессии *Il10* при воспалительных процессах в макрофагах описано как одно из изменений, связанных со старением [55].
Модели изучения взаимодействия TAM с опухолевым микроокружением *in vitro*, несмотря на некоторую искусственность, обладают рядом очевидных преимуществ. Так, например, менее трудоемкое моделирование эксперимента, дешевизна и возможность проводить высокопроизводительные скрининги больших библиотек химических соединений с целью поиска новых лекарственных средств, позволяющих снижать негативные свойства TAM и увеличивать их противоопухолевую активность.

В последние годы динамично развиваются исследования опухолевого микроокружения с помощью культивирования опухолевых органоидов. Данный подход занимает промежуточное положение между исследованиями роли TAM *in vitro* и *in vivo*, оставаясь простым и относительно дешевым протоколом, но при этом эффективно моделирует сложные трехмерные взаимодействия TAM с внеклеточным матриксом и с разнообразными типами клеток в TME [107]. В связи с прогрессом, намечающимся в этой области, ожидается, что в ближайшие годы экспериментальные протоколы культивирования органоидов получат широкое распространение.

Изучение TAM *in vivo*. Эталонном в области изучения TAM остается использование моделей онкогенеза на лабораторных животных, в первую очередь на мышинных моделях. Усиленный успехами в области секвенирования на уровне одиночных клеток (SCA) и данными SCA о различных сигналах TAM, полученных *ex vivo* из биоптатов пациентов с онкологией, такой подход позволяет добиться наиболее точных результатов и расширить наши познания о роли макрофагов на различных этапах онкогенеза [108–111]. В разделе, посвященном влиянию сенесцентных TAM на прогрессию опухоли, мы уже обсудили успешные примеры создания и использования *in vivo* моделей для изучения сенесцентных TAM [29]. Данные по характеристикам этих мышинных моделей и ряда других перспективных моделей *in vivo* для изучения сенесцентности собраны нами в табл. 3. Представленная таблица может помочь заинтересованным исследователям с выбором наиболее подходящей экспериментальной модели [8, 29, 48, 62, 98–100, 112, 113].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приобретение клетками опухолевого микроокружения, включая TAM, состояние сенесцентности может оказывать значительное влияние на прогрессию опухоли и ее устойчивость к современным протоколам противоопухолевой терапии. Сенесцентная модальность TAM не вписывается полностью в существующие на сегодняшний день функциональные классификации макрофагов, такие как поляризация M1/M2. Экспоненциально

увеличивающееся количество работ, посвященных анализу опухолевого микроокружения на уровне одиночных клеток, а также создание в последние годы упомянутых в нашей статье усовершенствованных моделей для *in vivo* изучения сенесцентных TAM позволят в ближайшее время детально охарактеризовать данную субпопуляцию миелоидных клеток в опухолях и улучшить наше понимание роли сенесцентных TAM в онкогенезе. Мы надеемся, что обсуждаемый в этом обзоре прогресс в области методологии изучения сенесцентных TAM поможет читателю более рационально подойти к вопросам выбора правильного подхода при исследовании разнообразных аспектов опухолевого роста. Особого внимания, как отдельная популяция клеток, сенесцентные TAM заслуживают в связи с появлением в арсенале врачей нового класса лекарственных средств, сенолитиков, которые, изменяя соотношение сенесцентных клеток в опухолевом микроокружении, ограничивают их негативное воздействие и могут в значительной мере повысить эффективность различных методов лечения онкологических заболеваний.

Вклад авторов. Т.В. Пухальская – формулировка идеи статьи, написание текста, редактирование текста статьи, создание иллюстрации; Т.Р. Юркова – редактирование текста статьи; Д.А. Богданова – написание текста, редактирование текста статьи, создание иллюстрации; О.Н. Демидов – формулировка идеи статьи, написание текста, редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-20128). Работа Пухальской Т.В. и Богдановой Д.А. частично поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект НИР-ИМБ-2102).

Благодарности. Выражаем благодарность Друцкой Марине Сергеевне за ценные замечания и советы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sobierajska, K., Ciszewski, W. M., Sacewicz-Hofman, I., and Niewiarowska, J. (2020) Endothelial cells in the tumor microenvironment, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1234**, 71-86, https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_6.
2. Uyanik, B., Goloudina, A. R., Akbarali, A., Grigorash, B. B., Petukhov, A. V., Singhal, S., Eruslanov, E., Chaloyard, J., Lagorgette, L., Hadi, T., Baidyuk, E. V., Sakai, H., Tessarollo, L., Ryffel, B., Mazur, S. J., Lirussi, F., Garrido, C.,

- Appella, E., and Demidov, O. N. (2021) Inhibition of the DNA damage response phosphatase PPM1D reprograms neutrophils to enhance anti-tumor immune responses, *Nat. Commun.*, **12**, 3622, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23330-6>.
3. Van der Leun, A. M., Thommen, D. S., and Schumacher, T. N. (2020) CD8⁺ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis, *Nat. Rev. Cancer*, **20**, 218-232, <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0235-4>.
 4. Zhao, Y., Shen, M., Wu, L., Yang, H., Yao, Y., Yang, Q., Du, J., Liu, L., Li, Y., and Bai, Y. (2023) Stromal cells in the tumor microenvironment: accomplices of tumor progression? *Cell Death Dis.*, **14**, 587, <https://doi.org/10.1038/S41419-023-06110-6>.
 5. Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C. C., Vonderheide, R. H., Pittet, M. J., Jain, R. K., Zou, W., Howcroft, T. K., Woodhouse, E. C., Weinberg, R. A., and Krummel, M. F. (2018) Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy, *Nat. Med.*, **24**, 541-550, <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>.
 6. Anderson, N. M., and Simon, M. C. (2020) The tumor microenvironment, *Curr. Biol.*, **30**, R921-R925, <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.06.081>.
 7. Atretkhany, K. S. N., and Drutskaya, M. S. (2016) Myeloid-derived suppressor cells and proinflammatory cytokines as targets for cancer therapy, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1274-1283, <https://doi.org/10.1134/S0006297916110055>.
 8. Haston, S., Gonzalez-Gualda, E., Morsli, S., Ge, J., Reen, V., Calderwood, A., Moutsopoulos I., Panousopoulos, L., Deletic, P., Carreno, G., Guiho, R., Manshaei, S., Gonzalez-Meljem, J. M., Lim, H. Y., Simpson, D. J., Birch, J., Pallikonda, H. A., Chandra, T., Macias, D., Doherty, G. J., Rassl, D. M., Rintoul, R. C., Signore, M., Mohorianu, I., Akbar, A. N., Gil, J., Muñoz-Espín, D., and Martinez-Barbera, J. P. (2023) Clearance of senescent macrophages ameliorates tumorigenesis in KRAS-driven lung cancer, *Cancer Cell*, **41**, 1242-1260.e6, <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2023.05.004>.
 9. De Visser, K. E., and Joyce, J. A. (2023) The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth, *Cancer Cell*, **41**, 374-403, <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2023.02.016>.
 10. Schmitt, C. A., Wang, B., and Demaria, M. (2022) Senescence and cancer – role and therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **19**, 619-636, <https://doi.org/10.1038/S41571-022-00668-4>.
 11. Canino, C., Mori, F., Cambria, A., Diamantini, A., Germoni, S., Alessandrini, G., Borsellino, G., Galati, R., Battistini, L., Blandino, R., Facciolo, F., Citro, G., Strano, S., Muti, P., Blandino, G., and Cioce, M. (2012) SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells, *Oncogene*, **31**, 3148-3163, <https://doi.org/10.1038/ONC.2011.485>.
 12. Bogdanova, D. A., Kolosova, E. D., Pukhalskaia, T. V., Levchuk, K. A., Demidov, O. N., and Belotserkovskaya, E. V. (2024) The differential effect of senolytics on SASP cytokine secretion and regulation of EMT by CAFs, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 4031, <https://doi.org/10.3390/IJMS25074031>.
 13. Milanovic, M., Fan, D. N. Y., Belenki, D., Däbritz, J. H. M., Zhao, Z., Yu, Y., Dörr, J. R., Dimitrova, L., Lenze, D., Monteiro Barbosa, I. A., Mendoza-Parra, M. A., Kanashova, T., Metzner, M., Pardon, K., Reimann, M., Trumpp, A., Dörken, B., Zuber, J., Gronemeyer, H., Hummel, M., Dittmar, G., Lee, S., and Schmitt, C. A. (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness, *Nature*, **553**, 96-100, <https://doi.org/10.1038/NATURE25167>.
 14. Nacarelli, T., Fukumoto, T., Zundell, J. A., Fatkhutdinov, N., Jean, S., Cadungog, M. G., Borowsky, M. E., and Zhang, R. (2020) NAMPT inhibition suppresses cancer stem-like cells associated with therapy-induced senescence in ovarian cancer, *Cancer Res.*, **80**, 890-900, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2830>.
 15. Kim, Y. H., Choi, Y. W., Lee, J., Soh, E. Y., Kim, J. H., and Park, T. J. (2017) Senescent tumor cells lead the collective invasion in thyroid cancer, *Nat. Commun.*, **8**, 15208, <https://doi.org/10.1038/NCOMMS15208>.
 16. Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C. M. (2006) Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence, *J. Biol. Chem.*, **281**, 29568-29574, <https://doi.org/10.1074/JBC.M603307200>.
 17. Toste, P. A., Nguyen, A. H., Kadera, B. E., Duong, M., Wu, N., Gawlas, I., Tran, L. M., Bikhchandani, M., Li, L., Patel, S. G., Dawson, D. W., and Donahue, T. R. (2016) Chemotherapy-induced inflammatory gene signature and pro-tumorigenic phenotype in pancreatic CAFs via stress-associated MAPK, *Mol. Cancer Res.*, **14**, 437-447, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0348>.
 18. Chibaya, L., Snyder, J., and Ruscetti, M. (2022) Senescence and the tumor-immune landscape: Implications for cancer immunotherapy, *Semin. Cancer Biol.*, **86 (Pt 3)**, 827-845, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.02.005>.
 19. Ruhland, M. K., Loza, A. J., Capietto, A. H., Luo, X., Knolhoff, B. L., Flanagan, K. C., Belt, B. A., Alspach, E., Leahy, K., Luo, J., Schaffer, A., Edwards, J. R., Longmore, G., Faccio, R., DeNardo, D. G., and Stewart, S. A. (2016) Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis, *Nat. Commun.*, **7**, 11762, <https://doi.org/10.1038/NCOMMS11762>.
 20. Angelini, P. D., Zacarias Fluck, M. F., Pedersen, K., Parra-Palau, J. L., Guiu, M., Bernadó Morales, C., Vicario, R., Luque-García, A., Navalpotro, N. P., Giral, J., Canals, F., Gomis, R. R., Tabernero, J., Baselga, J., Villanueva, J., and Arribas, J. (2013) Constitutive HER2 signaling promotes breast cancer metastasis through cellular senescence, *Cancer Res.*, **73**, 450-458, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2301>.

21. Chambers, C. R., Ritchie, S., Pereira, B. A., and Timpson, P. (2021) Overcoming the senescence-associated secretory phenotype (SASP): a complex mechanism of resistance in the treatment of cancer, *Mol. Oncol.*, **15**, 3242-3255, <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13042>.
22. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., and Demaria, M. (2018) Hallmarks of cellular senescence, *Trends Cell Biol.*, **28**, 436-453, <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2018.02.001>.
23. Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., and Johung, K. (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase, *Aging Cell*, **5**, 187-195, <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00199.X>.
24. Martyshkina, Y. S., Tereshchenko, V. P., Bogdanova, D. A., and Rybtsov, S. A. (2023) Reliable hallmarks and biomarkers of senescent lymphocytes, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15653, <https://doi.org/10.3390/IJMS242115653>.
25. Prasanna, P. G., Citrin, D. E., Hildesheim, J., Ahmed, M. M., Venkatachalam, S., Riscuta, G., Xi, D., Zheng, G., Deursen, J. V., Goronzy, J., Kron, S. J., Anscher, M. S., Sharpless, N. E., Campisi, J., Brown, S. L., Niedernhofer, L. J., O'Loughlen, A., Georgakilas, A. G., Paris, F., Gius, D., Gewirtz, D. A., Schmitt, C. A., Abazeed, M. E., Kirkland, J. L., Richmond, A., Romesser, P. B., Lowe, S. W., Gil, J., Mendonca, M. S., Burma, S., Zhou, D., and Coleman, C. N. (2021) Therapy-induced senescence: opportunities to improve anticancer therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, **113**, 1285-1298, <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJAB064>.
26. Dehne, N., Mora, J., Namgaladze, D., Weigert, A., and Brüne, B. (2017) Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **35**, 12-19, <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2017.04.007>.
27. Weinstein, J. N., Akbani, R., Broom, B. M., Wang, W., Verhaak, R. G. W., and McConkey, D. (2014) Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma, *Nature*, **507**, 315-322, <https://doi.org/10.1038/nature12965>.
28. Jiang, Q., Zhou, J., Chen, Q., Huang, Y., Yang, C., and Liu, C. (2023) Construction and experimental validation of a macrophage cell senescence-related gene signature to evaluate the prognosis, immunotherapeutic sensitivity, and chemotherapy response in bladder cancer, *Funct. Integrat. Genomics*, **23**, 228, <https://doi.org/10.1007/S10142-023-01163-4>.
29. Prieto, L. I., Sturmlechner, I., Graves, S. I., Zhang, C., Goplen, N. P., Yi, E. S., Sun, J., Li, H., and Baker, D. J. (2023) Senescent alveolar macrophages promote early-stage lung tumorigenesis, *Cancer Cell*, **41**, 1261-1275.e6, <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2023.05.006>.
30. Cuollo, L., Antonangeli, F., Santoni, A., and Soriani, A. (2020) The senescence-associated secretory phenotype (SASP) in the challenging future of cancer therapy and age-related diseases, *Biology*, **9**, 1-16, <https://doi.org/10.3390/biology9120485>.
31. Yurakova, T. R., Gorshkova, E. A., Nosenko, M. A., and Drutskaya, M. S. (2024) Metabolic changes and functional activity of macrophages in homeostasis and in inflammation, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 817-838, <https://doi.org/10.1134/S0006297924050043>.
32. Wu, K., Lin, K., Li, X., Yuan, X., Xu, P., Ni, P., and Xu, D. (2020) Redefining tumor-associated macrophage subpopulations and functions in the tumor microenvironment, *Front. Immunol.*, **11**, 1731, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01731>.
33. Park, J. V., Chandra, R., Cai, L., Ganguly, D., Li, H., Toombs, J. E., Girard, L., Brekken, R. A., and Minna, J. D. (2022) Tumor cells modulate macrophage phenotype in a novel *in vitro* co-culture model of the NSCLC tumor microenvironment, *J. Thoracic Oncol.*, **17**, 1178-1191, <https://doi.org/10.1016/J.JTHO.2022.06.011>.
34. Hall, B. M., Balan, V., Gleiberman, A. S., Strom, E., Krasnov, P., Virtuoso, L. P., Rydkina, E., Vujcic, S., Balan, K., Gitlin, I. I., Leonova, K. I., Consiglio, C. R., Gollnick, S. O., Chernova, O. B., and Gudkov, A. V. (2017) p16(Ink4a) and senescence-associated β -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli, *Aging*, **9**, 1867-1884, <https://doi.org/10.18632/aging.101268>.
35. Korneev, K. V., Kondakova, A. N., Sviriaeva, E. N., Mitkin, N. A., Palmigiano, A., Kruglov, A. A., Telegin, G. B., Drutskaya, M. S., Sturiale, L., Garozzo, D., Nedospasov, S. A., Knirel, Y. A., and Kuprash, D. V. (2018) Hypoacylated LPS from foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* induces moderate TLR4-mediated inflammatory response in murine macrophages, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **8**, 58, <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00058>.
36. Cudejko, C., Wouters, K., Fuentes, L., Hannou, S. A., Paquet, C., Bantubungi, K., Bouchaert, E., Vanhoutte, J., Fleury, S., Remy, P., Tailleur, A., Chinetti-Gbaguidi, G., Dombrowicz, D., Staels, B., and Paumelle, R. (2011) p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages, *Blood*, **118**, 2556-2566, <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-10-313106>.
37. Lechner, A., Henkel, F. D. R., Hartung, F., Bohnacker, S., Alessandrini, F., Gubernatorova, E. O., Drutskaya, M. S., Angioni, C., Schreiber, Y., Haimerl, P., Ge, Y., Thomas, D., Kabat, A. M., Pearce, E. J., Ohnmacht, C., Nedospasov, S. A., Murray, P. J., Chaker, A. M., Schmidt-Weber, C. B., and Esser-von Bieren, J. (2022) Macrophages acquire a TNF-dependent inflammatory memory in allergic asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **149**, 2078-2090, <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2021.11.026>.
38. Rackov, G., Hernández-Jiménez, E., Shokri, R., Carmona-Rodríguez, L., Mañes, S., Álvarez-Mon, M., López-Collazo, E., Martínez-A. C., and Balomenos, D. (2016) P21 mediates macrophage reprogramming through regulation of p50-p50 NF- κ B and IFN- β , *J. Clin. Invest.*, **126**, 3089-3103, <https://doi.org/10.1172/JCI83404>.

39. Wang, L. X., Zhang, S. X., Wu, H. J., Rong, X. L., and Guo, J. (2019) M2b macrophage polarization and its roles in diseases, *J. Leukoc. Biol.*, **106**, 345-358, <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>.
40. Yuan, A., Hsiao, Y. J., Chen, H. Y., Chen, H. W., Ho, C. C., Chen, Y. Y., Liu, Y. C., Hong, T. H., Yu, S. L., Chen, J. J., and Yang, P. C. (2015) Opposite effects of M1 and M2 macrophage subtypes on lung cancer progression, *Sci. Rep.*, **5**, 14273, <https://doi.org/10.1038/SREP14273>.
41. Luque-Campos, N., Bustamante-Barrientos, F. A., Pradenas, C., García, C., Araya, M. J., Bohaud, C., Contreras-López, R., Elizondo-Vega, R., Djouad, F., Luz-Crawford, P., and Vega-Letter, A. M. (2021) The macrophage response is driven by mesenchymal stem cell-mediated metabolic reprogramming, *Front. Immunol.*, **12**, 624746, <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.624746>.
42. De Paoli, F., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2014) Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis, *Circ. J.*, **78**, 1775-1781, <https://doi.org/10.1253/CIRCJ.CJ-14-0621>.
43. Zhang, F., Miao, Y., Liu, Q., Li, S., and He, J. (2020) Changes of pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophages after peripheral nerve injury, *RSC Adv.*, **10**, 38767-38773, <https://doi.org/10.1039/D0RA06607A>.
44. Su, L., Dong, Y., Wang, Y., Wang, Y., Guan, B., Lu, Y., Wu, J., Wang, X., Li, D., Meng, A., and Fan, F. (2021) Potential role of senescent macrophages in radiation-induced pulmonary fibrosis, *Cell Death Dis.*, **12**, 527, <https://doi.org/10.1038/S41419-021-03811-8>.
45. Sadhu, S., Decker, C., Sansbury, B. E., Marinello, M., Seyfried, A., Howard, J., Mori, M., Hosseini, Z., Arunachalam, T., Finn, A. V., Lamar, J. M., Jourdeuil, D., Guo, L., MacNamara, K. C., Spite, M., and Fredman, G. (2021) Radiation-induced macrophage senescence impairs resolution programs and drives cardiovascular inflammation, *J. Immunol.*, **207**, 1812-1823, <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.2100284>.
46. De Maeyer, R. P. H., and Chambers, E. S. (2021) The impact of ageing on monocytes and macrophages, *Immunol. Lett.*, **230**, 1-10, <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2020.12.003>.
47. Seegren, P. V., Harper, L. R., Downs, T. K., Zhao, X. Y., Viswanathan, S. B., Stremska, M. E., Olson, R. J., Kennedy, J., Ewald, S. E., Kumar, P., and Desai, B. N. (2023) Reduced mitochondrial calcium uptake in macrophages is a major driver of inflammaging, *Nat. Aging*, **3**, 796-812, <https://doi.org/10.1038/S43587-023-00436-8>.
48. Wang, B., Wang, L., Gasek, N. S., Zhou, Y., Kim, T., Guo, C., Jellison, E. R., Haynes, L., Yadav, S., Tchkonja, T., Kuchel, G. A., Kirkland, J. L., and Xu, M. (2021) An inducible p21-Cre mouse model to monitor and manipulate p21-highly-expressing senescent cells *in vivo*, *Nat. Aging*, **1**, 962-973, <https://doi.org/10.1038/S43587-021-00107-6>.
49. Hall, B. M., Balan, V., Gleiberman, A. S., Strom, E., Krasnov, P., Virtuoso, L. P., Rydkina, E., Vujcic, S., Balan, K., Gitlin, I., Leonova, K., Polinsky, A., Chernova, O. B., and Gudkov, A. V. (2016) Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells, *Aging*, **8**, 1294-1315, <https://doi.org/10.18632/AGING.100991>.
50. Liu, J. Y., Souroullas, G. P., Diekman, B. O., Krishnamurthy, J., Hall, B. M., Sorrentino, J. A., Parker, J. S., Sessions, G. A., Gudkov, A. V., and Sharpless, N. E. (2019) Cells exhibiting strong p16INK4a promoter activation *in vivo* display features of senescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2603-2611, <https://doi.org/10.1073/PNAS.1818313116>.
51. Yousefzadeh, M. J., Flores, R. R., Zhu, Y., Schmiechen, Z. C., Brooks, R. W., Trussoni, C. E., Cui, Y., Angelini, L., Lee, K. A., McGowan, S. J., Burrack, A. L., Wang, D., Dong, Q., Lu, A., Sano, T., O'Kelly, R. D., McGuckian, C. A., Kato, J. I., Bank, M. P., Wade, E. A., Pillai, S. P. S., Klug, J., Ladiges, W. C., Burd, C. E., Lewis, S. E., LaRusso, N. F., Vo, N. V., Wang, Y., Kelley, E. E., Huard, J., Stromnes, I. M., Robbins, P. D., and Niedernhofer, L. J. (2021) An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs, *Nature*, **594**, 100-105, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03547-7>.
52. Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., and Sambhara, S. (2002) Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging, *J. Immunol.*, **169**, 4697-4701, <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.9.4697>.
53. Wada, H., Otsuka, R., Germeraad, W. T. V., Murata, T., Kondo, T., and Seino, K. I. (2023) Tumor cell-induced macrophage senescence plays a pivotal role in tumor initiation followed by stable growth in immunocompetent condition, *J. Immunother. Cancer*, **11**, e006677, <https://doi.org/10.1136/JITC-2023-006677>.
54. Li, X., Li, C., Zhang, W., Wang, Y., Qian, P., and Huang, H. (2023) Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **8**, 239, <https://doi.org/10.1038/S41392-023-01502-8>.
55. Moss, C. E., Phipps, H., Wilson, H. L., and Kiss-Toth, E. (2023) Markers of the ageing macrophage: a systematic review and meta-analysis, *Front. Immunol.*, **14**, 1222308, <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1222308>.
56. Guo, Z., Song, J., Hao, J., Zhao, H., Du, X., Li, E., Kuang, Y., Yang, F., Wang, W., Deng, J., and Wang, Q. (2019) M2 macrophages promote NSCLC metastasis by upregulating CRYAB, *Cell Death Disease*, **10**, 377, <https://doi.org/10.1038/S41419-019-1618-X>.
57. Cao, L., Che, X., Qiu, X., Li, Z., Yang, B., Wang, S., Hou, K., Fan, Y., Qu, X., and Liu, Y. (2019) M2 macrophage infiltration into tumor islets leads to poor prognosis in non-small-cell lung cancer, *Cancer Manag. Res.*, **11**, 6125-6138, <https://doi.org/10.2147/CMAR.S199832>.

58. Hojnik, M., Šuster, N. K., Smrkolj, Š., Sisinger, D., Grazio, S. F., Verdenik, I., and Rižner, T. L. (2022) AKR1B1 as a prognostic biomarker of high-grade serous ovarian cancer, *Cancers*, **14**, 809, <https://doi.org/10.3390/cancers14030809>.
59. Yamaguchi, Y., Kaida, K., Suenaga, Y., Ishigami, A., Kobayashi, Y., and Nagata, K. (2020) Age-related dysfunction of p53-regulated phagocytic activity in macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **529**, 462-466, <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2020.05.121>.
60. Fan, Y., Cheng, J., Zeng, H., and Shao, L. (2020) Senescent cell depletion through targeting BCL-family proteins and mitochondria, *Front. Physiol.*, **11**, 593630, <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.593630>.
61. Burd, C. E., Sorrentino, J. A., Clark, K. S., Darr, D. B., Krishnamurthy, J., Deal, A. M., Bardeesy, N., Castrillon, D. H., Beach, D. H., and Sharpless, N. E. (2013) Monitoring tumorigenesis and senescence *in vivo* with a p16(INK4a)-luciferase model, *Cell*, **152**, 340-351, <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.12.010>.
62. Grosse, L., Wagner, N., Emelyanov, A., Molina, C., Lacas-Gervais, S., Wagner, K. D., and Bulavin, D. V. (2020) Defined p16High senescent cell types are indispensable for mouse healthspan, *Cell Metab.*, **32**, 87-99.e6, <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.05.002>.
63. Wiley, C. D., and Campisi, J. (2021) The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention, *Nat. Metab.*, **3**, 1290-1301, <https://doi.org/10.1038/S42255-021-00483-8>.
64. Marrella, V., Facoetti, A., and Cassani, B. (2022) Cellular senescence in immunity against infections, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 11845, <https://doi.org/10.3390/IJMS231911845>.
65. Van den Bossche, J., Baardman, J., Otto, N. A., van der Velden, S., Neele, A. E., van den Berg, S. M., Luque-Martin, R., Chen, H. J., Boshuizen, M. C., Ahmed, M., Hoeksema, M. A., de Vos, A. F., and de Winther, M. P. (2016) Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages, *Cell Rep.*, **17**, 684-696, <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.09.008>.
66. Van den Bossche, J., O'Neill, L. A., and Menon, D. (2017) Macrophage immunometabolism: where are we (going)? *Trends Immunol.*, **38**, 395-406, <https://doi.org/10.1016/J.IT.2017.03.001>.
67. Shi, Q., Shen, Q., Liu, Y., Shi, Y., Huang, W., Wang, X., Li, Z., Chai, Y., Wang, H., Hu, X., Li, N., Zhang, Q., and Cao, X. (2022) Increased glucose metabolism in TAMs fuels O-GlcNAcylation of lysosomal Cathepsin B to promote cancer metastasis and chemoresistance, *Cancer Cell*, **40**, 1207-1222.e10, <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2022.08.012>.
68. Liu, J., and Cao, X. (2023) Glucose metabolism of TAMs in tumor chemoresistance and metastasis, *Trends Cell Biol.*, **33**, 967-978, <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2023.03.008>.
69. Stabenow, L. K., Zibrova, D., Ender, C., Helbing, D. L., Spengler, K., Marx, C., Wang, Z. Q., and Heller, R. (2022) Oxidative glucose metabolism promotes senescence in vascular endothelial cells, *Cells*, **11**, 2213, <https://doi.org/10.3390/CELLS11142213>.
70. Seo, E., Kang, H., Choi, H., Choi, W., and Jun, H. S. (2019) Reactive oxygen species-induced changes in glucose and lipid metabolism contribute to the accumulation of cholesterol in the liver during aging, *Aging Cell*, **18**, e12895, <https://doi.org/10.1111/ACEL.12895>.
71. Bonnet, L., Alexandersson, I., Baboota, R. K., Kroon, T., Oscarsson, J., Smith, U., and Boucher, J. (2022) Cellular senescence in hepatocytes contributes to metabolic disturbances in NASH, *Front. Endocrinol.*, **13**, 957616, <https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.957616>.
72. Murao, N., Yokoi, N., Takahashi, H., Hayami, T., Minami, Y., and Seino, S. (2022) Increased glycolysis affects β -cell function and identity in aging and diabetes, *Mol. Metab.*, **55**, 101414, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101414>.
73. Murakami, T., Inagaki, N., and Kondoh, H. (2022) Cellular senescence in diabetes mellitus: distinct senotherapeutic strategies for adipose tissue and pancreatic β cells, *Front. Endocrinol.*, **13**, 869414, <https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.869414>.
74. Poisa-Beiro, L., Landry, J. J. M., Raffel, S., Tanaka, M., Zaugg, J., Gavin, A. C., and Ho, A. D. (2022) Glucose metabolism and aging of hematopoietic stem and progenitor cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3028, <https://doi.org/10.3390/IJMS23063028>.
75. Lee, J. C., Kim, G. C., Lee, N. K., Kim, S. W., Cho, Y. S., Chung, S. W., Lee, Y. S., Chang, H. W., Byun, Y., and Kim, S. Y. (2022) Feedback amplification of senolysis using caspase-3-cleavable peptide-doxorubicin conjugate and 2DG, *J. Controll. Rel.*, **346**, 158-168, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.04.012>.
76. Camacho-Pereira, J., Tarragó, M. G., Chini, C. C. S., Nin, V., Escande, C., Warner, G. M., Puranik, A. S., Schoon, R. A., Reid, J. M., Galina, A., and Chini, E. N. (2016) CD38 dictates age-related NAD decline and mitochondrial dysfunction through an SIRT3-dependent mechanism, *Cell Metab.*, **23**, 1127-1139, <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2016.05.006>.
77. Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P. E., Zhou, X., Li, C., Shen, G., and Zou, B. (2020) NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential, *Signal Transduct. Targeted Ther.*, **5**, 227, <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00311-7>.
78. Gomes, A. P., Price, N. L., Ling, A. J. Y., Moslehi, J. J., Montgomery, M. K., Rajman, L., White, J. P., Teodoro, J. S., Wrann, C. D., Hubbard, B. P., Mercken, E. M., Palmeira, C. M., de Cabo, R., Rolo, A. P., Turner, N., Bell, E. L., and Sinclair, D. A.

- (2013) Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging, *Cell*, **155**, 1624-1638, <https://doi.org/10.1016/j.CELL.2013.11.037>.
79. Du, Y., Dai, Q., Zhang, H., Li, Q., Song, K., Fu, Y., Min, W., Liu, Z., and Li, R. (2019) CD38 deficiency downregulates the onset and pathogenesis of collagen-induced arthritis through the NF- κ B pathway, *J. Immunol. Res.*, 7026067, <https://doi.org/10.1155/2019/7026067>.
 80. Salminen, A., Kauppinen, A., and Kaarniranta, K. (2012) Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP), *Cell. Signall.*, **24**, 835-845, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.006>.
 81. Vitale, I., Manic, G., Coussens, L. M., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2019) Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment, *Cell Metab.*, **30**, 36-50, <https://doi.org/10.1016/j.CMET.2019.06.001>.
 82. Tedesco, S., Scattolini, V., Albiero, M., Bortolozzi, M., Avogaro, A., Cignarella, A., and Fadini, G. P. (2019) Mitochondrial calcium uptake is instrumental to alternative macrophage polarization and phagocytic activity, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4966, <https://doi.org/10.3390/IJMS20194966>.
 83. Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., Saltness, R. A., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., and van Deursen, J. M. (2016) Naturally occurring p16 (Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan, *Nature*, **530**, 184-189, <https://doi.org/10.1038/nature16932>.
 84. Hickson, L. T. J., Langhi Prata, L. G. P., Bobart, S. A., Evans, T. K., Giorgadze, N., Hashmi, S. K., Herrmann, S. M., Jensen, M. D., Jia, Q., Jordan, K. L., Kellogg, T. A., Khosla, S., Koerber, D. M., Lagnado, A. B., Lawson, D. K., LeBrasseur, N. K., Lerman, L. O., McDonald, K. M., McKenzie, T. J., Passos, J. F., Pignolo, R. J., Pirtskhalava, T., Saadiq, I. M., Schaefer, K. K., Textor, S. C., Vitorcelli, S. G., Volkman, T. L., Xue, A., Wentworth, M. A., Wissler Gerdes, E. O., Zhu, Y., Tchkonja, T., and Kirkland, J. L. (2019) Senolytics decrease senescent cells in humans: preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease, *EBioMedicine*, **47**, 446-456, <https://doi.org/10.1016/j.EBIOM.2019.08.069>.
 85. Cao, H., Jia, Q., Yan, L., Chen, C., Xing, S., and Shen, D. (2019) Quercetin suppresses the progression of atherosclerosis by regulating MST1-mediated autophagy in ox-LDL-induced RAW264.7 macrophage foam cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 6093, <https://doi.org/10.3390/IJMS20236093>.
 86. Su, W., Hu, Y., Fan, X., and Xie, J. (2023) Clearance of senescent cells by navitoclax (ABT263) rejuvenates UHMWPE-induced osteolysis, *Int. Immunopharmacol.*, **115**, 109694, <https://doi.org/10.1016/j.INTIMP.2023.109694>.
 87. Ramsey, H. E., Gorska, A. E., Smith, B. N., Monteith, A. J., Fuller, L., Arrate, M. P., and Savona, M. R. (2023) TLR3 agonism augments CD47 inhibition in acute myeloid leukemia, *Haematologica*, <https://doi.org/10.3324/haematol.2023.283850>.
 88. Liu, L., Yue, X., Sun, Z., Hambright, W. S., Feng, Q., Cui, Y., Huard, J., Robbins, P. D., Wang, Z., and Mu, X. (2022) Senolytic elimination of senescent macrophages restores muscle stem cell function in severely dystrophic muscle, *Aging*, **14**, 7650-7661, <https://doi.org/10.18632/aging.204275>.
 89. Zhao, J., Zhang, L., Mu, X., Doebelin, C., Doebelin, C., Nguyen, W., Wallace, C., Reay, D. P., McGowan, S. J., Corbo, L., Clemens, P. R., Wilson, G. M., Watkins, S. C., Solt, L. A., Cameron, M. D., Huard, J., Niedernhofer, L. J., Kamenecka, T. M., and Robbins, P. D. (2018) Development of novel NEMO-binding domain mimetics for inhibiting IKK/NF- κ B activation, *PLoS Biol.*, **16**, e2004663, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2004663>.
 90. Zhang, L., Zhao, J., Mu, X., McGowan, S. J., Angelini, L., O'Kelly, R. D., Yousefzadeh, M. J., Sakamoto, A., Aversa, Z., LeBrasseur, N. K., Suh, Y., Huard, J., Kamenecka, T. M., Niedernhofer, L. J., and Robbins, P. D. (2021) Novel small molecule inhibition of IKK/NF- κ B activation reduces markers of senescence and improves healthspan in mouse models of aging, *Aging Cell*, **20**, e13486, <https://doi.org/10.1111/ACEL.13486>.
 91. Ji, X., Du, W., Che, W., Wang, L., and Zhao, L. (2023) Apigenin inhibits the progression of osteoarthritis by mediating macrophage polarization, *Molecules*, **28**, 2915, <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28072915>.
 92. Perrott, K. M., Wiley, C. D., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2017) Apigenin suppresses the senescence-associated secretory phenotype and paracrine effects on breast cancer cells, *GeroScience*, **39**, 161-173, <https://doi.org/10.1007/S11357-017-9970-1>.
 93. Deryabin, P. I., Shatrova, A. N., and Borodkina, A. V. (2021) Apoptosis resistance of senescent cells is an intrinsic barrier for senolysis induced by cardiac glycosides, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 7757-7776, <https://doi.org/10.1007/S00018-021-03980-X>.
 94. Triana-Martínez, F., Picallos-Rabina, P., Da Silva-Álvarez, S., Pietrocola, F., Llanos, S., Rodilla, V., Soprano, E., Pedrosa, P., Ferreirós, A., Barradas, M., Hernández-González, F., Lalinde, M., Prats, N., Bernadó, C., González, P., Gómez, M., Ikonomopoulou, M. P., Fernández-Marcos, P. J., García-Caballero, T., Del Pino, P., Arribas, J., Vidal, A., González-Barcia, M., Serrano, M., Loza, M. I., Domínguez, E., and Collado, M. (2019) Identification and characterization of Cardiac Glycosides as senolytic compounds, *Nat. Commun.*, **10**, 4731, <https://doi.org/10.1038/S41467-019-12888-X>.
 95. Yu, Z., Li, Y., Li, Y., Zhang, J., Li, M., Ji, L., Tang, Y., Zheng, Y., Sheng, J., Han, Q., Li, F., Guo, J., Wang, L., Sun, X., Gao, Y., and Feng, H. (2022) Bufalin stimulates antitumor immune response by driving tumor-infiltrating macrophage

- toward M1 phenotype in hepatocellular carcinoma, *J. Immunother. Cancer*, **10**, e004297, <https://doi.org/10.1136/JITC-2021-004297>.
96. Chen, Y. J., Li, G. N., Li, X. J., Wei, L. X., Fu, M. J., Cheng, Z. L., Yang, Z., Zhu, G. Q., Wang, X. D., Zhang, C., Zhang, J. Y., Sun, Y. P., Saiyin, H., Zhang, J., Liu, W. R., Zhu, W. W., Guan, K. L., Xiong, Y., Yang, Y., Ye, D., and Chen, L. L. (2023) Targeting IRG1 reverses the immunosuppressive function of tumor-associated macrophages and enhances cancer immunotherapy, *Sci. Adv.*, **9**, eadg0654, <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADG0654>.
97. Liu, Q., Yang, C., Wang, S., Shi, D., Wei, C., Song, J., Lin, X., Dou, R., Bai, J., Xiang, Z., Huang, S., Liu, K., and Xiong, B. (2020) Wnt5a-induced M2 polarization of tumor-associated macrophages via IL-10 promotes colorectal cancer progression, *Cell Commun. Signal.*, **18**, 51, <https://doi.org/10.1186/S12964-020-00557-2>.
98. Binnewies, M., Pollack, J. L., Rudolph, J., Dash, S., Abushawish, M., Lee, T., Jahchan, N. S., Canaday, P., Lu, E., Norng, M., Mankikar, S., Liu, V. M., Du, X., Chen, A., Mehta, R., Palmer, R., Juric, V., Liang, L., Baker, K. P., Reyno, L., Krummel, M. F., Streuli, M., and Sriram, V. (2021) Targeting TREM2 on tumor-associated macrophages enhances immunotherapy, *Cell Rep.*, **37**, 109844, <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.109844>.
99. Wang, Q., Bergholz, J. S., Ding, L., Lin, Z., Kabraji, S. K., Hughes, M. E., He, X., Xie, S., Jiang, T., Wang, W., Zoeller, J. J., Kim, H. J., Roberts, T. M., Konstantinopoulos, P. A., Matulonis, U. A., Dillon, D. A., Winer, E. P., Lin, N. U., and Zhao, J. J. (2022) STING agonism reprograms tumor-associated macrophages and overcomes resistance to PARP inhibition in BRCA1-deficient models of breast cancer, *Nat. Commun.*, **13**, 3022, <https://doi.org/10.1038/S41467-022-30568-1>.
100. Yang, H., Zhang, Q., Xu, M., Wang, L., Chen, X., Feng, Y., Li, Y., Zhang, X., Cui, W., and Jia, X. (2020) CCL2-CCR2 axis recruits tumor associated macrophages to induce immune evasion through PD-1 signaling in esophageal carcinogenesis, *Mol. Cancer*, **19**, 41, <https://doi.org/10.1186/S12943-020-01165-X>.
101. Jiang, Y., Han, Q., Zhao, H., and Zhang, J. (2021) Promotion of epithelial-mesenchymal transformation by hepatocellular carcinoma-educated macrophages through Wnt2b/ β -catenin/c-Myc signaling and reprogramming glycolysis, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **40**, 13, <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01808-3>.
102. Benner, B., Scarberry, L., Suarez-Kelly, L. P., Duggan, M. C., Campbell, A. R., Smith, E., Lapurga, G., Jiang, K., Butchar, J. P., Tridandapani, S., Howard, J. H., Baiocchi, R. A., Mace, T. A., and Carson, W. E. (2019) Generation of monocyte-derived tumor-associated macrophages using tumor-conditioned media provides a novel method to study tumor-associated macrophages *in vitro*, *J. Immunother. Cancer*, **7**, 140, <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0622-0>.
103. Jeannin, P., Paolini, L., Adam, C., and Delneste, Y. (2018) The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages, *FEBS J.*, **285**, 680-699, <https://doi.org/10.1111/febs.14343>.
104. Erukashvily, N. I., Ponomartsev, N. V., Ketkar, A., Suezov, R., Chubar, A. V., Prjibelski, A. D., Shafranskaya, D. D., Elmshäuser, S., Keber, C. U., Stefanova, V. N., Akopov, A. L., Klingmüller, U., Pfefferle, P. I., Stiewe, T., Lauth, M., and Brichkina, A. I. (2023) Pericentromeric satellite lncRNAs are induced in cancer-associated fibroblasts and regulate their functions in lung tumorigenesis, *Cell Death Dis.*, **14**, 19, <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05553-1>.
105. Heap, R. E., Marín-Rubio, J. L., Peltier, J., Heunis, T., Dannoura, A., Moore, A., and Trost, M. (2021) Proteomics characterisation of the L929 cell supernatant and its role in BMDM differentiation, *Life Sci. Alliance*, **4**, e202000957, <https://doi.org/10.26508/LSA.202000957>.
106. De Brito Monteiro, L., Davanzo, G. G., de Aguiar, C. F., Corrêa da Silva, F., Andrade, J. R., Campos Codo A., Silva Pereira, J. A. D., Freitas, L. P., and Moraes-Vieira, P. M. (2020) M-CSF- and L929-derived macrophages present distinct metabolic profiles with similar inflammatory outcomes, *Immunobiology*, **225**, 151935, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.151935>.
107. Xu, N.-Y., Li, J., Wang, M. L., Chen, X. Y., Tang, R., and Liu, X. Q. (2024) Fabrication of a coculture organoid model in the biomimetic matrix of alginate to investigate breast cancer progression in a TAMs-leading immune microenvironment, *ACS Appl. Mater. Interf.*, **16**, 11275-11288, <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.3C17863>.
108. Tashireva, L. A., Kalinchuk, A. Y., Gerashchenko, T. S., Menyailo, M., Khozyainova, A., Denisov, E. V., and Perelmuter, V. M. (2023) Spatial profile of tumor microenvironment in PD-L1-negative and PD-L1-positive triple-negative breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1433, <https://doi.org/10.3390/IJMS24021433>.
109. Mei, Y., Xiao, W., Hu, H., Lu, G., Chen, L., Sun, Z., Lü, M., Ma, W., Jiang, T., Gao, Y., Li, L., Chen, G., Wang, Z., Li, H., Wu, D., Zhou, P., Leng, Q., and Jia, G. (2021) Single-cell analyses reveal suppressive tumor microenvironment of human colorectal cancer, *Clin. Translat. Med.*, **11**, e422, <https://doi.org/10.1002/CTM2.422>.
110. Krishna, C., DiNatale, R. G., Kuo, F., Srivastava, R. M., Vuong, L., Chowell, D., Gupta, S., Vanderbilt, C., Purohit, T. A., Liu, M., Kansler, E., Nixon, B. G., Chen, Y. B., Makarov, V., Blum, K. A., Attalla, K., Weng, S., Salmans, M. L., Golkaram, M., Liu, L., Zhang, S., Vijayaraghavan, R., Pawlowski, T., Reuter, V., Carlo, M. I., Voss, M. H., Coleman, J., Russo, P., Motzer, R. J., Li, M. O., Leslie, C. S., Chan, T. A., and Hakimi, A. A. (2021) Single-cell sequencing links multi-regional immune landscapes and tissue-resident T cells in ccRCC to tumor topology and therapy efficacy, *Cancer Cell*, **39**, 662-677.e6, <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2021.03.007>.
111. Yang, Q., Zhang, H., Wei, T., Lin, A., Sun, Y., Luo, P., and Zhang, J. (2021) Single-cell RNA sequencing reveals the heterogeneity of tumor-associated macrophage in non-small cell lung cancer and differences between sexes, *Front. Immunol.*, **12**, 756722, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.756722>.

112. Stanczak, M. A., Mantuano, N. R., Kirchhammer, N., Sanin, D. E., Jacob, F., Coelho, R., Everest-Dass, A. V., Wang, J., Trefny, M. P., Monaco, G., Bärenwaldt, A., Gray, M. A., Petrone, A., Kashyap, A. S., Glatz, K., Kasenda, B., Normington, K., Broderick, J., Peng, L., Pearce, O. M. T., Pearce, E. L., Bertozzi, C. R., Zippelius, A., and Läubli, H. (2022) Targeting cancer glycosylation repolarizes tumor-associated macrophages allowing effective immune checkpoint blockade, *Sci. Translat. Med.*, **14**, eabj1270, <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABJ1270>.
113. Grigorash, B. B., van Essen, D., Liang, G., Grosse, L., Emelyanov, A., Kang, Z., Korablev, A., Kanzler, B., Molina, C., Lopez, E., Demidov, O. N., Garrido, C., Liu, F., Sacconi, S., and Bulavin, D. V. (2023) p16^{High} senescence restricts cellular plasticity during somatic cell reprogramming, *Nat. Cell Biol.*, **25**, 1265-1278, <https://doi.org/10.1038/S41556-023-01214-9>.
114. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M. E., Hoeijmakers, J. H., de Bruin, A., Hara, E., and Campisi, J. (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA, *Dev. Cell*, **31**, 722-733, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>.
115. Omori, S., Wang, T. W., Johmura, Y., Kanai, T., Nakano, Y., Kido, T., Susaki, E. A., Nakajima, T., Shichino, S., Ueha, S., Ozawa, M., Yokote, K., Kumamoto, S., Nishiyama, A., Sakamoto, T., Yamaguchi, K., Hatakeyama, S., Shimizu, E., Katayama, K., Yamada, Y., Yamazaki, S., Iwasaki, K., Miyoshi, C., Funato, H., Yanagisawa, M., Ueno, H., Imoto, S., Furukawa, Y., Yoshida, N., Matsushima, K., Ueda, H. R., Miyajima, A., and Nakanishi, M. (2020) Generation of a p16 reporter mouse and its use to characterize and target p16^{high} cells *in vivo*, *Cell Metab.*, **32**, 814-828.e6, <https://doi.org/10.1016/j.CMET.2020.09.006>.
116. Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., Kirkland, J. L., and van Deursen, J. M. (2011) Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders, *Nature*, **479**, 232-236, <https://doi.org/10.1038/nature10600>.

TUMOR-ASSOCIATED SENESCENT MACROPHAGES, THEIR MARKERS AND THEIR ROLE IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT

Review

T. V. Pukhalskaia^{1,2,3}, T. R. Yrakova², D. A. Bogdanova^{1,3}, and O. N. Demidov^{1,3,4*}

¹ Sirius University of Science and Technology, 354340 Federal Territory Sirius, Sirius Russia

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

³ Institute of Cytology RAS, 194064 St. Petersburg, Russia

⁴ Inserm UMR1231, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France; e-mail: Oleg.Demidov@u-bourgogne.fr

Tumor-associated macrophages (TAMs) are an important component of the tumor microenvironment (TME) and the most abundant population of immune cells infiltrating a tumor. TAMs can largely determine the direction of the anti-tumor immune response. TAMs can promote it or, conversely, contribute to the formation of an immunosuppressive TME that allows tumors to evade immune control. Through interactions with tumor cells or other cells in the microenvironment, and as a result of the action of anti-cancer therapy, macrophages can enter senescence. In this review, we have attempted to summarize the information available in the literature on the role of senescent macrophages in tumors. With the recent development of senolytic therapeutic strategies aimed at removing senescent cells from the organism. It seems important to discuss the functions of senescent macrophages and the potential role of senolytic drugs in reprogramming TAMs to enhance the anti-tumor immune response and improve the efficacy of cancer treatment.

Keywords: senescent cells, p16^{INK4}, p21^{cip1}, CD206, CXCR1, tumor microenvironment, immunosuppression

ОБРАТНАЯ ГЕНЕТИКА В ПРИЛОЖЕНИИ К ИММУНОБИОЛОГИИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО ЦИТОКИНА

Мини-обзор

© 2024 С.А. Недоспасов^{1,2*}, А.А. Круглов³, А.В. Туманов⁴, М.С. Друцкая^{1,2},
И.В. Астраханцева¹, Д.В. Купраш²

¹ АНОО ВО Научно-технологический университет Сириус, отдел иммунобиологии и биомедицины, 354340 Федеральная территория Сириус, Россия; электронная почта: sergei.nedospasov@gmail.com

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, 119991 Москва, Россия

³ Немецкий исследовательский центр ревматизма (DRFZ), Институт Лейбница, отделение системной ревматологии, 10117 Берлин, Германия

⁴ Техасский университет в Сан-Антонио, Центр наук о здоровье, отдел микробиологии, иммунологии и молекулярной генетики, 79229 Сан-Антонио, Техас, США

Поступила в редакцию 21.11.2023

После доработки 28.12.2023

Принята к публикации 19.02.2024

Фактор некроза опухолей (TNF) – один из многих цитокинов, белковых молекул, осуществляющих коммуникацию между клетками иммунной системы. TNF был открыт и получил свое громкое название благодаря яркому противоопухолевому эффекту в конкретной экспериментальной системе, однако оказалось, что его главные физиологические функции в контексте целого организма вовсе не связаны с защитой от опухолей. В этом небольшом обзоре обсуждаются результаты, полученные с помощью «рукотворных» мышинных моделей, созданных с помощью ранних технологий редактирования генома и позволивших установить истинные функции TNF в норме и при некоторых патологиях, а также перспективы совершенствования терапии TNF-зависимых заболеваний, которые открываются на основе этих знаний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фактор некроза опухолей, TNF, кондиционные мышинные модели, генетический нокаут, репортерные мыши, сверхэкспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0320972524050069 EDN: YOYRUH

ВВЕДЕНИЕ

Почти 50 лет назад Ллойд Олд и его коллеги сообщили об интересном эксперименте, направленном на изучение противоопухолевого действия бактериального эндотоксина и других веществ, которые позже станут известны как активаторы рецепторов врожденного иммунитета [1]. Было обнаружено, что комбинация инфекции вакцинным штаммом микобактерий БЦЖ с последующей инъекцией липополисахарида (ЛПС) кишечной

палочки приводит к появлению в сыворотке крови неизвестного «фактора» с яркой противоопухолевой активностью, названного фактором некроза опухолей или Tumor Necrosis Factor (TNF) [2]. Это открытие было воспринято как дальнейшее развитие идей Уильяма Коли, который еще в начале XX века указал на возможность использования живых бактерий или бактериальных лизатов для терапии некоторых опухолей [3]. Последующие исследования показали, что TNF имеет белковую природу, и что он может продуцироваться клетками иммунной системы в ответ на различные стимулы, в том числе миелоидными клетками, в ответ на ЛПС. Молекулярное клонирование и гетерологичная экспрессия генов *Tnf* человека и мыши позволили связать противоопухолевую активность

Принятые сокращения: ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; LT – лимфотоксин; TNF – фактор некроза опухолей; UTR – нетранслируемая область.

* Адресат для корреспонденции.

с действием одного-единственного белка, который попадал под определение «цитокина» – быстро-растущего суперсемейства белковых медиаторов коммуникаций между клетками. Введение мышам рекомбинантного TNF, продуцированного в *Escherichia coli*, полностью воспроизводило противоопухолевую активность природного TNF [4], причем при больших дозах у мышей проявлялась токсичность, связанная с острой воспалительной реакцией (в экспериментах Л. Олда токсичности не наблюдалось [2], вероятно, вследствие невозможности достичь таких же высоких концентраций, как в опытах с рекомбинантным TNF).

TNF имеет молекулярную массу 17 кДа, но для реализации его физиологических (в том числе противоопухолевых) функций он должен образовать гомотример, который является высокоаффинным лигандом для двух разных рецепторов: TNFR1 (p55) и TNFR2 (p75) [5]. Эти рецепторы различаются как по типу передаваемого внутриклеточного сигнала, так и по паттернам тканеспецифичной экспрессии.

После молекулярного описания TNF и его рецепторов в 80-е гг. прошлого века довольно быстро были открыты другие члены больших семейств TNF-подобных цитокинов (большая часть которых являются мембраносвязанными молекулами) и TNFR-подобных рецепторов, которые способны передавать несколько типов внутриклеточных сигналов, что и определяет биологическую активность лигандов этого семейства [6]. Были опубликованы сотни статей, описывающих активность TNF в различных ситуациях *in vitro* и *in vivo*, однако физиологическая функция TNF в контексте целого организма была установлена в 90-е гг. в основном благодаря двум стратегиям обратной генетики, одна из которых заключается в создании мышей с нокаутом гена *Tnf*, а другая – в получении трансгенных мышей с его сверхэкспрессией. Кроме того, несколько интересных линий мышей были получены методами прямой генетики. Ниже будут обсуждены многочисленные мышинные модели, независимо созданные и охарактеризованные в различных лабораториях, а также так называемые «репортерные» мыши, которые являются дополнительными инструментами для исследования иммунологии и физиологии этого интересного цитокина.

МЫШИ С ПОЛНЫМ, ЧАСТИЧНЫМ ИЛИ РЕГУЛИРУЕМЫМ ГЕНЕТИЧЕСКИМ ДЕФИЦИТОМ TNF

Нокаутные технологии, появившиеся до эпохи геномных нуклеаз и получившие свое распространение в 80-х гг. прошлого столетия, основывались

на таргетировании генов в линиях эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши (для других животных подобные линии были созданы значительно позже). Низкая эффективность процедуры в мышинных ЭСК приводила к необходимости отбора нокаутных клонов на антибиотике (обычно на неомицине), в результате чего экспрессионная кассета, содержащая ген устойчивости (так называемая «нео-кассета»), навсегда оставалась в составе таргетированного локуса и могла оказывать влияние на активность близлежащих генов. Примечательно, что с момента клонирования гена *Tnf* мыши до создания первых нокаутных по гену *Tnf* мышей прошло целых 10 лет. Не менее четырех лабораторий почти одновременно и независимо создали таких мышей (табл. 1), но пальма первенства однозначно досталась лаборатории Дж. Коллиаса в Греции. При создании мышей с нокаутом гена *Tnf* необходимо было принимать в расчет две его важные особенности. Во-первых, ген *Tnf* находится очень близко к родственным генам лимфотоксинов *Lta* и *Ltβ* [7], поэтому комбинированные нокауты *Tnf/Lt* невозможно получить скрещиванием мышей с одиночными нокаутами. Во-вторых, локус *Tnf/Lt* находится внутри главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) [7], поэтому выведение конгенных линий мышей с модификациями гена *Tnf* и нужными аллелями генов ГКГ весьма затруднено, и при конструировании нокаутных мышей следует обращать особенное внимание на генетическую основу ЭСК и линий мышей, используемых для последующего возвратного скрещивания.

В статье Pasparakis et al. [8] были описаны новые функции TNF, связанные с его ролью в структурно-функциональной организации лимфоидной ткани, о чем первооткрыватели TNF и не догадывались. Здесь следует разъяснить, что в течение 10 лет родственный цитокин, LTα, рассматривался как функциональный аналог TNF, который продуцировался не миелоидными, а лимфоидными клетками. Этот взгляд на лимфотоксин поддерживался тем фактом, что у рекомбинантного белка наблюдалась сходная с TNF противоопухолевая активность на модели перевиваемой саркомы у мышей, а также в культуре клеток, чувствительных к цитотоксическому действию TNF [20]. Эти результаты указывали на возможную вырожденность функций TNF и LTα, что делало интересным и практичным конструирование двойного нокаута обоих генов. В табл. 1 приведены некоторые линии мышей с такими двойными нокаутами. Отметим, что ранее реальную сенсацию принес фенотип нокаута по гену лимфотоксина [21] – у мышей полностью отсутствовали периферические лимфоидные органы, кроме селезенки. Дальнейшее сравнение фенотипов нокаутных мышей позволило разграничить функции TNF и лимфотоксина, например,

Таблица 1. Мышиные модели с дефицитом TNF

Генотип <i>Tnf/Lt</i> локуса	Описание	Ссылки
Мыши с полным генетическим нокаутом TNF, полученные методами обратной генетики		
<i>Tnf</i> ^{-/-}	полный нокаут, созданный таргетированием в ЭСК линии ЕК.ССЕ из мышей линии 129/Sv, с одним возвратным скрещиванием на C57BL/6	[8]
<i>Tnf</i> ^{-/-}	полный нокаут, созданный таргетированием в ЭСК линии W9.5 из мышей линии 129/Sv, с одним возвратным скрещиванием на C57BL/6	[9]
<i>Tnf</i> ^{-/-}	полный нокаут, созданный таргетированием в ЭСК из гибрида первого поколения линий мышей C57BL/6 и CBA, с отбором нокаута гена <i>Tnf</i> в гаплотипе C57BL/6 и 5 раундами возвратного скрещивания на C57BL/6	[10, 11]
<i>Tnf</i> ^{-/-}	полный нокаут, созданный таргетированием в ЭСК линии BL/6-III на генетической основе C57BL/6	[12]
<i>Tnf</i> ^{-/-}	получен из линии мышей, созданной для кондиционного таргетирования TNF на генетической основе 129/Sv, с многократным возвратным скрещиванием на C57BL/6; таргетированный локус не содержит нео-кассеты	[13, 14]
Мышиные модели с комбинированным нокаутом TNF/LT		
<i>Tnf</i> ^{-/-} <i>Lta</i> ^{-/-} (TNF/LTα double KO)	полный нокаут генов <i>Lta</i> и <i>Tnf</i> , созданный таргетированием в ЭСК линии s BL/6-III на генетической основе C57BL/6	[12]
<i>Tnf</i> ^{-/-} <i>Lta</i> ^{-/-} (TNF/LTα double KO)	полный нокаут генов <i>Lta</i> и <i>Tnf</i> , созданный таргетированием в ЭСК из мышей линии 129/Sv, с одним возвратным скрещиванием на C57BL/6	[15]
<i>Tnf</i> ^{-/-} <i>Lta</i> ^{-/-} (TNF/LTα double KO)	полный нокаут генов <i>Lta</i> и <i>Tnf</i> , созданный таргетированием в ЭСК из мышей линии 129/Sv, с одним возвратным скрещиванием на C57BL/6	[16]
<i>Tnf</i> ^{-/-} <i>Ltb</i> ^{-/-} (TNF/LTβ double KO)	полный нокаут генов <i>Ltb</i> и <i>Tnf</i> , созданный таргетированием в ЭСК из мышей линии 129/Sv, с многократным возвратным скрещиванием на C57BL/6	[17]
<i>Tnf</i> ^{-/-} <i>Lta</i> ^{-/-} <i>Ltb</i> ^{-/-} (TNF/LTα/LTβ triple KO)	полный нокаут генов <i>Lta</i> , <i>Tnf</i> и <i>Ltb</i> , созданный таргетированием в ЭСК из мышей линии 129/Sv, с многократным возвратным скрещиванием на C57BL/6	[18]
Гипоморфный аллель гена <i>Tnf</i> , найденный при помощи прямой генетики		
<i>Tnf</i> ^{PanR1/PanR1} , <i>Tnf</i> ^{PanR1/+}	в эксперименте по случайному мутагенезу с N-этил-N-нитрозомочевинной найден доминантно-негативный мутант с аминокислотной заменой P138T в зрелом белке TNF; мутация препятствует связыванию с рецептором TNFR1	[19]
Базовая «платформа» для получения кондиционных делеций гена <i>Tnf</i> в мышах		
<i>Tnf</i> ^{fllox/fllox}	при помощи генетического нокаута в ЭСК из мышей линии 129/Sv, с многократным возвратным скрещиванием на C57BL/6, ген <i>Tnf</i> обрамлен сайтами LoxP («флоксирован»); модификация не влияет на активность гена, но обеспечивает в последующем его удаление рекомбиназой Cre в определенных типах клеток и/или индуцируемо	[14]

как было показано в случае органогенеза Пейеровых бляшек [22], что объясняется передачей сигнала от мембранного лимфотоксического комплекса LTα₁/LTβ₂ [23] через LTβR [24], а небольшой перекрест функций связан с тем, что растворимый лимфотоксин (LTα₃) действительно способен

запускать сигнальный каскад *in vivo* через TNFR1 и TNFR2 [17].

Развитая в начале 1990-х гг. технология кондиционной (тканеспецифичной или индуцируемой) генетической рекомбинации в культуре клеток млекопитающих [25] и затем в клетках трансген-

ных [26, 27] и нокаутных [28–30] мышей, основанная на системе рекомбинации *LoxP/Cre* бактериофага P1, совершила подлинную революцию в биологии. Стало возможным, во-первых, обойти проблему эмбриональной летальности, которая характерна для большого числа генов, даже для тех, для которых невырожденная функция в эмбриогенезе не была известна, а во-вторых, – связать отдельные функции генов и их продуктов с конкретным типом клеток-продуцентов. Эта стратегия оказалась особенно плодотворной для исследования генов, продукты которых проявляют плейотропные функции, что характерно для цитокинов и других регуляторных молекул.

Разработка кондиционной панели линий мышей для гена *Tnf* началась почти 20 лет назад [14], сначала для главных популяций иммунцитов: миелоидных клеток и лимфоцитов. С помощью этих мышинных моделей было установлено, что конкретные гомеостатические или патогенные функции TNF связаны с определенным типом клеток-продуцентов этого цитокина. Так, миелоидные клетки (в первую очередь макрофаги и нейтрофилы) необходимы для защиты от внутриклеточных инфекций и образования гранул, но при этом оказались основными источниками системного TNF при различных патологических состояниях, например, при ЛПС-индуцированной токсичности [14]. С другой стороны, TNF, продуцируемый Т- и В-лимфоцитами, проявляет важные гомеостатические функции, в том числе в организации лимфоидной ткани [31]. Позднее были созданы мыши с конститутивной или индуцируемой делецией гена *Tnf* в дендритных клетках, моноцитах, лимфоцитах [32–34], базофилах, микроглии, тучных клетках [35], клетках эпителия [36, 37], клетках гладких мышц [38, 39] и других. Интересно, что во всех случаях были найдены уникальные фенотипические особенности, связанные с продукцией TNF конкретным клеточным источником.

МЫШИНЫЕ МОДЕЛИ, ОСНОВАННЫЕ НА СВЕРХЭКСПРЕССИИ И/ИЛИ «ГУМАНИЗАЦИИ» TNF

Первая и наиболее известная трансгенная мышинная система, использующая механизм посттранскрипционной регуляции гена *Tnf* [40], подтвердившая гипотезу о связи сверхэкспрессии TNF с развитием артрита [41] и ставшая широко распространенной доклинической моделью для исследования блокаторов TNF, была создана в лаборатории Kollias [42] в 1991 г. Эта модель явилась важным дополнением к клиническим результатам Maini et al. [43] и Feldmann et al. [44] и позволила обосновать анти-TNF-терапию как инновацион-

ную стратегию лечения ревматоидного артрита. В первоначальной работе команды Kollias [42] число трансгенных вставок у мышей составляло несколько десятков, что приводило к проявлению TNF-зависимого полиартрита у всех мышей в возрасте нескольких месяцев. Поэтому к недостаткам этой модели можно отнести раннее развитие только одного вида TNF-зависимого заболевания, что не позволяло моделировать другие аутоиммунные болезни. Позднее, используя ту же генетическую конструкцию, были созданы трансгенные мыши с небольшим числом трансгенных вставок, что позволило «ослабить» патогенный фенотип и расширить спектр применений этой доклинической модели [45] (табл. 2).

Отметим, что в работах Keffer et al. [42] и Hayward et al. [45] ген *Tnf* человека был подвержен сверхэкспрессии, при этом ген *Tnf* мыши не удалялся и мог экспрессироваться, а оба рецептора TNF оставались мышинными. По сути, это были частично «гуманизованные» доклинические модели, позволяющие при лечении экспериментальных TNF-опосредованных патологий использовать блокаторы TNF человека, большинство из которых (за исключением этанерцепта) являются видоспецифичными и не работают в системе с TNF мыши. Более продвинутой моделью «гуманизации» стали мыши, в которых ген *Tnf* человека был вставлен точно на место гена *Tnf* мыши (генетический «нок-ин»), с сохранением всех регуляторных элементов [50]. У этих мышей не наблюдалось никаких аномалий в развитии или микроархитектуре лимфоидной ткани, при этом TNF человека обеспечивал защитные функции при внутриклеточных инфекциях, что указывало на то, что сигналинг *in vivo* через рецептор TNFR1 мыши осуществлялся нормально. С другой стороны, TNF человека не способен эффективно активировать TNFR2 мыши [51], что являлось недостатком этой модели гуманизации. Для целого ряда экспериментальных патологий (артрит, острая гепатотоксичность и другие) такое ограничение модели не является проблемой, поскольку большинство биологических эффектов TNF опосредованы TNFR1. Тем не менее в ряде случаев TNFR2 может играть существенную роль, поэтому для устранения данного ограничения и уточнения роли TNFR2 были разработаны мыши с «гуманизацией» как TNF, так и внеклеточного домена TNFR2 с возможностью кондиционной ин активации TNFR2 [52]. С использованием трансгенных мышей, экспрессирующих рекомбиназу Cre одновременно с FoxP3, было показано, что передача сигнала через TNFR2 в Т-регуляторных клетках вносит вклад в защиту центральной нервной системы в модели аутоиммунной патологии [52]. Еще одна интересная линия содержала модифицированный ген *Tnf*, продукт которого имел аминок-

Таблица 2. Мыши со сверхэкспрессией TNF

Название мышиной модели	Описание	Ссылки
Tgl278	трансгенная линия с геном <i>Tnf</i> человека под контролем сильного промотора, с модификацией 3'-нетранслируемой области (UTR), что приводило к высокой экспрессии TNF человека и вызывало у мышей тяжелый полиартрит; доклиническая модель для изучения эффектов блокаторов TNF <i>in vivo</i>	[42]
B6.Cg-Tg(TNF)#Xen	то же, но с умеренной экспрессией TNF человека; улучшенная доклиническая модель	[45]
BPSM1	линия со спонтанной вставкой ретротранспозона в 3'-UTR <i>Tnf</i> мыши, нарушающей ранее неизвестный механизм посттранскрипционной регуляции; сверхэкспрессия TNF в этой линии мышей приводит не только к тяжелому полиартриту, но и к патологии сердечных клапанов	[46]
TNF ^{del4} , TNF ^{del5} , TNF ^{del6} и их комбинации	панель линий мышей с нарушением трех участков в 3'-UTR гена <i>Tnf</i> мыши, регулирующих стабильность мРНК; показано, что нарушение этой системы может приводить к экстремально высокой продукции TNF, вызывающей гибель некоторых эмбрионов	[47]
TNF ^{ΔARE}	мыши с удалением АТ-богатой области в 3'-UTR гена <i>Tnf</i> мыши при помощи технологии LoxP/Cre; фенотипически похожи на линии Tgl278 и BPSM1, но, помимо артрита, развивают воспаление в подвздошной кишке тонкого кишечника	[48]
Трансгенные мыши с полным <i>Tnf/lta/ltr</i> -локусом человека	все три гена находятся под контролем собственных промоторов/энхансеров; наблюдалась умеренная сверхэкспрессия генов локуса <i>Tnf/Lta/Ltr</i> человека; у мышей происходила кортикальная атрофия тимуса	[49]

кислотные вариации, в результате чего практически не образовывалось растворимого TNF [53]. Эксперименты с этой линией мышей позволили впервые установить, что многие *in vivo* функции TNF опосредованы мембраносвязанной, а не растворимой формой.

Описано несколько мышиных моделей со сверхэкспрессией эндогенного TNF мыши вследствие нарушения участков 3'-UTR гена *Tnf*, отвечающих за стабильность мРНК (табл. 2). У мышей линии BPSM1 в 3'-UTR произошла спонтанная интеграция ретротранспозона [46], вследствие чего развивается тяжелый полиартрит, а также патология сердечных клапанов. В панели линий мышей с комбинаторным повреждением нескольких участков 3'-UTR, участвующих в контроле стабильности мРНК, наблюдается не только полиартрит и патологии сердца, но в некоторых случаях и эмбриональная летальность вследствие чрезвычайно высокой продукции TNF [47]. Все эти участки затронуты Cre/LoxP-опосредованной делецией и в линии TNF^{ΔARE}, созданной в лаборатории Kollias [48] 25 лет назад, поэтому с точки зрения артрита эта модель эквивалентна линии BPSM1 и напоминает линию Tgl278, но с более выраженными признаками системного воспаления.

Учитывая сложность регуляции генов, кодирующих TNF и лимфотоксины, детальное выяснение механизма ускоренной атрофии тимуса у мышей, содержащих в виде трансгенной вставки целый локус *Tnf/Lt* человека (табл. 2), может потребовать дополнительных исследований [49].

«РЕПОРТЕРНЫЕ» МЫШИ – ВАЖНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИЙ TNF

Использование генетических конструкций, кодирующих различные люминесцентные или флуоресцентные белки, существенно расширило возможности детекции и визуализации активности генов *in vitro* и *in vivo* [54]. Трансгенные мыши, у которых экспрессия изучаемого белка сопровождается экспрессией белка-репортера, стали широко распространенным инструментом для подобных исследований [55]. В большинстве случаев при трансгенезе используются бицистронные конструкции, направляющие конститутивную или кондиционную экспрессию изучаемого белка и флуоресцентного белка-репортера. Однако возможны и более сложные конструкции, позволяющие

Таблица 3. Репортерные мыши для визуализации экспрессии TNF

Генетическое название мышинной модели	Описание	Ссылки
TNF-2A-Kat (B6.FRFPK +)	бицистронная экспрессия TNF и флуоресцентного белка Katushka с использованием последовательности вирусного 2A-пептида	[58, 59]
hTNF.LucBAC	рекомбинация клона TNF BAC человека, которая привела к замене экзона 1 гена <i>Tnf</i> геном люциферазы	[60]
FVB/N-Tg(CAG-EGFP-Tnf)1Kul/J	геном мышей с «флоксированной» кассетой <i>eGFP</i> , которая предотвращает транскрипцию кДНК <i>Tnf</i> мыши; TNF экспрессируется только после Cre-опосредованной рекомбинации	[61]

следить за клетками определенного ростка клеточной дифференцировки, причем в ходе дифференцировки свечение одного флуоресцентного белка переключается на свечение другого [56].

Известно несколько вариантов репортерных мышей для исследований TNF (табл. 3). В качестве репортерного белка использовали люциферазу, зеленый флуоресцентный белок GFP и дальнекрасный белок Katushka [57]. Возможность детекции репортерных белков используется не только для цитометрии и гистологической идентификации TNF-продуцирующих клеток, но и для прижизненной визуализации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

TNF оказался удивительно сложным цитокином со множеством функций как в гомеостазе иммунной системы и некоторых неиммунных органов, так и при различных патологиях. Мышинные модели позволили связать как защитные и гомеостатические функции TNF, так и его провоспалительные эффекты, способствующие развитию некоторых патологий, с конкретными типами клеток, продуцирующих TNF. Один вывод, который можно сделать из большого числа работ, обсуждаемых в этом обзоре, состоит в том, что системная блокировка TNF *in vivo* неизбежно будет давать побочные эффекты за счет нейтрализации гомеостатических и защитных функций TNF. Следовательно, если научиться нейтрализовать TNF только из «патоген-

ного» клеточного источника [62], то могут быть реализованы улучшенные терапевтические стратегии для целого ряда TNF-зависимых заболеваний.

Вклад авторов. САН – концепция; САН, ИВА и ДВК – написание текста; ААК, АВТ и МСД – редактирование текста и внесение важных дополнений. Все авторы участвовали в создании или исследовании линий мышей, обсуждаемых в обзоре.

Финансирование. Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ «Развитие биоресурсной коллекции “Коллекция лабораторных грызунов SPF-статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований” ИБХ РАН» (Соглашение 075-15-2021-1067). Изучение фенотипа некоторых генетически-модифицированных линий мышей выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30032).

Благодарности. Авторы благодарны своим коллегам С.И. Гривенникову, Л. Тессаролло, А.А. Кучмий, А.Р. Галимову, С.В. Козлову, И.Р. Муфазалову и Р. Науманну за их вклад в создание и изучение некоторых мышинных моделей, обсуждаемых в этом обзоре.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все манипуляции выполняли в соответствии с руководством Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике ИМБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parr, I., Wheeler, E., and Alexander, P. (1973) Similarities of the anti-tumour actions of endotoxin, lipid A and double-stranded RNA, *Br. J. Cancer*, **27**, 370-389, <https://doi.org/10.1038/bjc.1973.45>.
2. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3666-3670, <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3666>.
3. Coley, W. B. (1910) The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*), *Proc. R. Soc. Med.*, **3**, 1-48.

4. Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., and Goeddel, D. V. (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin, *Nature*, **312**, 724-729, <https://doi.org/10.1038/312724a0>.
5. Brenner, D., Blaser, H., and Mak, T. W. (2015) Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 362-374, <https://doi.org/10.1038/nri3834>.
6. Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies, *Cell*, **104**, 487-501, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9).
7. Недоспасов, С. А., Шахов, А. Н., Турецкая, Р. Л., Метт, В. А., Георгиев, Г. П. (1985) Молекулярное клонирование генов, кодирующих факторы некроза опухолей человека: тандемное расположение альфа и бета генов в коротком сегменте (6 тыс. пар нуклеотидов) генома человека, *Докл. Акад. Наук СССР*, **285**, 1487-1490.
8. Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., and Kollias, G. (1996) Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response, *J. Exp. Med.*, **184**, 1397-1411, <https://doi.org/10.1084/jem.184.4.1397>.
9. Marino, M. W., Dunn, A., Grail, D., Inglese, M., Noguchi, Y., and Richards, E. (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8093-8098, <https://doi.org/10.1073/pnas.94.15.8093>.
10. Taniguchi, T., Takata, M., Ikeda, A., Momotani, E., and Sekikawa, K. (1997) Failure of germinal center formation and impairment of response to endotoxin in tumor necrosis factor alpha-deficient mice, *Lab. Invest.*, **77**, 647-658.
11. Iraqi, F., Sekikawa, K., Rowlands, J., and Teale, A. (2001) Susceptibility of tumour necrosis factor-alpha genetically deficient mice to *Trypanosoma congolense* infection, *Paras. Immunol.*, **23**, 445-451, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00401.x>.
12. Körner, H., Cook, M., and Riminton, D. S. (1997) Distinct roles for lymphotoxin- α and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue, *Eur. J. Immunol.*, **27**, 2600-2609, <https://doi.org/10.1002/eji.1830271020>.
13. Kuprash, D. V., Tumanov, A. V., Liepinsh, D. J., Lemckert, F. A., Hoek, R. M., Ledermann, B., Köntgen, F., De St Groth, B. F., and Sedgwick, J. D. (2005) Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches, *Eur. J. Immunol.*, **35**, 1592-1600, <https://doi.org/10.1002/eji.200526119>.
14. Grivennikov, S. I., Tumanov, A. V., Liepinsh, D. J., Kruglov, A. A., Marakusha, B. I., Shakhov, A. N., Murakami, T., Drutskaya, L. N., Förster, I., Clausen, B. E., Tessarollo, L., Ryffel, B., Kuprash, D. V., and Nedospasov, S. A. (2005) Distinct and nonredundant *in vivo* functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils, *Immunity*, **22**, 93-104, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.11.016>.
15. Eugster, H.-P., Muller, M., Karrer, U., Car, B. D., Schnyder, B., Eng, V. M., Woerly, G., Hir, M. L., Padova, F. D., Aguet, M., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Ryffel, B. (1996) Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin- α double-deficient mice, *Int. Immunol.*, **8**, 23-36, <https://doi.org/10.1093/intimm/8.1.23>.
16. Amiot, F., Bellkaid, Y., Lebastard, M., Ave, P., Dautry, F., and Milon, G. (1996) Abnormal organisation of the splenic marginal zone and the correlated leukocytosis in lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor alpha double deficient mice, *Eur. Cytokine Netw.*, **7**, 733-739.
17. Kuprash, D. V., Alimzhanov, M. B., Tumanov, A. V., Anderson, A. O., Pfeffer, K., and Nedospasov, S. A. (1999) TNF and lymphotoxin beta cooperate in the maintenance of secondary lymphoid tissue microarchitecture but not in the development of lymph nodes, *J. Immunol.*, **15**, 6575-6580.
18. Kuprash, D. V., Alimzhanov, M. B., Tumanov, A. V., Grivennikov, S. I., Shakhov, A. N., Drutskaya, L. N., Marino, M. W., Turetskaya, R. L., Anderson, A. O., Rajewsky, K., Pfeffer, K., and Nedospasov, S. A. (2002) Redundancy in tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) signaling *in vivo*: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice, *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 8626-8634, <https://doi.org/10.1128/MCB.22.24.8626-8634.2002>.
19. Rutschmann, S., Hoebe, K., Zalevsky, J., Du, X., Mann, N., Dahiyat, B. I., Steed, P., and Beutler, B. (2006) PanR1, a dominant negative missense allele of the gene encoding TNF- α (*Tnf*), does not impair lymphoid development, *J. Immunol.*, **176**, 7525-7532, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7525>.
20. Gray, P. W., Aggarwal, B. B., Benton, C. V., Bringman, T. S., Henzel, W. J., Jarrett, J. A., Leung, D. W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L. P., Palladino, M. A., and Nedwin, G. E. (1984) Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity, *Nature*, **312**, 721-724, <https://doi.org/10.1038/312721a0>.
21. De Togni, P., Goellner, J., Ruddle, N. H., Streeter, P. R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S. C., Carlson, R., and Shornick, L. P. (1994) Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin, *Science*, **264**, 703-707, <https://doi.org/10.1126/science.8171322>.
22. Gogleva, V. S., Kuprash, D. V., Grivennikov, S. I., Tumanov, A. V., Kruglov, A. A., and Nedospasov, S. A. (2022) LT α , TNF, and ILC3 in Peyer's patch organogenesis, *Cells*, **11**, 1970, <https://doi.org/10.3390/cells11121970>.

23. Browning, J., Ngam-ek, A., Lawton, P., DeMarinis, J., Tizard, R., Chow, E. P., Hession, C., O'Brine-Greco, B., Foley, S. F., and Ware, C. F. (1993) Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface, *Cell*, **72**, 847-856, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90574-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90574-A).
24. Crowe, P. D., VanArsdale, T. L., Walter, B. N., Ware, C. F., Hession, C., Ehrenfels, B., Browning, J. L., Din, W. S., Goodwin, R. G., and Smith, C. A. (1994) A lymphotoxin- β -specific receptor, *Science*, **264**, 707-710, <https://doi.org/10.1126/science.8171323>.
25. Sauer, B., and Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5166-5170, <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5166>.
26. Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L., and Westphal, H. (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6232-6236, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6232>.
27. Orban, P. C., Chui, D., and Marth, J. D. (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6861-6865, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.6861>.
28. Gu, H., Zou, Y. R., and Rajewsky, K. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting, *Cell*, **73**, 1155-1164, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90644-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90644-6).
29. Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995) Inducible gene targeting in mice, *Science*, **269**, 1427-1429, <https://doi.org/10.1126/science.7660125>.
30. Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting, *Science*, **265**, 103-106, <https://doi.org/10.1126/science.8016642>.
31. Tumanov, A. V., Grivennikov, S. I., Kruglov, A. A., Shebzukhov, Y. V., Koroleva, E. P., Piao, Y., Cui, C.-Y., Kuprash, D. V., and Nedospasov, S. A. (2010) Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs, *Blood*, **116**, 3456-3464, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-249177>.
32. Wolf, Y., Shemer, A., Polonsky, M., Gross, M., Mildner, A., Yona, S., David, E., Kim, K.-W., Goldmann, T., Amit, I., Heikenwalder, M., Nedospasov, S., Prinz, M., Friedman, N., and Jung, S. (2017) Autonomous TNF is critical for *in vivo* monocyte survival in steady state and inflammation, *J. Exp. Med.*, **214**, 905-917, <https://doi.org/10.1084/jem.20160499>.
33. Kruglov, A., Drutskaya, M., Schlienz, D., Gorshkova, E., Kurz, K., Morawietz, L., and Nedospasov, S. (2020) Contrasting contributions of TNF from distinct cellular sources in arthritis, *Ann. Rheum. Dis.*, **79**, 1453-1459, <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216068>.
34. Wen, Y., Rudemiller, N. P., Zhang, J., Robinette, T., Lu, X., Ren, J., Privratsky, J. R., Nedospasov, S. A., and Crowley, S. D. (2020) TNF- α in T lymphocytes attenuates renal injury and fibrosis during nephrotoxic nephritis, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **318**, F107-F116, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00347.2019>.
35. Dudeck, J., Kotrba, J., Immler, R., Hoffmann, A., Voss, M., Alexaki, V. I., Morton, L., Jahn, S. R., Katsoulis-Dimitriou, K., Winzer, S., Kollias, G., Fischer, T., Nedospasov, S. A., Dunay, I. R., Chavakis, T., Müller, A. J., Schraven, B., Sperandio, M., and Dudeck, A. (2021) Directional mast cell degranulation of tumor necrosis factor into blood vessels primes neutrophil extravasation, *Immunity*, **54**, 468-483.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.017>.
36. Ninnemann, J., Winsauer, C., Bondareva, M., Köhl, A. A., Lozza, L., Durek, P., Lissner, D., Siegmund, B., Kaufmann, S. H. E., Mashregi, M.-F., Nedospasov, S. A., and Kruglov, A. A. (2022) TNF hampers intestinal tissue repair in colitis by restricting IL-22 bioavailability, *Mucosal. Immunol.*, **15**, 698-716, <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00506-x>.
37. Lakin, R., Polidovitch, N., Yang, S., Parikh, M., Liu, X., Debi, R., Gao, X., Chen, W., Guzman, C., Yakobov, S., Izaddoustdar, F., Wauchop, M., Lei, Q., Xu, W., Nedospasov, S. A., Christoffels, V. M., and Backx, P. H. (2023) Cardiomyocyte and endothelial cells play distinct roles in the tumour necrosis factor (TNF)-dependent atrial responses and increased atrial fibrillation vulnerability induced by endurance exercise training in mice, *Cardiovasc. Res.*, **119**, 2607-2622, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvad144>.
38. Kroetsch, J. T., Levy, A. S., Zhang, H., Aschar-Sobbi, R., Lidington, D., Offermanns, S., Nedospasov, S. A., Backx, P. H., Heximer, S. P., and Bolz, S.-S. (2017) Constitutive smooth muscle tumour necrosis factor regulates microvascular myogenic responsiveness and systemic blood pressure, *Nat. Commun.*, **8**, 14805, <https://doi.org/10.1038/ncomms14805>.
39. Dinh, D. D., Lidington, D., Kroetsch, J. T., Ng, C., Zhang, H., Nedospasov, S. A., Heximer, S. P., and Bolz, S.-S. (2020) Experimental subarachnoid hemorrhage drives catecholamine-dependent cardiac and peripheral microvascular dysfunction, *Front. Physiol.*, **11**, 402, <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00402>.
40. Han, J., Brown, T., and Beutler, B. (1990) Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level, *J. Exp. Med.*, **171**, 465-475, <https://doi.org/10.1084/jem.171.2.465>.
41. Yocum, D. E., Esparza, L., Dubry, S., Benjamin, J. B., Volz, R., and Scuderi, P. (1989) Characteristics of tumor necrosis factor production in rheumatoid arthritis, *Cell. Immunol.*, **122**, 131-145, [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(89\)90154-8](https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90154-8).

42. Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kiousis, D., and Kollias, G. (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis, *EMBO J.*, **10**, 4025-4031, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04978.x>.
43. Maini, R. N., Elliott, M., Brennan, F. M., Williams, R. O., and Feldmann, M. (1994) Targeting TNF alpha for the therapy of rheumatoid arthritis, *Clin. Exp. Rheumatol.*, **12 Suppl 11**, S63-S66.
44. Feldmann, M., Elliott, M. J., Maini, R. N., and Woody, J. N. (1997) Anti-tumor necrosis factor- α therapy of rheumatoid arthritis, *Adv. Immunol.*, **64**, 283-350, [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60891-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60891-3).
45. Hayward, M. D., Jones, B. K., Saporov, A., Hain, H. S., Trillat, A.-C., Bunzel, M. M., Corona, A., Li-Wang, B., Strenkowski, B., Giordano, C., Shen, H., Arcamone, E., Weidlick, J., Vilensky, M., Tugusheva, M., Felkner, R. H., Campbell, W., Rao, Y., Grass, D. S., and Buiakova, O. (2007) An extensive phenotypic characterization of the hTNF α transgenic mice, *BMC Physiol.*, **7**, 13, <https://doi.org/10.1186/1472-6793-7-13>.
46. Lacey, D., Hickey, P., Arhatari, B. D., O'Reilly, L. A., Rohrbach, L., Kiriazis, H., Du, X.-J., and Bouillet, P. (2015) Spontaneous retrotransposon insertion into *TNF* 3'UTR causes heart valve disease and chronic polyarthritis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 9698-9703, <https://doi.org/10.1073/pnas.1508399112>.
47. Clayer, E., Dalseno, D., Kueh, A., Lacey, D., Tsai, M., Arvell, E. H., et al. (2020) Severe impairment of TNF post-transcriptional regulation leads to embryonic death, *iScience*, **23**, 101726, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101726>.
48. Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., and Kollias, G. (1999) Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies, *Immunity*, **10**, 387-398, [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80038-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80038-2).
49. Liepinsh, D. J., Kruglov, A. A., Galimov, A. R., Shakhov, A. N., Shebzukhov, Y. V., Kuchmiy, A. A., Grivennikov, S. I., Tumanov, A. V., Drutskaya, M. S., Feigenbaum, L., Kuprash, D. V., and Nedospasov, S. A. (2009) Accelerated thymic atrophy as a result of elevated homeostatic expression of the genes encoded by the TNF/lymphotoxin cytokine locus, *Eur. J. Immunol.*, **39**, 2906-2915, <https://doi.org/10.1002/eji.200839191>.
50. Olleros, M. L., Chavez-Galan, L., Segueni, N., Bourigault, M. L., Vesin, D., Kruglov, A. A., Drutskaya, M. S., Bisig, R., Ehlers, S., Aly, S., Walter, K., Kuprash, D. V., Chouchkova, M., Kozlov, S. V., Erard, F., Ryffel, B., Quesniaux, V. F. J., Nedospasov, S. A., and Garcia, I. (2015) Control of mycobacterial infections in mice expressing human tumor necrosis factor (TNF) but not mouse TNF, *Infect. Immun.*, **83**, 3612-3623, <https://doi.org/10.1128/IAI.00743-15>.
51. Ameloot, P., Fiers, W., De Bleser, P., Ware, C. F., Vandenabeele, P., and Brouckaert, P. (2001) Identification of tumor necrosis factor (TNF) amino acids crucial for binding to the murine p75 TNF receptor and construction of receptor-selective mutants, *J. Biol. Chem.*, **276**, 37426-37430, <https://doi.org/10.1074/jbc.M102020200>.
52. Atretkhany, K.-S. N., Mufazalov, I. A., Dunst, J., Kuchmiy, A., Gogoleva, V. S., Andruszewski, D., Drutskaya, M. S., Faustman, D. L., Schwabenland, M., Prinz, M., Kruglov, A. A., Waisman, A., and Nedospasov, S. A. (2018) Intrinsic TNFR2 signaling in T regulatory cells provides protection in CNS autoimmunity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 13051-13056, <https://doi.org/10.1073/pnas.1807499115>.
53. Ruuls, S. R., Hoek, R. M., and Ngo, V. N. (2001) Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation, *Immunity*, **15**, 533-543, [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00215-1).
54. Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., Lukyanov, K. A., Zambito, G., and Mezzanotte, L. (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiol. Rev.*, **90**, 1103-1163, <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>.
55. Chawda, C., McMorro, R., Gaspar, N., Zambito, G., and Mezzanotte, L. (2022) Monitoring immune cell function through optical imaging: a review highlighting transgenic mouse models, *Mol. Imaging Biol.*, **24**, 250-263, <https://doi.org/10.1007/s11307-021-01662-5>.
56. Rubtsov, Y. P., Niec, R. E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., and Rudensky, A. Y. (2010) Stability of the regulatory T cell lineage *in vivo*, *Science*, **329**, 1667-1671, <https://doi.org/10.1126/science.1191996>.
57. Shcherbo, D., Merzlyak, E. M., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Lukyanov, K. A., Bogdanova, E. A., Zaraisky, A. G., Lukyanov, S., and Chudakov, D. M. (2007) Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging, *Nat. Methods*, **4**, 741-746, <https://doi.org/10.1038/nmeth1083>.
58. Shebzukhov, Y. V., Kuchmiy, A. A., Kruglov, A. A., Zipp, F., Siffrin, V., and Nedospasov, S. A. (2014) Experimental Applications of TNF-Reporter Mice with Far-Red Fluorescent Label, in *The TNF Superfamily* (Bayry, J., ed) New York, Springer New York, pp. 151-162, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0669-7_13.
59. Кучмий А. А., Круглов А. А., Галимов А. Р., Шебзухов Ю. В., Чудаков Д. М., Лукьянов С. А., Недоспасов С. А. (2011) Новая линия трансгенных репортерных мышей для изучения экспрессии фактора некроза опухолей, *Росс. Иммунол. Журн.*, **5**, 3-4.
60. Minshawi, F., White, M. R. H., Muller, W., Humphreys, N., Jackson, D., Campbell, B. J., Adamson, A., and Papoutsopoulou, S. (2019) Human TNF-Luc reporter mouse: a new model to quantify inflammatory responses, *Sci. Rep.*, **9**, 193, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36969-x>.

61. Hall, B. E., Zhang, L., Sun, Z. J., Utreras, E., Prochazkova, M., Cho, A., Terse, A., Arany, P., Dolan, J. C., Schmidt, B. L., and Kulkarni, A. B. (2016) Conditional TNF- α overexpression in the tooth and alveolar bone results in painful pulpitis and osteitis, *J. Dent. Res.*, **95**, 188-195, <https://doi.org/10.1177/0022034515612022>.
62. Drutskaya, M. S., Efimov, G. A., Astrakhantseva, I. V., Kruglov, A. A., and Nedospasov, S. A. (2018) Making anti-cytokine therapy more selective: studies in mice, *Cytokine*, **101**, 33-38, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.022>.

REVERSE GENETICS APPLIED TO IMMUNOBIOLOGY OF TUMOR NECROSIS FACTOR, A MULTIFUNCTIONAL CYTOKINE

Mini-Review

**S. A. Nedospasov^{1,2*}, A. A. Kruglov³, A. V. Tumanov⁴, M. S. Drutskaya^{1,2},
I. V. Astrakhantseva¹, and D. V. Kuprash²**

¹ Division of Immunobiology and Biomedicine, Sirius University,
354340 Federal Territory Sirius, Russia; e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

³ Laboratory of Systems Rheumatology, German Rheumatism Research Center (DRFZ), a Leibniz Institute,
10117 Berlin, Germany

⁴ Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics,
University of Texas Health Science Center at San Antonio, 79229 San Antonio, TX, USA

Tumor necrosis factor (TNF) is one of many cytokines – protein molecules responsible for communication between cells of the immune system. TNF was discovered and given its grand name because of its striking antitumor effect in an experimental system, but its main physiological functions in the context of the whole organism turned out to be completely unrelated to tumor protection. This short review discusses “man-made” mouse models generated by early genome-editing technologies, which enabled us to establish the true functions of TNF in health and some diseases as well as to unravel potential strategies for improving the therapy of TNF-dependent diseases.

Keywords: tumor necrosis factor, TNF, conditional mice models, gene knockout, reporter mice, gene overexpression

АНТИГЕННОЕ КАРТИРОВАНИЕ SARS-CoV-2

Обзор

© 2024 Е.А. Астахова^{1,2*}, А.А. Морозов^{1,2}, Ю.Д. Вавилова³, А.В. Филатов^{1,2}

¹ ФБГУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,
115522 Москва, Россия; электронная почта: ast_kat@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра иммунологии, 119234 Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.11.2023

После доработки 14.01.2024

Принята к публикации 17.01.2024

Антигенная картография – это подход, позволяющий визуализировать антигенные различия вариантов вируса на основании титров вирус-нейтрализации сывороток. Этот подход с успехом используется при выборе штамма вакцины вируса гриппа. С появлением вариантов SARS-CoV-2, ускользающих от вакцино-индуцированного антительного ответа, возникла необходимость изменения и вакцин против COVID-19. В данном обзоре представлена информация об антигенных различиях вариантов SARS-CoV-2, полученная методом антигенной картографии. Кроме того, описаны возможности методов, основанных на антигенном картировании, а именно: построение антительных ландшафтов и графиков увеличения широты нейтрализации для количественной оценки широты антительного ответа. Понимание антигенных различий вариантов SARS-CoV-2 и возможностей сформированного гуморального иммунитета способствует своевременному обновлению профилактических вакцин против COVID-19.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антигенные карты, SARS-CoV-2, COVID-19, широта вирус-нейтрализации.

DOI: 10.31857/S0320972524050075 **EDN:** YOTNBV

ВВЕДЕНИЕ

С начала пандемии COVID-19 появилось более 40 вариантов SARS-CoV-2, из которых более 10 относятся к семейству Omicron (<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>, <https://covariants.org/>, 09.01.2024). Варианты SARS-CoV-2 отличаются друг от друга по контагиозности, характеру вызываемой инфекции, а также по некоторым другим эпидемиологическим характеристикам [1–3]. Существуют различные способы классификации вирусных вариантов. Наиболее очевидный – это построение на основе данных секвенирования филогенетических деревьев вирусных вариантов и изолятов [4]. Такие деревья указывают на эволюцию вирусных вариантов и пути их распространения, однако в отношении

антигенности такая классификация даёт только косвенную информацию [5]. Очевидно, что не все мутации являются одинаково важными. Наибольший интерес представляют те из них, которые наблюдаются в поверхностном шиповидном белке (Spike, S) и расположены в тех доменах, которые принимают непосредственное участие во взаимодействии с рецепторами или в слиянии вируса с клеткой хозяина. Наиболее важными мутациями являются те, которые приводят к ускользанию вируса от нейтрализующих антител, сформированных после вакцинации или предыдущих инфекций. Именно эти мутации формируют антигенный портрет вирусного варианта.

Количественное определение антигенных отличий представляет определённые трудности. Очевидно, что мерой антигенных отличий не может быть арифметическая сумма мутаций. Одни из них являются более иммуногенными, а другие – менее. Одни мутации происходят в функционально важных участках антигенов, другие – вдали от них.

Принятые сокращения: АЕ – антигенная единица; WT – дикий тип.

* Адресат для корреспонденции.

Решение этой задачи возможно с помощью метода антигенного картирования вируса. Этот подход впервые был использован при изучении вируса гриппа [6], а теперь всё более широко применяется для контроля над появлением новых вариантов SARS-CoV-2 и для оценки их антигенности. Ниже мы приводим обзор литературных данных по антигенным свойствам SARS-CoV-2, полученным с помощью антигенных карт.

ЭТАПЫ ПОСТРОЕНИЯ АНТИГЕННЫХ КАРТ

Определение антигенных характеристик вируса с помощью антигенных карт начинается с постановки серологических тестов [7]. Если для вируса гриппа обычно используется тест ингибирования гемагглютинации (HI), то для SARS-CoV-2 золотым стандартом является тест вирус-нейтрализации с «живым» вирусом (cVNT, conventional virus-neutralization test). Часто, ввиду повышенных требований к безопасности для работы с «живым» вирусом, cVNT заменяют тестом с вирусоподобными частицами, псевдотипированными S-белком коронавируса (pVNT, pseudovirus-based virus-neutralization test). Неоднократно был показан высокий уровень корреляции между результатами cVNT и pVNT [7–10]. Эти тесты предоставляют обширный набор многомерных данных, которые вследствие своей массивности трудно интерпретировать.

Ранее биология уже сталкивалась с подобными многомерными задачами, например при интерпретации данных, полученных методами транскриптомики или многоцветной проточной цитометрии [11–13]. Для снижения размерности данных были разработаны алгоритмы t-SNE (t-Stochastic Neighbourhood Embedding) и UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) [14, 15]. Эти алгоритмы позволяют представить многомерные данные на двумерной плоскости. Преимуществом этих алгоритмов является сохранение соседства между точками в ущерб учёту расстояний между ними в многомерном пространстве. Для построения антигенных карт используют метод, основанный на принципе многомерного масштабирования (Multidimensional Scaling, MDS) [16], который по своим алгоритмам близок к традиционному методу главных компонент (Principal Component Analysis, PCA). Преимущество MDS заключается в том, что расстояние между точками, визуализированными на плоскости, максимально соответствует расстоянию между ними в многомерном пространстве.

Построение антигенных карт начинается с создания таблиц, где в столбцах будут указаны сыворотки, в строках – варианты вируса, а на пересечении – титры нейтрализации. На следующем этапе происходит преобразование титров

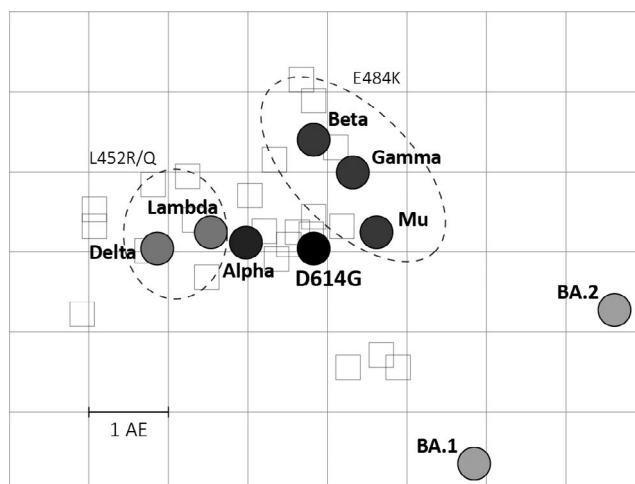


Рис. 1. Пример антигенной карты SARS-CoV-2, адаптировано из работы Mykytyn et al. [18]. Кругами показано расположение отдельных антигенов, квадратами – расположение индивидуальных сывороток, пунктирной линией выделены варианты, имеющие общие указанные замены; AE – антигенная единица

нейтрализации в антигенные дистанции (<https://acorg.github.io/Racmacs/articles/intro-to-antigenic-cartography.html>, 4.09.2023). Чем выше титр нейтрализации сыворотки по отношению к антигену, тем меньше будет антигенная дистанция между ними. Далее применяется метод MDS, и данные визуализируются на плоскости.

На антигенных картах отображаются как антигены (варианты вируса), так и сыворотки. Расстояние между сывороткой и антигеном напрямую зависит от антигенной дистанции. Близкие по антигенным свойствам варианты располагаются рядом друг с другом, образуя кластер. Например, дикий тип (WT) коронавируса сокластеризуется с вариантами Alpha, Beta, Gamma [17], но, как правило, далеко отстоит от вариантов Omicron (рис. 1).

Антигенная эволюция вируса отличается от генетической, так как различные мутации вносят неравноценный вклад в изменение антигенных характеристик вируса. Например, мутация E484K/Q является наиболее значимой для антигенных отличий вариантов Beta, Gamma, Каппа и Му относительно WT, а мутация L452R/Q является определяющей для вариантов Delta, Epsilon и Lambda, хотя в перечисленных вариантах присутствуют и другие мутации [18, 19].

Значимое изменение антигенных свойств нового варианта вируса приводит к тому, что антитела, нейтрализующие предыдущий вариант, оказываются неспособными к нейтрализации нового варианта. В таком случае, во-первых, на антигенной карте новый вариант будет отстоять на большее расстояние от предыдущих. Во-вторых, будут отсутствовать сыворотки, расположенные на карте между изучаемыми вариантами.

ПРЕДЫДУЩИЙ ОПЫТ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ВЛИЯЕТ НА ПОЛОЖЕНИЕ ВИРУСНОГО ВАРИАНТА НА АНТИГЕННОЙ КАРТЕ

На первый взгляд может показаться, что расположение вирусных вариантов на антигенной карте зависит исключительно от количества и качества аминокислотных замен. Однако это не совсем верно. Предыдущий опыт иммунной системы, приобретённый в процессе перенесённой инфекции SARS-CoV-2 или вакцинации, может существенно изменять степень нейтрализации вирусных вариантов и, следовательно, влиять на вид антигенных карт. Действительно, сыворотки от инфицированных лабораторных животных или переболевших людей, от вакцинированных добровольцев, а также лиц, обладающих гибридным иммунитетом, в итоге дают отличающиеся антигенные карты [20–22]. Таким образом, положение вирусного варианта на антигенной карте, а, следовательно, и расстояние между вариантами зависит не только от строения или состава их иммунодоминантных эпитопов, но также от источника сывороток, который был использован для построения карты.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА АНТИГЕННЫХ РАССТОЯНИЙ МЕЖДУ ВАРИАНТАМИ ВИРУСА

Антигенные карты широко используют для принятия решения о смене штамма вакцины против вируса гриппа. Derek Smith et al. [6], ретроспективно анализируя эволюцию вируса гриппа с 1968 по 2003 год, показали, что вакцинные штаммы меняли, когда новый вариант был удалён на 2 и более антигенные единицы (АЕ) от предыдущего вакцинного штамма. Так был определён критерий «достаточности» антигенных различий вируса для обновления вакцинного штамма. Для SARS-CoV-2 этот критерий пока чётко не определён. Однако после построения первых карт с Omicron BA.1 было замечено, что на антигенной карте SARS-CoV-2 он расположен «как одинокий остров посреди океана» (<https://spectrum.ieee.org/omicron-covid-variant#toggle-gdpr>, 4.09.2023), то есть он достаточно далёк от предомикронных вариантов. Это наблюдение стало хорошим объяснением распространения «прорывных» инфекций среди вакцинированных доноров и поставило вопрос о необходимости смены вакцинного штамма.

Сейчас уже нет сомнений в том, что между WT коронавируса и вариантами семейства Omicron существуют значительные антигенные различия, которые составляют от 3 до 9 АЕ в зависимости

от варианта [18, 20–25], где одна АЕ соответствует двукратному разведению сыворотки. Наиболее удалены от D614G варианты BQ.1.1, BM.1.1.1 и XBB.1, XBB.2, BN.1.3.1 [22, 25]. Расстояние между этими вариантами и D614G составляет более 6 АЕ. Варианты семейства Omicron антигенно далеки не только от предомикронных вариантов, но и друг от друга [22, 25, 26]. Например, на антигенной карте Omicron XBB.1 и BM.1.1.1 удалены друг от друга на расстояние около 6 АЕ [25].

К сожалению, точное определение антигенных расстояний – не совсем однозначная процедура. Антигенные расстояния между одними и теми же вариантами, но определённые в различных исследованиях, могут отличаться между собой (таблица). Вероятно, это связано с тем, как были получены соответствующие сыворотки. Более точная количественная оценка антигенных отличий может быть достигнута путём стандартизации условий сбора и тестирования сывороток.

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИГЕННЫХ КАРТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАКЦИННОГО ШТАММА

После того как обнаруживается, что новый вариант вируса антигенно далёк от предыдущего, встаёт вопрос о том, на основе какого именно варианта необходимо делать следующую вакцину [28]. Для этого строят «базовую» антигенную карту. Лабораторных животных, чаще всего сирийских хомяков или мышей, инфицируют потенциальным вакцинным штаммом и определяют, насколько образующиеся сыворотки перекрестно нейтрализуют интересующие варианты.

В работе Amanat et al. [17] было показано, что сыворотки мышей, инфицированных вариантом Gamma, нейтрализовали также WT и Beta (на антигенной карте эти сыворотки расположены между антигенами WT, Beta и Gamma). В то же время сыворотки мышей, инфицированных вариантом Beta, не нейтрализовали WT и Gamma.

Фокус текущих исследований направлен на определение подходящего вакцинного штамма SARS-CoV-2 из семейства Omicron. В работе Xia et al. [29] сыворотки мышей K18-hACE2, инфицированных BA.1, в наибольшей степени нейтрализовали BA.1, но при этом также показывали широкую кросс-реактивность против BA.2 и BA.2.12.1. Сыворотки мышей, инфицированных BA.5, нейтрализовали варианты BA.2, BA.2.12.1 и в меньшей степени BA.4.6 и BA.5 и располагались на антигенной карте преимущественно в окрестности BA.2.12.1, при этом отстояли от BA.5 на 1 и более АЕ. В другой работе было показано, что сыворотки хомяков, инфицированных BA.5, нейтрализовали BA.2 и BQ.1.1 и в меньшей степени – вариант BM.1.1.1.

Антигенные расстояния между штаммом D614G и вариантами SARS-CoV-2

№	Источник сывороток	Расстояние между D614G и вариантом						Ссылка
		Alpha	Beta	Delta	BA.1	BA.2	BA.4/5	
1	Сирийские хомяки, через 14 дней после двойного и/н ¹ введения вируса	0,8	1,1	0,7	4,4	3,7	4,8	[22]
2	Сирийские хомяки, через 26 дней после в/м ² введения вируса	0,8	1,3	1,7	4,7	4,0	н/т ⁴	[18]
3	Сирийские хомяки, через 26 дней после в/м введения вируса	1,4	0,6	1,5	6,2	5,6	5,0 (BA.5)	[25]
4	Доноры, переболевшие подтверждённым вариантом SARS-CoV-2 или предполагаемым штаммом D614G	0,9	2,0	1,2	4,7	4,0	н/т	[21]
5	Доноры, вакцинированные mRNA-1273, BNT162b или ChAdOx-S1	0,4	2,2	1,7	5,9	н/т	н/т	[21]
6	Переболевшие доноры, вакцинированные mRNA-1273 или BNT162b	0,6	3,7	1,4	7,0	6,3	5,8	[20]
7	Переболевшие или вакцинированные (mRNA-1273) доноры	0,5	3,8	2,2	5,6	5,3	6,7	[19]
8	Переболевшие или вакцинированные (mRNA-1273 ×2 ³ , BNT162b ×2, AZD1222 ×2 или AZD1222/BNT162b) доноры	0,8	2,1	1,5	5,5	3,3	4,2 (BA.5)	[27]

¹ Интраназальное.
² Внутримышечное.
³ Двукратная гомологичная вакцинация.
⁴ Не тестировано.

Ни один из образцов сыворотки не нейтрализовал ХВВ.1 [25]. Несмотря на антигенное сходство BA.5 и BQ.1.1, авторы сомневаются в том, что включение BA.5 в состав бивалентной вакцины приведёт к достаточному уровню перекрестного ответа против BQ.1.1 ввиду того, что эти два варианта не кластеризуются друг с другом (расстояние между ними более 3 АЕ).

Работы Kurhade et al., Hoffmann et al. и Roessler et al. [30–32] подтверждают, что иммунизация людей с помощью бивалентной вакцины на основе BA.5 не индуцирует значимый уровень нейтрализации вариантов BA.2.75.2, BQ.1.1, ХВВ.1.

На данный момент вариантами SARS-CoV-2, представляющими интерес, являются ХВВ.1.5, ХВВ.1.16, BA.2.86 и некоторые другие (<https://www.who.int/ru/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>, 09.01.2024). В ряде работ было показано относительно близкое расположение вариантов BA.2.86 и ХВВ.1.5 (расстояние приблизительно 0,5–4 АЕ в зависимости от источника сывороток) [33–35]. Сывороточные антитела, выработанные против ХВВ.1.5, обладают перекрестной реактивностью против BA.2.86, что говорит в пользу включения ХВВ.1.5 в состав обновлённой вакцины.

**СРАВНЕНИЕ «БАЗОВЫХ»
АНТИГЕННЫХ КАРТ С КАРТАМИ
ОТ ВАКЦИНИРОВАННЫХ ДОНОРОВ**

Принимая «базовые» карты в качестве золотого стандарта для определения антигенности вируса, мы предполагаем, что антителый ответ людей и лабораторных животных формируется схожим образом, хотя это не совсем так. «Базовые» антигенные карты можно также построить с использованием сывороток доноров, впервые переболевших известным вариантом SARS-CoV-2. Однако такие сыворотки будет получать всё труднее ввиду всё большего распространения гибридного иммунитета в популяции. Именно поэтому важно строить антигенные карты на данных от вакцинированных доноров и доноров с гибридным иммунитетом и сравнивать их с «базовыми».

В одной из работ «предомикронного» периода при сравнении антигенных карт от доноров, переболевших D614G или одним из вариантов SARS-CoV-2, включающих мутацию L452R, с картами вакцинированных mRNA-1273 были найдены некоторые различия [36]. Так, на карте вакциниро-

ванных расстояние между D614G и AY.1 (семейство Delta) было больше, чем на карте переболевших. Варианты D614G и Beta, наоборот, находились ближе друг к другу. Кроме того, на карте вакцинированных варианты Beta и AY.1 находились на расстоянии около 1 АЕ, в то время как на карте переболевших они находились на расстоянии более 4 АЕ друг от друга. Общий тренд, который был обнаружен авторами, заключался в том, что изучаемые варианты – D614G, Alpha, Beta, Карпа, Lambda, Delta и другие – на карте переболевших доноров были расположены дальше друг от друга, чем на карте вакцинированных. Это же наблюдение было сделано в более поздней работе, в которую вошли переболевшие доноры, в том числе вариантами Omicron BA.1 и BA.2, а также получившие вакцины mRNA-1273, BNT162b2 или AZD1222 [21]. На карте вакцинированных варианты D614G, Alpha, Gamma располагались практически на одном месте и формировали кластер. На карте переболевших между этими вариантами было расстояние около 1 АЕ. Другое отличие было связано с расположением сывороток на картах. На карте вакцинированных сыворотки располагались только в районе кластера D614G-Alpha-Gamma. На карте переболевших сыворотки располагались ближе к тому варианту, которым переболел донор.

Исследование Van der Straten et al. [21] также позволило выявить отличия в позиционировании сывороток от доноров, вакцинированных разными вакцинами. Мы обратили внимание на то, что сыворотки, расположенные возле кластера D614G-Alpha-Gamma, но ближе к Omicron BA.1, были преимущественно от доноров, получивших вакцину mRNA-1273. Сыворотки от вакцинированных BNT162b2 или AZD1222 располагались возле кластера D614G-Alpha-Gamma и в стороне, противоположной от BA.1.

АНТИГЕННЫЕ КАРТЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФОРМИРОВАНИЯ ПЕРЕКРЕСТНЫХ АНТИТЕЛ ПОСЛЕ БУСТЕРНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

Сравнение антигенных карт до и после вакцинации позволяет следить за процессом формирования перекрестных антител. Бустерная вакцинация приводит к изменению антигенных расстояний между вариантами [20, 24, 37]. Так как антиген, против которого тестируются сыворотки, остаётся тем же самым, увеличение или уменьшение антигенных расстояний между вариантами связано с изменением состава нейтрализующих антител в сыворотках. Уменьшение расстояния между двумя антигенами может означать, что в сыворотке стало больше антител, которые связываются с обоими антигенами [38].

В ряде работ было показано, что 3-я бустерная вакцинация BNT162b2 приводит к уменьшению антигенного расстояния между D614G и BA.1, BA.2, BA.2.12.1, BA.4/5 [20, 24]. В этих же работах было показано, что после третьей иммунизации мРНК-вакциной антигенные расстояния между D614G и Delta, напротив, увеличиваются. Мы, в свою очередь, показали, что гомологичная ревакцинация Спутником-V приводит к уменьшению антигенного расстояния между WT и BA.1. Кроме того, мы обнаружили разнонаправленное изменение расстояний между WT и Delta при гомо- и гетерологичной ревакцинации. Ревакцинация Спутником-V приводила к уменьшению антигенного расстояния между WT и Delta, а BNT162b2 – к его увеличению. Данные различия могут быть связаны с тем, что Спутник-V индуцирует иммунный ответ на полноразмерный S-белок коронавируса, а BNT162b2 – на стабилизированную до слияния (pre-fusion) конформацию S-белка [39–41].

Антигенные карты позволяют количественно определить изменения антигенных дистанций между вирусными вариантами до и после вакцинации. С этой целью мы предложили удобный способ визуализации этих изменений – с помощью «шляпных» графиков (hat graphs) [42]. Край «шляпы» на таком графике соответствует начальному значению показателя, в применении к антигенным картам – антигенному расстоянию между вариантами до воздействия. Высота «шляпы» соответствует изменению антигенного расстояния. Это изменение может быть как положительным, так и отрицательным (в таком случае «шляпа» будет перевёрнутой). С помощью «шляпного» графика мы визуализировали изменение антигенных расстояний между WT и Alpha, Beta, Delta, Omicron BA.1, BA.4/5 на выборке сывороток от добровольцев, прошедших ревакцинацию Спутником-V или BNT162b2 после первичной вакцинации Спутником-V [37]. Было показано, что наибольшее уменьшение антигенного расстояния произошло между WT и BA.1 для обоих типов ревакцинации.

АНТИТЕЛЬНЫЕ ЛАНДШАФТЫ

Попытка количественной оценки широты антительного ответа реализована в подходе, который называется моделированием антительных ландшафтов [43]. Антительные ландшафты представляют собой трёхмерную поверхность, где плоскостью XY является «базовая» антигенная карта, а высота ландшафта (ось Z) определяется титром нейтрализации конкретного антигена сыворотками изучаемой группы. Сглаженная поверхность строится с помощью множественной линейной регрессии. Таким образом формируется иммуно-

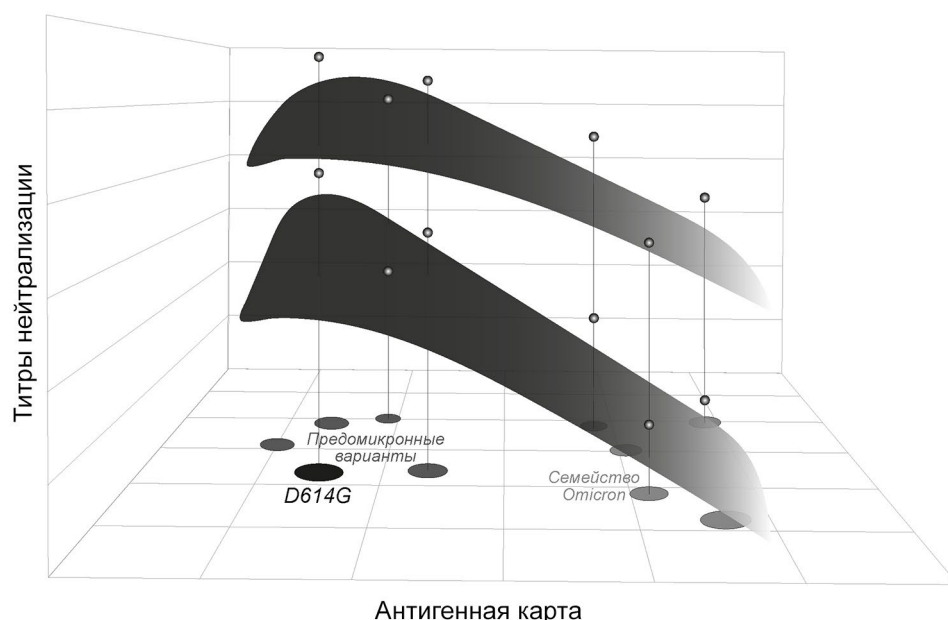


Рис. 2. Пример антительных ландшафтов, адаптировано из работы Roessler et al. [32]

логический профиль сывороток с возвышениями, соответствующими областям на антигенной карте с более высокими уровнями антител (рис. 2).

Перекрытно-реактивные сыворотки имеют более плоские ландшафты, с меньшим наклоном в сторону той или иной антигенной области (верхний ландшафт на рис. 2). Антительные ландшафты доноров, получивших двукратно вакцины mRNA-1273, BNT162b2, AZD1222, а также переболевших вариантами D614G, Alpha, Beta, имеют выраженный нисходящий наклон в сторону омикронного кластера за счёт более низких титров нейтрализации вариантов семейства Omicron относительно предомикронных вариантов [19, 27]. Интересно, что ландшафты становятся более пологими через 3 месяца после двух- и трёхкратной вакцинации mRNA-1273 относительно измерения через месяц [19]. Это означает, что снижение титров нейтрализации происходит с разной скоростью – титры против предомикронных вариантов снижаются быстрее. Возможно, это происходит благодаря тому, что В-клетки памяти, специфичные к предомикронным вариантам, быстро активируются при повторной иммунизации. Присутствие специфических антител от плазматических клеток и активированных В-клеток памяти тормозит развитие наивных В-клеток со схожей специфичностью, в том числе за счёт прямого маскирования доминантных эпитопов RBD (рецептор-связывающий домен) [44]. Однако наивные В-клетки, по-видимому, всё-таки активируются [45] и в процессе созревания в герминальном центре приобретают другую специфичность, которая оказывается полезной для нейтрализации омикронных вариантов. К этому моменту секреция антител от В-кле-

ток памяти уже снижается, поэтому мы видим более пологие антительные ландшафты только через 3 месяца после вакцинации.

Более пологие антительные ландшафты также присущи группам лиц, обладающих гибридным иммунитетом и получивших бивалентные вакцины с BA.1 или BA.4/5, по сравнению с ранее не инфицированными донорами [32].

ОЦЕНКА ШИРОТЫ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ С ПОМОЩЬЮ АНТИГЕННОГО КАРТИРОВАНИЯ

При изучении эффективности гуморального иммунитета против нескольких вариантов SARS-CoV-2 вводят понятие широты нейтрализации вируса. Эта величина показывает, насколько эффективно нейтрализуются родственные и более отдалённые варианты вируса. Как правило, широта вирус-нейтрализации оценивается на качественном уровне. На наш взгляд, антигенное картирование позволяет определить широту вирус-нейтрализации на количественном уровне.

Проецирование 3D антительных ландшафтов на плоскость даёт график увеличения широты нейтрализации [20]. По оси X располагаются антигены в зависимости от антигенной удалённости. За точку отсчёта, как правило, берут WT. По оси Y представляются титры нейтрализации этих антигенов (рис. 3). Данный тип графика позволяет оценивать изменение формы и площади иммунного профиля. Это особенно удобно при изучении динамики антительного ответа в течение длительного времени или после нескольких вакцинаций.

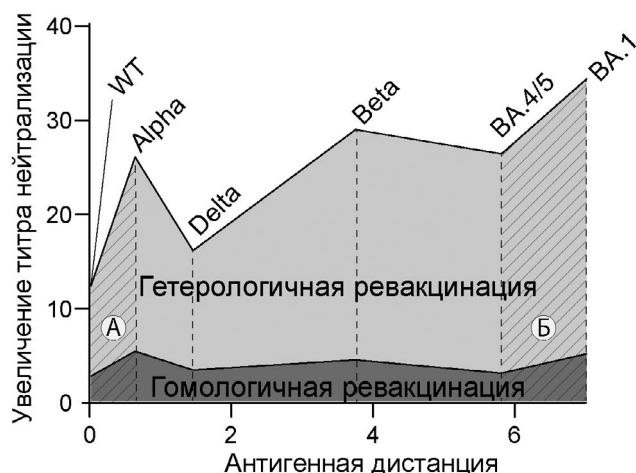


Рис. 3. Пример графика увеличения широты нейтрализации при гомо- и гетерологической ревакцинации, адаптировано из работы Astakhova et al. [37]

Изменение формы иммунного профиля на графике широты нейтрализации можно оценить только качественно. В одной из работ было показано, что после трёхкратной вакцинации BNT162b2 или вакцинации, сопряжённой с инфекцией BA.1, в большей степени наблюдалось увеличение титров нейтрализации против вариантов, антигенно далёких от вакцинного штамма [20].

В отличие от формы, площадь иммунного профиля – это тот параметр, который можно посчитать количественно. Однако необходимо учитывать ряд особенностей. Первое: по описанным выше причинам точное позиционирование антигенов на оси X затруднительно. Второе: площадь будет зависеть от количества антигенов, против которых тестируются сыворотки. Для решения первых двух проблем важна стандартизация определения титров вирус-нейтрализации. Наконец, необходимо учитывать, что чем дальше участок от точки начала отсчёта по оси X, тем его вклад в показатель широты вирус-нейтрализации более «весомый». В связи с этим для площади каждого участка необходимо ввести некий повышающий коэффициент, который, например, для участка Б на рис. 3 будет больше, чем для участка А. Насколько нам известно, модель подсчёта широты вирус-нейтрализации на основе графика такого типа ещё не разработана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Построение антигенных карт уже традиционно используется при выборе штамма вакцины против вируса гриппа [28] ([https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2023-](https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2023-2024-northern-hemisphere-influenza-season)

[2024-northern-hemisphere-influenza-season](https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2023-2024-northern-hemisphere-influenza-season), 4.09.2023). Обычно антигенные карты подтверждают выводы, полученные с помощью серологических тестов (например, вирус-нейтрализации), и используются для облегчения визуализации получаемых результатов. С помощью антигенных карт для Omicron BA.1, а впоследствии и других вариантов этого семейства было наглядно показано, что они антигенно далеки от предковых вариантов SARS-CoV-2 [19–25]. Эти выводы были включены Всемирной организацией здравоохранения в обоснование необходимости адаптации вакцины против коронавируса под новые циркулирующие штаммы (<https://www.who.int/news/item/18-05-2023-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines>, 4.09.2023).

При выборе нового вакцинного штамма важно выбрать штамм, достаточно далёкий по антигенным характеристикам от предыдущего. Это позволяет минимизировать эффект «первородного греха», когда в ответ на новый антиген преимущественно активируются ранее сформированные В-клетки памяти, а не наивные В-клетки, которые могли бы сформировать более специфичные антитела к новому антигену [45].

С помощью антигенного картирования было показано, что варианты семейства Omicron значительно отличаются по антигенным характеристикам не только от предковых форм SARS-CoV-2, но и друг от друга. Анализ антигенных карт выявил, что инфекция вариантом BA.5 даёт недостаточный нейтрализующий ответ против BA.4.6, BA.5, XBB.1 и BQ.1.1 [25, 29]. На данный момент продемонстрирована недостаточная эффективность бивалентных вакцин на основе BA.5 против новых вариантов [30–32]. Антигенная близость XBB.1.5 с современным вариантом BA.2.86, показанная с помощью антигенных карт, поддерживает включение XBB.1.5 в состав обновлённой вакцины [33–35]. Опираясь, в том числе, на антигенную характеристику новых вариантов, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) рекомендовало разработать моновалентную вакцину на основе XBB.1.5 (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/updated-covid-19-vaccines-use-united-states-beginning-fall-2023>, 09.01.2024).

Подход, основанный на антигенном картировании, построение антительных ландшафтов, позволяет прогнозировать, какие вирусные варианты потенциально могут ускользнуть от сформированного иммунитета – то есть немного опередить эволюцию вируса и заранее подготовить необходимую вакцину. Наконец, антигенная картография даёт потенциальную возможность количественной оценки широты вирус-нейтрализации сывороток.

Вклад авторов. Е.А. Астахова – написание текста; А.А. Морозов, Ю.Д. Вавилова, А.В. Филатов – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00472).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sun, C., Xie, C., Bu, G. L., Zhong, L. Y., and Zeng, M. S. (2022) Molecular characteristics, immune evasion, and impact of SARS-CoV-2 variants, *Signal Transduct. Target Ther.*, **7**, 1-25, <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01039-2>.
2. Tian, D., Sun, Y., Xu, H., and Ye, Q. (2022) The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant, *J. Med. Virol.*, **94**, 2376-2383, <https://doi.org/10.1002/jmv.27643>.
3. Guo, Y., Han, J., Zhang, Y., He, J., Yu, W., Zhang, X., Wu, J., Zhang, S., Kong, Y., Guo, Y., Lin, Y., and Zhang, J. (2022) SARS-CoV-2 Omicron variant: epidemiological features, biological characteristics, and clinical significance, *Front. Immunol.*, **13**, 1-13, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.877101>.
4. Li, J., Lai, S., Gao, G. F., and Shi, W. (2021) The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2, *Nature*, **600**, 408-418, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04188-6>.
5. Komissarov, A. B., Safina, K. R., Garushyants, S. K., Fadeev, A. V., Sergeeva, M. V., Ivanova, A. A., Danilenko, D. M., Lioznov, D., Shneider, O. V., Shvyrev, N., Spirin, V., Glyzin, D., Shchur, V., and Bazykin, G. A. (2021) Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia, *Nat. Commun.*, **12**, 1-13, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20880-z>.
6. Smith, D. J., Lapedes, A. S., De Jong, J. C., Bestebroer, T. M., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E., and Fouchier, R. A. M. (2004) Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus, *Science*, **305**, 371-376, <https://doi.org/10.1126/science.1097211>.
7. Tan, C. W., Chia, W. N., Qin, X., Liu, P., Chen, M. I.-C., Tiu, C., Hu, Z., Chen, V. C.W., Young, B. E., Sia, W. R., Tan, Y.-J., Foo, R., Yi, Y., Lye, D. C., Anderson, D. E., and Wang, L. F. (2020) A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction, *Nat. Biotechnol.*, **38**, 1073-1078, <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>.
8. Astakhova, E. A., Byazrova, M. G., Yusubalieva, G. M., Larichev, V. F., Baklaushev, V. P., and Filatov, A. V. (2022) High heterogeneity of virus-neutralizing and RBD-binding activities of COVID-19 convalescent sera, *Mol. Biol.*, **56**, 1095-1103, <https://doi.org/10.1134/S002689332206005X>.
9. Hyseni, I., Molesti, E., Benincasa, L., Piu, P., Casa, E., Temperton, N. J., Manenti, A., and Montomoli, E. (2020) Characterisation of SARS-CoV-2 lentiviral pseudotypes and correlation between pseudotype-based neutralisation assays and live virus-based micro neutralisation assays, *Viruses*, **12**, 1011, <https://doi.org/10.3390/v12091011>.
10. Schmidt, F., Weisblum, Y., Muecksch, F., Hoffmann, H. H., Michailidis, E., Lorenzi, J. C. C., Mendoza, P., Rutkowska, M., Bednarski, E., Gaebler, C., Agudelo, M., Cho, A., Wang, Z., Gazumyan, A., Cipolla, M., Caskey, M., Robbiani, D. F., Nussenzweig, M. C., Rice, C. M., Hatzioannou, T., and Bieniasz, P. D. (2020) Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses, *J. Exp. Med.*, **217**, e20201181, <https://doi.org/10.1084/jem.20201181>.
11. Saeys, Y., Van Gassen, S., and Lambrecht, B. N. (2016) Computational flow cytometry: Helping to make sense of high-dimensional immunology data, *Nat. Rev. Immunol.*, **16**, 449-462, <https://doi.org/10.1038/nri.2016.56>.
12. Dorrity, M. W., Saunders, L. M., Queitsch, C., Fields, S., and Trapnell, C. (2020) Dimensionality reduction by UMAP to visualize physical and genetic interactions, *Nat. Commun.*, **11**, 1-6, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15351-4>.
13. Becht, E., McInnes, L., Healy, J., Dutertre, C. A., Kwok, I. W. H., Ng, L. G., Ginhoux, F., and Newell, E. W. (2019) Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 38-47, <https://doi.org/10.1038/nbt.4314>.
14. Van der Maaten, L., and Hinton, G. (2008) Visualizing data using t-SNE, *J. Mach. Learn. Res.*, **9**, 2579-2605.
15. McInnes, L., Healy, J., and Melville, J. (2021) UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for dimension reduction, *arXiv preprint arXiv*, 2109.02508, <https://doi.org/10.48550/arXiv.1802.03426>.
16. Cai, Z., Zhang, T., and Wan, X. (2012) Antigenic distance measurements for seasonal influenza vaccine selection, *Vaccine*, **30**, 448-453, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.10.051>.
17. Amanat, F., Strohmeyer, S., Meade, P., Dambraskas, N., Mühlemann, B., Smith, D. J., Vigdorovich, V., Sather, D. N., Coughlan, L., and Krammer, F. (2021) Vaccination with SARS-CoV-2 variants of concern protects mice from challenge with wild-type virus, *PLoS Biol.*, **19**, 1-14, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001384>.

18. Mykytyn, A. Z., Rissmann, M., Kok, A., Rosu, M. E., Schipper, D., Breugem, T. I., van den Doel, P. B., Chandler, F., Bestebroer, T., de Wit, M., van Royen, M. E., Molenkamp, R., Oude Munnink, B. B., de Vries, R. D., GeurtsvanKessel, C., Smith, D. J., Koopmans, M. P. G., Rockx, B., Lamers, M. M., Fouchier, R. A. M., and Haagmans, B. L. (2022) Antigenic cartography of SARS-CoV-2 reveals that Omicron BA.1 and BA.2 are antigenically distinct, *Sci. Immunol.*, **7**, eabq4450, <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abq4450>.
19. Wilks, S. H., Mühlemann, B., Shen, X., Türel, S., LeGresley, E. B., Netzl, A., Caniza, M. A., Chacaltana-Huarcaya, J. N., Corman, V. M., Daniell, X., Datto, M. B., Dawood, F. S., Denny, T. N., Drosten, C., Fouchier, R. A. M., Garcia, P. J., Halfmann, P. J., Jassem, A., Jeworowski, L. M., Jones, T. C., Kawaoka, Y., Krammer, F., McDanal, C., Pajon, R., Simon, V., Stockwell, M. S., Tang, H., van Bakel, H., Vega, V., Webby, R., Montefiori, D. C., and Smith, D. J. (2023) Mapping SARS-CoV-2 antigenic relationships and serological responses, *Science*, **382**, ead0070, <https://doi.org/10.1126/science.ad0070>.
20. Wang, W., Lusvarghi, S., Subramanian, R., Epsi, N. J., Wang, R., Goguet, E., Fries, A. C., Echegaray, F., Vassell, R., Coggins, S. A., Richard, S. A., Lindholm, D. A., Mende, K., Ewers, E. C., Larson, D. T., Colombo, R. E., Colombo, C. J., Joseph, J. O., Rozman, J. S., Smith, A., Lalani, T., Berjohn, C. M., Maves, R. C., Jones, M. U., Mody, R., Huprikar, N., Livezey, J., Saunders, D., Hollis-Perry, M., Wang, G., Ganesan, A., Simons, M. P., Broder, C. C., Tribble, D. R., Laing, E. D., Agan, B. K., Burgess, T. H., Mitre, E., Pollett, S. D., Katzelnick, L. C., and Weiss, C. D. (2022) Antigenic cartography of well-characterized human sera shows SARS-CoV-2 neutralization differences based on infection and vaccination history, *Cell Host Microbe*, **30**, 1745-1758.e7, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.10.012>.
21. Van der Straten, K., Guerra, D., van Gils, M. J., Bontjer, I., Caniels, T. G., van Willigen, H. D. G., Wynberg, E., Poniman, M., Burger, J. A., Bouhuijs, J. H., van Rijswijk, J., Olijhoek, W., Liesdek, M. H., Lavell, A. H. A., Appelman, B., Sikkens, J. J., Bomers, M. K., Han, A. X., Nichols, B. E., Prins, M., Vennema, H., Reusken, C., de Jong, M. D., de Bree, G. J., Russell, C. A., Eggink, D., and Sanders, R. W. (2022) Antigenic cartography using sera from sequence-confirmed SARS-CoV-2 variants of concern infections reveals antigenic divergence of Omicron, *Immunity*, **55**, 1725-1731.e4, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.07.018>.
22. Mühlemann, B., Trimpert, J., Walper, F., and Schmidt, M. L. (2023) Antigenic cartography using variant-specific hamster sera reveals substantial antigenic variation among Omicron subvariants, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.07.02.547076>.
23. Bekliz, M., Adea, K., Vetter, P., Eberhardt, C. S., Hosszu-Fellous, K., Vu, D. L., Puhach, O., Essaidi-Laziosi, M., Waldivogel-Abramowski, S., Stephan, C., L'Huillier, A. G., Siegrist, C.-A., Didierlaurent, A. M., Kaiser, L., Meyer, B., and Eckerle, I. (2022) Neutralization capacity of antibodies elicited through homologous or heterologous infection or vaccination against SARS-CoV-2 VOCs, *Nat. Commun.*, **13**, 1-10, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31556-1>.
24. Lusvarghi, S., Pollett, S. D., Neerukonda, S. N., Wang, W., Wang, R., Vassell, R., Epsi, N. J., Fries, A. C., Agan, B. K., Lindholm, D. A., Colombo, C. J., Mody, R., Ewers, E. C., Lalani, T., Ganesan, A., Goguet, E., Hollis-Perry, M., Coggins, S. A., Simons, M. P., Katzelnick, L. C., Wang, G., Tribble, D. R., Bentley, L., Eakin, A. E., Broder, C. C., Erlandson, K. J., Laing, E. D., Burgess, T. H., Mitre, E., and Weiss, C. D. (2022) SARS-CoV-2 BA.1 variant is neutralized by vaccine booster-elicited serum but evades most convalescent serum and therapeutic antibodies, *Sci. Transl. Med.*, **14**, 8543, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abn8543>.
25. Mykytyn, A. Z., Rosu, M. E., Kok, A., Rissmann, M., van Amerongen, G., Geurtsvankessel, C., de Vries, R. D., Munnink, B. B. O., Smith, D. J., Koopmans, M. P. G., Lamers, M. M., Fouchier, R. A. M., and Haagmans, B. L. (2023) Antigenic mapping of emerging SARS-CoV-2 omicron variants BM.1.1.1, BQ.1.1, and XBB.1, *Lancet Microbe*, **4**, e294-e295, [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00384-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00384-6).
26. Wang, X., Jiang, S., Jiang, S., Li, X., Ai, J., Lin, K., Lv, S., Zhang, S., Li, M., Li, J., Dai, L., Hu, Z., Zhang, W., Zhang, Y., and Wang, P. (2023) Neutralization of SARS-CoV-2 BQ.1.1, CH.1.1, and XBB.1.5 by breakthrough infection sera from previous and recent waves in China, *Cell Discov.*, **9**, 5-8, <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00569-5>.
27. Rössler, A., Netzl, A., Knabl, L., Schäfer, H., Wilks, S. H., Bante, D., Falkensammer, B., Borena, W., von Laer, D., Smith, D. J., and Kimpel, J. (2022) BA.2 and BA.5 omicron differ immunologically from both BA.1 omicron and pre-omicron variants, *Nat. Commun.*, **13**, 7701, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35312-3>.
28. Fouchier, R. A. M., and Smith, D. J. (2010) Use of antigenic cartography in vaccine seed strain selection, *Avian Dis.*, **54**, 220-223, <https://doi.org/10.1637/8740-032509-ResNote.1>.
29. Xia, H., Yeung, J., Kalveram, B., Bills, C. J., Chen, J. Y. C., Kurhade, C., Zou, J., Widen, S. G., Mann, B. R., and Kondor, R. (2023) Cross-neutralization and viral fitness of SARS-CoV-2 Omicron sublineages, *Emerg. Microbes Infect.*, **12**, e2161422, doi:10.1080/22221751.2022.2161422.
30. Kurhade, C., Zou, J., Xia, H., Liu, M., Chang, H. C., Ren, P., Xie, X., and Shi, P. Y. (2023) Low neutralization of SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2, BQ.1.1 and XBB.1 by parental mRNA vaccine or a BA.5 bivalent booster, *Nat. Med.*, **29**, 344-347, <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02162-x>.
31. Hoffmann, M., Behrens, G. M. N., Arora, P., Kempf, A., Nehlmeier, I., Cossmann, A., Manthey, L., Dopfer-Jablonka, A., and Pöhlmann, S. (2022) Effect of hybrid immunity and bivalent booster vaccination on Omicron sublineage neutralization, *Lancet*, **23**, 25-28, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00792-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00792-7).

32. Roessler, A., Netzl, A., Knabl, L., Bante, D., Wilks, S. H., Borena, W., von Laer, D., Smith, D. J., and Kimpel, J. (2023) Characterizing SARS-CoV-2 neutralization profiles after bivalent boosting using antigenic cartography, *Nat. Commun.*, **14**, 5224, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41049-4>.
33. Coombes, N., Bewley, K. R., Duff, Y. Le, Alami-Rahmouni, N., Ryan, K. A., Kempster, S., Ferguson, D., Davies, E. R., Weldon, T. M., Cross, E. S. (2023) Evaluation of the neutralising antibody response in human and hamster sera against SARS-CoV-2 variants up to and including BA.2.86 using an authentic virus neutralisation assay, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.10.21.563398>.
34. Qu, P., Xu, K., Faraone, J. N., Goodarzi, N., Zheng, Y.-M., Carlin, C., Bednash, J. S., Horowitz, J. C., Mallampalli, R. K., and Saif, L. J. (2023) Immune evasion, infectivity, and fusogenicity of SARS-CoV-2 Omicron BA.2.86 and flip variants, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.09.11.557206>.
35. Ba, S., Ho, J., Zhang, R. M., Iketani, S., Yu, J., Huang, Y., and Qu, Y. (2023) Antigenicity and receptor affinity of SARS-CoV-2 BA.2.86 spike, *Nature*, **624**, 639-644, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06750-w>.
36. Neerukonda, S. N., Vassell, R., Lusvarghi, S., Wang, R., Echegaray, F., Bentley, L., Eakin, A. E., Erlandson, K. J., Katzelnick, L. C., Weiss, C. D., and Wang, W. (2021) SARS-CoV-2 Delta variant displays moderate resistance to neutralizing antibodies and Spike protein properties of higher soluble ACE2 sensitivity, enhanced cleavage and fusogenic activity, *Viruses*, **13**, 2485, <https://doi.org/10.3390/v13122485>.
37. Astakhova, E. A., Morozov, A. A., Byazrova, M. G., Sukhova, M. M., Mikhailov, A. A., Minnegalieva, A. R., Gorchakov, A. A., and Filatov, A. V. (2023) Antigenic cartography indicates that the Omicron BA.1 and BA.4/BA.5 variants remain antigenically distant to ancestral SARS-CoV-2 after Sputnik V vaccination followed by homologous (Sputnik V) or heterologous (Comirnaty) revaccination, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10493, <https://doi.org/10.3390/ijms241310493>.
38. Anderson, C. S., Sangster, M. Y., Yang, H., Mariani, T. J., Chaudhury, S., and Topham, D. J. (2020) Implementing sequence-based antigenic distance calculation into immunological shape space model, *BMC Bioinformatics*, **21**, 1-13, <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03594-3>.
39. Anderson, E. J., Roupheal, N. G., Widge, A. T., Jackson, L. A., Roberts, P. C., Makhene, M., Chappell, J. D., Denison, M. R., Stevens, L. J., Pruijssers, A. J., McDermott, A. B., Flach, B., Lin, B. C., Doria-Rose, N. A., O'Dell, S., Schmidt, S. D., Corbett, K. S., Swanson, P. A., Padilla, M., Neuzil, K. M., Bennett, H., Leav, B., Makowski, M., Albert, J., Cross, K., Edara, V. V., Floyd, K., Suthar, M. S., Martinez, D. R., Baric, R., Buchanan, W., Luke, C. J., Phadke, V. K., Rostad, C. A., Ledgerwood, J. E., Graham, B. S., and Beigel, J. H. (2020) Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults, *N. Engl. J. Med.*, **383**, 2427-2438, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028436>.
40. Walsh, E. E., Frenck, R. W., Falsey, A. R., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Neuzil, K., Mulligan, M. J., Bailey, R., Swanson, K. A., Li, P., Koury, K., Kalina, W., Cooper, D., Fontes-Garfias, C., Shi, P.-Y., Türeci, Ö., Tompkins, K. R., Lyke, K. E., Raabe, V., Dormitzer, P. R., Jansen, K. U., Şahin, U., and Gruber, W. C. (2020) Safety and immunogenicity of two RNA-based COVID-19 vaccine candidates, *N. Engl. J. Med.*, **383**, 2439-2450, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027906>.
41. Logunov, D. Y., Dolzhikova, I. V., Zubkova, O. V., Tukhvatullin, A. I., Shcheblyakov, D. V., Dzharullaeva, A. S., Grousova, D. M., Erokhova, A. S., Kovyrshina, A. V., Botikov, A. G., Izhaeva, F. M., Popova, O., Ozharovskaya, T. A., Esmagambetov, I. B., Favorskaya, I. A., Zrelkin, D. I., Voronina, D. V., Shcherbinin, D. N., Semikhin, A. S., Simakova, Y. V., Tokarskaya, E. A., Lubenets, N. L., Egorova, D. A., Shmarov, M. M., Nikitenko, N. A., Morozova, L. F., Smolyarchuk, E. A., Kryukov, E. V., Babira, V. F., Borisevich, S. V., Naroditsky, B. S., and Gintsburg, A. L. (2020) Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia, *Lancet*, **396**, 887-897, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3).
42. Witt, J. K. (2019) Introducing hat graphs, *Cogn. Res. Princ. Implic.*, **4**, 1-17, <https://doi.org/10.1186/s41235-019-0182-3>.
43. Fonville, J. M., Wilks, S. H., James, S. L., Fox, A., Ventresca, M., Aban, M., Xue, L., Jones, T. C., Le, N. M. H., Pham, Q. T., Tran, N. D., Wong, Y., Mosterin, A., Katzelnick, L. C., Labonte, D., Le, T. T., van der Net, G., Skepner, E., Russell, C. A., Kaplan, T. D., Rimmelzwaan, G. F., Masurel, N., De Jong, J. C., Palache, A., Beyer, W. E. P., Le, Q. M., Nguyen, T. H., Wertheim, H. F. L., Hurt, A. C., Osterhaus, A. D. M. E., Barr, I. G., Fouchier, R. A. M., Horby, P. W., and Smith, D. J. (2014) Antibody landscapes after influenza virus infection or vaccination, *Science*, **346**, 996-1000, <https://doi.org/10.1126/science.1256427>.
44. Schaefer-Babajew, D., Wang, Z., Muecksch, F., Cho, A., Loewe, M., Cipolla, M., Raspe, R., Johnson, B., Canis, M., DaSilva, J., Ramos, V., Turroja, M., Millard, K. G., Schmidt, F., Witte, L., Dizon, J., Shimeliovich, I., Yao, K. H., Oliveira, T. Y., Gazumyan, A., Gaebler, C., Bieniasz, P. D., Hatzioannou, T., Caskey, M., and Nussenzweig, M. C. (2023) Antibody feedback regulates immune memory after SARS-CoV-2 mRNA vaccination, *Nature*, **613**, 735-742, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05609-w>.
45. Schiepers, A., van 't Wout, M. F. L., Greaney, A. J., Zang, T., Muramatsu, H., Lin, P. J. C., Tam, Y. K., Mesin, L., Starr, T. N., Bieniasz, P. D., Pardi, N., Bloom, J. D., and Victora, G. D. (2023) Molecular fate-mapping of serum antibody responses to repeat immunization, *Nature*, **615**, 482-489, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05715-3>.

ANTIGENIC CARTOGRAPHY OF SARS-CoV-2

Review

E. A. Astakhova^{1,2*}, A. A. Morozov^{1,2}, J. D. Vavilova³, and A. V. Filatov^{1,2}

¹ *National Research Center Institute of Immunology, Federal Medical Biological Agency of Russia,
115522 Moscow, Russia; e-mail: ast_kat@mail.ru*

² *Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

³ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia*

Antigenic cartography is a tool for interpreting and visualizing antigenic differences between virus variants based on virus-neutralization data. This approach has been successfully used in influenza vaccine seed strain selection. With the emergence of SARS-CoV-2 variants escaping the vaccine-induced antibody response, adjusting the COVID-19 vaccines has become essential. This review provides information on antigenic differences between SARS-CoV-2 variants obtained by antigenic cartography. Moreover, it explores the potential of antigenic cartography-based methods, such as building antibody landscapes and neutralization breadth gain plots, for a quantitative assessment of the breadth of the antibody response. Understanding the antigenic differences of SARS-CoV-2 and the possibilities of the formed humoral immunity aids in the prompt modification of preventative vaccines against COVID-19.

Keywords: antigenic cartography, SARS-CoV-2, COVID-19, breadth of virus-neutralization

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА S- И N-БЕЛКИ ВИРУСА SARS-CoV-2

© 2024 З.Э. Афридонова¹, А.П. Топтыгина^{1,2*}, И.С. Михайлов³

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора,
125212 Москва, Россия; электронная почта: tortyginaanna@rambler.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Национальный исследовательский университет «МЭИ», 111250 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.09.2023

После доработки 12.10.2023

Принята к публикации 01.11.2023

Пандемия новой коронавирусной инфекции, продолжавшаяся более 3 лет, до сих пор сопровождается частыми мутациями в S-белке вируса SARS-CoV-2 и появлением всё новых вариантов вируса, вызывающих очередные вспышки заболеваемости. Из всех белков коронавирусов наиболее иммуногенными являются S- и N-белки. Целью настоящего исследования было сопоставление особенностей гуморальных и Т-клеточных иммунных ответов на S- и N-белок вируса SARS-CoV-2 у людей с разной историей взаимодействия с этим вирусом. Были обследованы: 27 человек, перенёсших COVID-19; 23 дважды привитых вакциной «Спутник V» и не болевших COVID-19; 22 человека, перенёсших COVID-19 и через 6–12 мес. дважды привитых вакциной «Спутник V», и 25 человек, дважды переболевших COVID-19. Уровень антител определяли иммуноферментным методом, клеточный иммунитет определяли по экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах после распознавания ими антигенов вируса SARS-CoV-2. Показано, что гуморальный иммунный ответ на N-белок формируют преимущественно короткоживущие плазмocyты, синтезирующие IgG-антитела всех четырёх субклассов с постепенным переключением с IgG3 на IgG1. Ответ на S-белок представлен как короткоживущими плазмocyтами, формирующимися в начале ответа (IgG1- и IgG3-субклассы), так и долгоживущими (IgG1-субкласс). Динамика уровня антител, синтезируемых короткоживущими плазмocyтами, описывается распределением Фишера, а для описания уровня антител, синтезируемых долгоживущими плазмocyтами, более подходит распределение Эрланга. Уровень антител в группах с гибридным иммунитетом превышает таковой в группе с поствакцинальным иммунитетом, а в группе с прорывным иммунитетом – превышает уровень как для постинфекционного, так и поствакцинального иммунитета. Клеточный иммунитет на S- и N-белки вируса SARS-CoV-2 несколько различается в зависимости от способов его индукции (прививка или заболевание). Важно, что гетерологичные иммунные ответы CD8⁺ Т-клеток, сформированные на N-белок других коронавирусов, могут участвовать в иммунной защите от SARS-CoV-2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: COVID-19, SARS-CoV-2, N-белок, S-белок, антитела, вакцинация, гибридный иммунитет, клеточный иммунитет, прорывной иммунитет.

DOI: 10.31857/S0320972524050086 EDN: YOVYJM

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия новой коронавирусной инфекции, продолжавшаяся более 3 лет, до сих пор сопровождается частыми мутациями в S-белке коронавируса острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) и появлением всё новых вариантов этого

вируса, вызывающих очередные вспышки заболеваемости. Это обстоятельство позволяет предполагать, что эта инфекция останется с человечеством ещё на многие годы, вероятно, став менее тяжёлой, но тем не менее борьба с ней может превратиться в постоянную проблему [1]. Из всех белков коронавирусов наиболее иммуногенными

Принятые сокращения: BAU – антитело-связывающая единица; SARS-CoV-2 – коронавирус острого респираторного синдрома 2; COVID-19 – коронавирусное инфекционное заболевание 2019 года.

* Адресат для корреспонденции.

являются S- и N-белки [2], то есть в ответ на вирус SARS-CoV-2 генерируются высокие уровни антител на S- и N-белки [3, 4]. Разработанные на данный момент вакцины нацелены на S-белок, поскольку антитела к нему являются протективными, однако частые мутации в этом белке привели к падению эффективности соответствующих вакцин [5, 6]. Увлечение исследователей S-белком оставило N-белок несколько в тени, тем не менее он высококонсервативен среди коронавирусов и является одним из наиболее распространённых структурных белков в инфицированных вирусом клетках [7]. Основная функция N-белка заключается в упаковке геномной РНК вируса в длинный спиральный рибонуклеокапсидный комплекс и участия в сборке вириона за счёт взаимодействия с вирусным геномом и мембранным белком М [8]. Расположение N-белка в центре вириона коронавируса объясняет, почему даже высокий уровень антител к этому белку не является протективным: антитела не могут попасть внутрь собранного вириона и связаться с N-белком, и эффекты анти-N антител недостаточно изучены к настоящему времени [9]. В то же время N-белок является репрезентативным антигеном для Т-клеточного ответа. Показано, что Т-клеточные ответы формировались на вирус SARS-CoV-1 и сохранялись многие годы [10, 11, 12]. Опираясь на высокую консервативность N-белка, были обнаружены эпитопы для Т-клеточных ответов, перекрёстные между SARS-CoV-2 и другими коронавирусами человека [13].

Целью настоящего исследования было сопоставление особенностей гуморальных и Т-клеточных иммунных ответов на S- и N-белок вируса SARS-CoV-2 у людей с разной историей взаимодействия с этим вирусом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Когорта обследованных людей и сбор биологического материала. В простое открытое сравнительное исследование были включены 97 взрослых добровольцев в возрасте 18–73 лет. Из них 27 человек имели в анамнезе COVID-19 (коронавирусное инфекционное заболевание 2019 года) в лёгкой или среднетяжёлой форме, подтверждённое хотя бы одним положительным ПЦР-тестом. Эти люди были обследованы 4–7 раз через 1–18 мес. от начала заболевания и составили группу 1 (постинфекционный иммунитет). Группу 2 (поствакцинальный иммунитет) составили 23 человека, дважды привитых вакциной «Спутник V» и не болевших COVID-19; в группу 3 вошли 22 человека, перенёвших COVID-19 и через 6–12 мес. дважды привитых вакциной «Спутник V» (гибридный иммунитет), а в группу 4 (прорывной иммунитет) были включены

25 человек, дважды переболевших COVID-19: первый раз в 2020–2021 гг. и повторно в 2022 г. (штамм омикрон). Кровь для исследования брали из локтевой вены в две вакуумные пробирки по 4 мл каждая: с гепарином – для изучения клеточного иммунитета, и с активатором свёртывания и гелем – для выделения сыворотки крови для оценки гуморального иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (протокол № 58 от 15.12.2021). От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Определение уровней антител. Сыворотку крови получали центрифугированием, разливали в пробирки типа «Эпшендорф» и хранили при -70°C до исследования. Антитела определяли иммуноферментным методом, к S-белку вируса SARS-CoV-2 – с помощью тест-систем «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия), а к N-белку – на тест-системе «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия). Субклассы IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 исследовали с помощью ранее разработанной нами модификации ИФА-метода [14, 15]. Кратко: мы использовали 96-луночные панели с сорбированным полноразмерным S-антигеном вируса SARS-CoV-2 от коммерческого набора «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест») или с N-белком вируса SARS-CoV-2 от коммерческого набора «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера). Вместо анти-IgG конъюгатов, входящих в набор, использовали меченные пероксидазой анти-IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 моноклональные антитела («Полигност», Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Все остальные этапы определения антител проводили согласно инструкции к наборам.

Определение клеточного иммунитета. Из пробы гепаринизированной крови в стерильных условиях методом градиентного центрифугирования ($\rho = 1,077$; ООО «ПанЭко», Россия) выделяли фракцию мононуклеаров и отмывали от тромбоцитов. Мононуклеары в среде RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамина, гентамицина и 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «ПанЭко») вносили в количестве $2,5 \times 10^5$ в лунки 96-луночной стерильной панели, добавляли раствор моненсина в конечной концентрации 10 мкМ и моноклональные антитела к антигену CD107a-PE-Cy5 в конечном разведении 1 : 100 (контрольная проба), конечный объём в лунке – 200 мкл. Для стимуляции мононуклеаров S- и N-антигенами вируса SARS-CoV-2 использовали лунки панелей от наборов для определения антител к S- и N-белку вируса SARS-CoV-2 методом ИФА, в которых на дно лунок сорбирован S- или N-белок вируса SARS-CoV-2.

Был использован набор «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест») для стимуляции S-белком и «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера) для стимуляции N-белком вируса SARS-CoV-2. Поскольку лунки панелей для ИФА-наборов не стерильны, перед началом эксперимента используемые стрипы были простерилизованы с помощью 30-мин ультрафиолетового облучения. Опытные и контрольные пробы инкубировали при 37 °C во влажной атмосфере и 5% CO₂ 20 ч, переносили в пробирки для цитофлуориметрии, отмывали раствором CellWash (300 g, 5 мин), окрашивали антителами к антигену CD8-FITC 20 мин в темноте при 4 °C и снова отмывали при тех же условиях. Иммунофенотипирование проводили с помощью проточного цитометра BD FACS CantoII (технологии и программное обеспечение – «Becton Dickinson», США). При анализе результатов выделяли лимфоидный гейт, а в нём – гейт лимфоцитов, высокоэкспрессирующих антиген CD8 (CD8^{high}). Затем подсчитывали процент клеток CD8^{high}CD107a⁺, представляющих собой цитотоксические Т-лимфоциты, распознанные S- или N-антигеном вируса SARS-CoV-2 и ответивших на это распознавание выбросом содержимого цитотоксических гранул (цитотоксической атаккой). Границей спонтанной экспрессии молекулы CD107a на CD8^{high} лимфоцитах считали уровень 1% [15].

Статистический анализ. Для статистической обработки полученных результатов было проведено исследование на нормальность распределения методом Колмогорова–Смирнова. Для параметров уровней анти-S и анти-N IgG-антител гипотеза о нормальности распределения не была подтверждена. Количество антител выражали в ВАУ/мл (ВАУ – антитело-связывающая единица). Уровень антител представлен в виде медианы (1–3 квартиль): Me (LQ–HQ). Различия между группами оценивали методом Манна–Уитни. Для параметров процентного уровня субклассов IgG и клеточного иммунитета была подтверждена гипотеза о нормальности распределения. Результаты оценки процентного уровня субклассов IgG и клеточного иммунитета представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки (M ± SE). Корреляции оценивали методом Пирсона. Различия при $p < 0,05$ считали значимыми.

Математическое моделирование. Проведена аппроксимация результатов измерения уровня IgG-антител к S- и N-белку вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени с начала заболевания. Наблюдаемые зависимости изменения концентрации антител от времени соответствовали распределению, которое обладает следующими характеристиками: начальное значение соответствует началу координат, затем следует резкий рост функции до определённого максимального значения, после этого происходит плавный спад

значения рассматриваемой величины. Как известно из математической статистики, такой характер зависимости описывается распределениями Фишера и Эрланга. Эти функциональные зависимости широко известны в статистическом анализе, теории вероятностей и в биологии и относятся к группе распределений Пирсона III типа (гамма-распределения). В нашем исследовании рассматриваются две из них: распределение Эрланга (1)

$$f(x; k, \lambda, c) = c \cdot \frac{\lambda^k \cdot x^{k-1} \cdot e^{-\lambda x}}{(k-1)!}, \quad (1)$$

где параметр k называется параметром формы, а параметр λ называется параметром скорости. Также был введён нормировочный коэффициент c для масштабирования значений функции. Комбинация значений параметров k и λ отвечает за положение экстремума графика, значение функции в точке экстремума и плавность перегиба функции.

Второе рассмотренное распределение – распределение Фишера (2)

$$f(x; n, m, c) = \begin{cases} c \cdot \frac{x^{\frac{n}{2}-1}}{\left(1 + \frac{n \cdot x}{m}\right)^{\frac{n+m}{2}}} & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}, \quad (2)$$

где коэффициенты n и m влияют на форму графика, положение максимума функции и его значение, коэффициент c также является нормировочным.

При этом распределение Эрланга характеризуется более плавным ростом и падением значений функции, в то время как распределение Фишера позволяет описывать функции, значение которых достаточно резко падает после достижения максимума и затем плавно асимптотически стремится к нулю.

В данном исследовании выбор общего вида аппроксимирующей функции осуществлялся в зависимости от характера наблюдаемых зависимостей. Был организован алгоритмический процесс перебора значений коэффициентов для достижения наилучшей оценки среднеквадратического отклонения результирующей кривой аппроксимации от экспериментальных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Динамика уровней IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19 людей (группа 1) представлена на рис. 1. На рисунке видно, что IgG-антитела, распознающие N-белок коронавируса (линия 1), появлялись раньше, и их уровень нарастал в крови быстрее, имел острый пик со значением 1033,2 (807,04–1215,6) ВАУ/мл через 3 мес. от начала заболевания и быстро снижался до уровня 75,5 (25,5–182,2) ВАУ/мл через 18 мес. при значении «cut off»

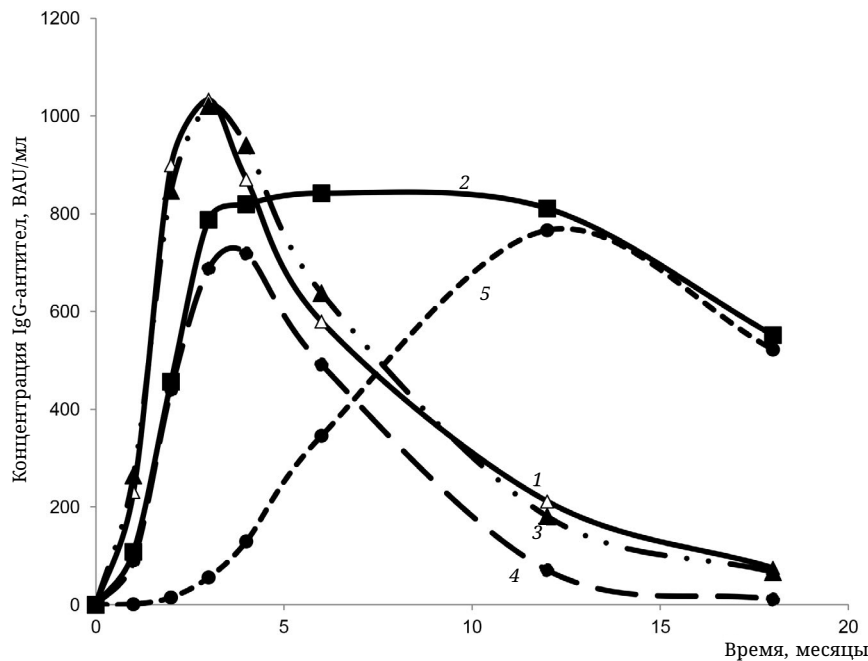


Рис. 1. Уровень IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2. Кривые: 1 – IgG-антитела к N-белку вируса SARS-CoV-2 (экспериментальные данные); 2 – IgG-антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2 (экспериментальные данные); 3 – аппроксимация Фишера уровня IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 (краткоживущие плазмоциты); 4 – аппроксимация Фишера уровня IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 (краткоживущие плазмоциты); 5 – аппроксимация Эрланга уровня IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 (долгоживущие плазмоциты)

набора 33,5 ВАУ/мл. В то же время уровень анти-S антител (линия 2) нарастал в крови медленнее, выходил на плато после 4 мес. от начала заболевания – 819,5 (614,7–1538,3) ВАУ/мл – и держался в течение года, снизившись к сроку 18 мес. до 551,6 (372,5–757,5) ВАУ/мл. При этом кривая, отражающая концентрацию анти-N антител, хорошо аппроксимируется с помощью распределения Фишера по формуле (3):

$$f_{N-белок}(x) = 8 \cdot 10^8 \cdot \frac{(0,2x)^{5,5}}{(1 + 0,52x)^9}. \quad (3)$$

На рис. 1 результат аппроксимации представлен штрих-пунктирной линией 3.

В табл. 1 сопоставлены данные, полученные при анализе уровня IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19 лиц и результаты расчётов по формуле (3). Из таблицы видно, что экспериментальные и расчётные данные различаются не более чем на 15%, при этом результаты расчётов строго лежат в интервале LQ-HQ для всех исследованных временных точек.

Попытки аппроксимации кривой 2 каким-то одним известным распределением не увенчались

Таблица 1. Сопоставление экспериментальных данных об уровне IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших лиц (ВАУ/мл) и результатов расчётов по формуле (3)

Срок от начала заболевания	N-белок (Ме (LQ-HQ))	Расчёт (формула Фишера) (3)	Процент отклонения расчётного значения от экспериментального
1 мес.	230,9 (118,4–430,6)	264,34	–14,5%
2 мес.	899,2 (497,8–1225,9)	846,74	5,83%
3 мес.	1033,2 (807,04–1215,6)	1020,38	1,2%
4 мес.	870,1 (319,7–3790,36)	940,00	–8,0%
6 мес.	579,3 (374,3–2524,9)	637,55	–10,1%
12 мес.	211,5 (116,9–507,3)	180,55	14,6%
18 мес.	75,5 (25,5–182,2)	66,76	11,6%

успехом. Мы предположили, что кривая, отражающая концентрацию анти-S антител, является результирующей двух процессов: формирования раннего антительного ответа на S-белок, представленного короткоживущими плазмócитами, и формирования антител долгоживущими плазмócитами (на рисунке эти процессы обозначены штрих-пунктирными линиями 4 и 5). Процесс формирования и гибели этих плазмócитов отражается на концентрации производимых ими антител и обладает следующими свойствами: начальное значение помещено в начало координат, затем следует резкий рост функции до определённого максимального значения, после этого происходит плавный спад значения рассматриваемой величины. Как известно из математической статистики, такой характер распределения описывается распределениями Фишера и Эрланга. Таким образом, необходимо было настроить два распределения данного вида, чтобы их сумма соответствовала кривой 2 на графике рис. 1. При этом образование антител ранними продуцентами аппроксимируется также с помощью распределения Фишера по формуле (4) (кривая 4 на рис. 1):

$$f_{S\text{-белок Фишер}}(x) = 7 \cdot 10^5 \cdot \frac{(0,2x)^{4,5}}{(1+0,66x)^{13,75}} \cdot \tag{4}$$

Тогда как кривая, описывающая синтез антител долгоживущими плазмócитами, аппроксимируется распределением Эрланга (5) (кривая 5 на рис. 1):

$$f_{S\text{-белок Эрланг}}(x) = 1100 \cdot \frac{3,1^{5,1} \cdot (0,11x)^{4,1} \cdot e^{-3,1x}}{4!} \cdot \tag{5}$$

При поиске наилучших значений коэффициентов аппроксимирующих кривых использовались точки данных за исключением точки номер 6, соответствующей значению срока от начала заболевания 6 мес. Данная точка использовалась в качестве тестовой, для избежания переобучения модели.

В табл. 2 сопоставлены экспериментальные данные, полученные при определении уровней анти-S IgG-антител, и результаты аппроксимации по формулам (4) и (5). Из таблицы видно, что сумма результатов расчётов по формулам (4) и (5) отклоняется от экспериментально полученных данных не более чем на 13% и строго укладывается в расчётный интервал LQ-HQ для всех временных точек. В процессе выбора оптимальных коэффициентов для формул (3), (4) и (5) с целью оценки качества применённых моделей были рассчитаны метрики качества: квадратный корень из среднеквадратичной ошибки (RMSE) и средняя абсолютная процентная ошибка (MAPE). При моделировании процесса изменения уровня IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени от начала заболевания при использовании коэффициентов, представленных в формуле (3), были получены минимальные значения метрик качества. RMSE составил 16,505, а MAPE – 9,408%, что свидетельствует о хорошем качестве предложенной модели.

Таблица 2. Сопоставление экспериментальных данных уровня IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших лиц (BAU/мл) и результатов расчётов по формулам (4) и (5)

Срок от начала заболевания	S-белок (Ме (LQ-HQ))	Расчёт (формула Фишера) (4)	Расчёт (формула Эрланга) (5)	Сумма расчётов по формулам (4) и (5)	Процент отклонения суммы расчётных значений от экспериментального
1 мес.	103,3 (73,37–189,1)	89,60	1,23	90,83	12,1%
2 мес.	456,2 (199,2–1027,1)	439,30	14,96	454,26	0,4%
3 мес.	787,4 (356,1–1190,2)	687,89	56,07	743,96	5,5%
4 мес.	819,5 (614,7–1538,3)	718,62	129,69	848,31	–3,5%
6 мес.	841,8 (614,9–1420,7)	491,38	345,69	837,07	0,6%
12 мес.	810,9 (504,5–1215,3)	70,82	766,21	837,03	–3,2%
18 мес.	551,6 (372,5–757,5)	10,98	522,10	533,08	3,4%

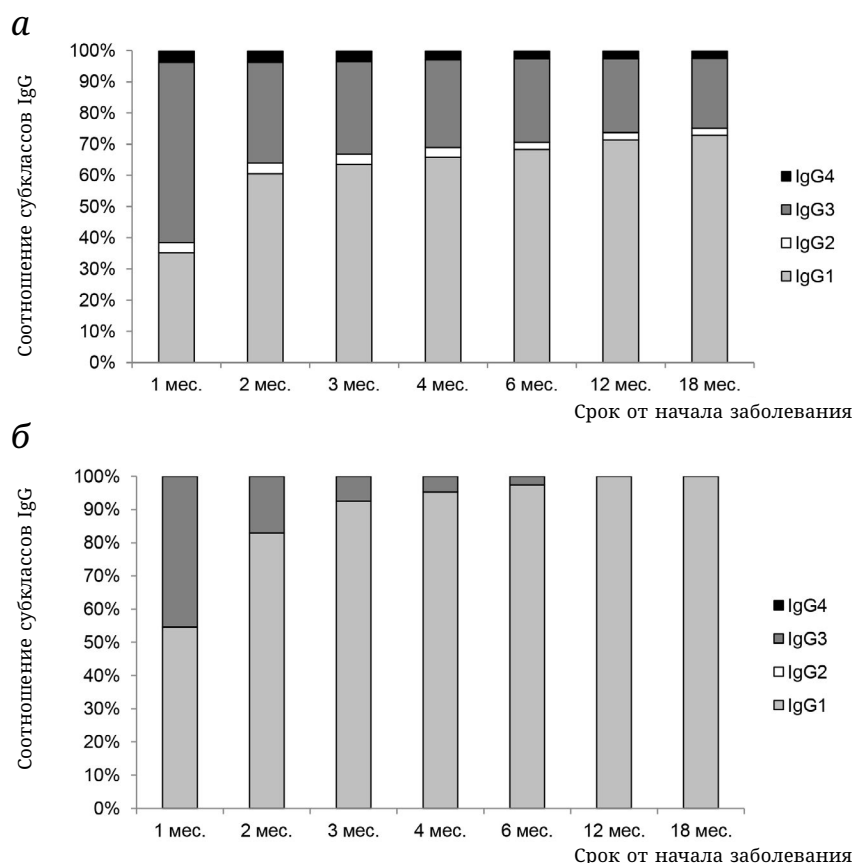


Рис. 2. Динамика спектра субклассов IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2. а – N-белок вируса SARS-CoV-2; б – S-белок вируса SARS-CoV-2

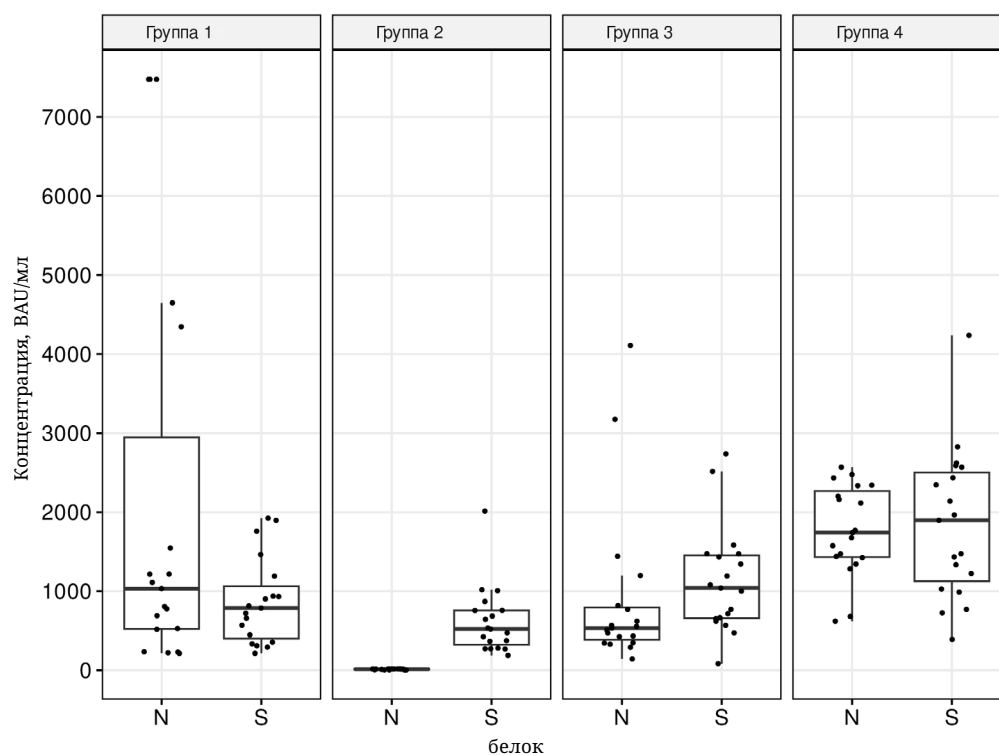


Рис. 3. Сопоставление уровней IgG-антител к N- и S-белку у переболевших COVID-19 (группа 1), дважды привитых «Спутник V» (группа 2), переболевших, а после привитых «Спутник V» (группа 3) и дважды переболевших COVID-19 (группа 4)

Для моделирования изменений уровня IgG-антител к S-белку в зависимости от времени, прошедшего от начала заболевания при использовании коэффициентов, представленных в формулах (4) и (5), были также получены минимальные значения метрик качества. RMSE составил 8,949, а MAPE – 4,096%, что свидетельствует о высоком качестве предложенной модели.

Динамика спектра субклассов IgG-антител, специфичных к N- и S-белку вируса SARS-CoV-2, представлена на рис. 2. Интересно, что на N-белок вырабатывались антитела всех 4 субклассов, при этом IgG2 и IgG4 были минорными, тогда как на S-белок были обнаружены антитела только IgG1- и IgG3-субклассов, а IgG2 и IgG4 вообще не выявлялись. В гуморальном ответе на оба белка отмечается одна и та же тенденция: специфические антитела субкласса IgG3 постепенно замещаются на IgG1, что говорит о созревании антител, однако скорость и полнота такого замещения различаются. Так, при ответе на S-белок уже через месяц после заболевания $54,6 \pm 2,7\%$ IgG-ответа представлено IgG1-субклассом, тогда как на N-белок на этом сроке выявляется только $35,2 \pm 1,1\%$ антител IgG1-субкласса. В течение года уровень IgG1-антител на N-белок повышался, составил $71,38 \pm 3,2\%$ от всего IgG-ответа и сохранялся на этом уровне ещё 6 мес. За это же время и у тех же людей IgG1-ответ на S-белок быстро повышался. Через 6 мес. он уже составлял $97,4 \pm 0,5\%$ всего IgG-ответа, а к 12 мес. достиг 100% у всех обследованных и сохранялся на этом уровне ещё 6 мес. наблюдения.

На рис. 3 представлено сопоставление уровней IgG-ответов на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2 для 4 исследованных групп, для группы 1 – через 3 мес. после начала заболевания, для группы 2 и 3 – через 3 мес. после второй дозы вакцины, для группы 4 – через 3 мес. после начала повторного заболевания (штамм омикрон).

Из рисунка видно, что уровень анти-N и анти-S антител варьировал в разных группах. Так, у пере-

нёших COVID-19 однократно (группа 1) уровень анти-N антител сильно варьировал, но не превышал значимо уровень анти-S антител. У вакцинированных «Спутник V» (группа 2) анти-N антител обнаружено не было, что вполне объяснимо отсутствием N-белка в составе этой вакцины. В группе 3 с гибридным иммунитетом (вакцинация через 6–12 мес. после перенесённого COVID-19) уровень IgG-антител к N-белку был значимо ниже ($p = 0,018$), чем уровень антител к S-белку. Кроме того, уровень анти-S антител был значимо выше ($p = 0,004$), чем в группе 2. В группе 4 с прорывным иммунитетом (дважды перенёвшие COVID-19) отмечается значимый прирост как анти-S антител ($p = 0,0006$), так и анти-N антител ($p = 0,042$) по сравнению с группой 1.

На рис. 4 представлены результаты оценки вклада антител субкласса IgG1 в общий ответ IgG на N- и S-белок коронавируса. Интересно, что все IgG, отвечающие на S-белок, были представлены IgG1-субклассом во всех 4 группах. В то же время IgG1-ответ на N-белок составил $72,8 \pm 3,5\%$ в группе 1, вовсе отсутствовал в группе 2, так как у вакцинированных не было ответа на этот белок, в группе 3 значимо не отличался от группы 1 ($75,9 \pm 3,8\%$), что объяснимо, поскольку этот ответ сформировался на первичное заболевание COVID-19, а при последующей вакцинации в составе вакцины отсутствовал N-белок. В группе 4 (повторно переболевших COVID-19) процент IgG1-антител достиг $99,1 \pm 0,3\%$, значимо отличаясь от уровней в группах 1 и 3 ($p < 0,01$), то есть при вторичном ответе на N-белок продолжилось созревание анти-N антител.

Результаты исследования клеточного иммунного ответа на N- и S-антигены вируса SARS-CoV-2 представлены на рис. 5. Из рисунка видно, что клеточный ответ на S-белок значимо не различался между исследованными группами, хотя можно отметить тенденцию к его повышению в группе с прорывным иммунитетом. Клеточный ответ на N-белок был значимо ниже в группе 3,

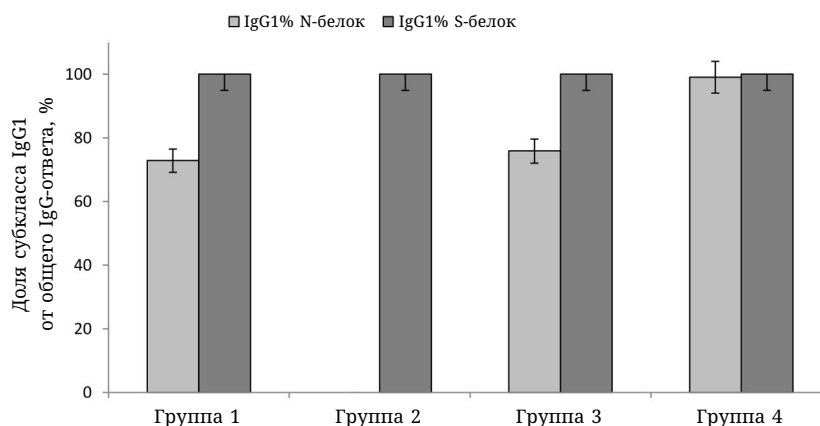


Рис. 4. Вклад субкласса антител IgG1 в общий IgG-ответ на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2

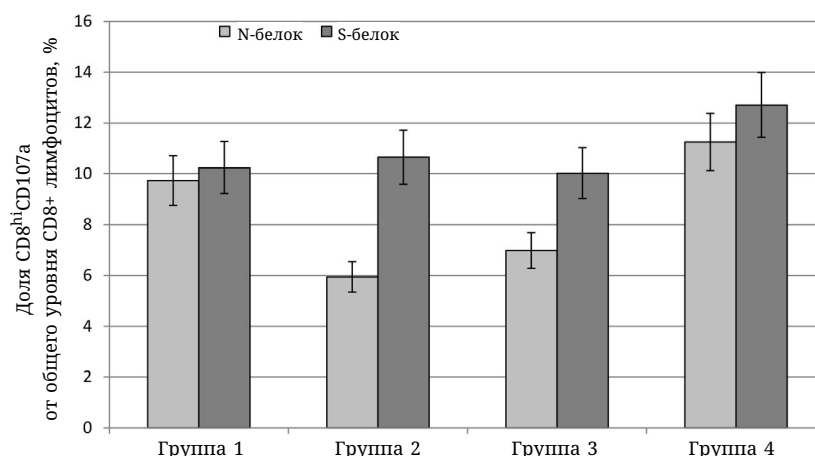


Рис. 5. Клеточный иммунный ответ на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2

чем в группах 1 и 4 ($p < 0,05$). Мы ожидали, что в группе 2 не будет клеточного ответа на N-белок (как было при исследовании гуморального). Такие результаты были получены для 17 человек данной группы. Однако у 6 человек, привитых «Спутник V», не имевших антител к N-белку, а также не имевших антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 до вакцинации, проявился высокий клеточный ответ на N-белок, что дало в среднем уровень $5,94 \pm 2,3\%$ для группы 2. Выявлена сильная положительная корреляция между уровнями клеточных ответов на N- и S-белок ($r = 0,937$). Также выявлена слабая положительная корреляция между гуморальным и клеточным ответом на S-белок ($r = 0,358$) и отсутствие корреляции между аналогичными параметрами для N-белка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований удалось показать, что концентрация IgG-антител к N-белку быстрее нарастает в крови переболевших COVID-19, чем уровень IgG-антител к S-белку. Уровень анти-N антител демонстрирует более высокий и острый пик и более быстрое снижение. Подобные результаты были получены и другими независимыми исследователями [16]. Кривая изменения концентрации анти-N антител хорошо аппроксимируется с помощью распределения Фишера (см. рис. 1), которое является частным случаем распределения Пирсона. В рассматриваемом случае на концентрацию антител в крови влияют два независимых события: формирование ранних, короткоживущих плазмочитов, синтезирующих эти антитела, и гибель этих плазмочитов с течением времени, что приводит к снижению концентрации антител. Уровень анти-S антител изменялся во времени несколько иначе. Их концентрация нарастала медленнее, а вместо острого пика давала

плато продолжительностью до года, после чего отмечалось постепенное снижение уровня антител. Попытки аппроксимировать такую кривую одной функцией не увенчались успехом. Мы считаем, что результирующая кривая концентрации анти-S антител является суммой двух независимых процессов. Первый процесс – формирование ранних короткоживущих плазмочитов, синтезирующих анти-S антитела – подобен таковому при синтезе анти-N антител и тоже хорошо аппроксимируется распределением Фишера. Интересно, что пики кривых, описывающих формирование антител короткоживущими плазмочитами для анти-N и анти-S антител, приходятся на срок 3 мес. после начала заболевания, и во второй части эти кривые идут практически параллельно друг другу, что свидетельствует об идентичности соответствующих процессов (см. рис. 1). Второй процесс – формирование долгоживущих плазмочитов, также синтезирующих анти-S антитела. Он более растянут во времени и аппроксимируется распределением Эрланга (γ -распределение). Эта функция также является частным случаем распределения Пирсона и также применима для описания результата изменения во времени двух непрерывных независимых событий. В данном случае это формирование и гибель долгоживущих плазмочитов, продуцирующих анти-S антитела, что и отражается на концентрации этих антител в крови.

Известно, что короткоживущие плазмочиты продуцируют преимущественно антитела субкласса IgG3, а долгоживущие плазмочиты – в основном IgG1-антитела [17]. Интересно, что в ответ на N-белок формируются антитела преимущественно IgG3-субкласса, и переключение на IgG1-ответ происходит медленно, достигая уровня около 70% через 6 мес. после начала заболевания и оставаясь на этом уровне даже через 1,5 года. Похожие результаты были получены и другими исследователями [18]. В то же время при ответе на S-белок

такое переключение происходит значительно быстрее, превышая уровень 90% уже через 3 мес. после начала заболевания и достигая в дальнейшем уровня 100%. Возможно, эти различия связаны с тем, что в ответе на N-белок преобладают короткоживущие плазмциты, а в ответ на S-белок формируются также и долгоживущие плазмциты. Весьма вероятно, что такие различия в ответах на два высокоиммуногенных белка вируса SARS-CoV-2 связаны с особенностями функций этих белков. Так, N-белок находится внутри вириона и активно функционирует на стадии репликации вируса. При этом анти-N антитела не являются протективными [9]. Напротив, S-белок находится на поверхности вириона и отвечает за прикрепление вируса и слияние с инфицируемой клеткой хозяина, поэтому антитела к нему блокируют вирус SARS-CoV-2 [19].

Если наши аппроксимации изменения уровня антител верны, то, согласно функции Эрланга, через 2 года после заболевания уровень анти-S антител должен был бы упасть чуть ниже 300 BAU/мл, через 3 года составил бы около 40 BAU/мл, а через 4 года опустился бы ниже 10 BAU/мл, что считается значением «cut off» между отрицательным и положительным уровнем этих антител. Похожая динамика уровня антител наблюдалась у пациентов, перенёсших заболевания вирусами SARS-CoV-1 и MERS [20]. Возможно, всё так и было бы, если бы вирус SARS-CoV-2 не мутировал столь часто и элиминировался бы из человеческой популяции. К сожалению, в реальности мы имеем иную картину. Вирус SARS-CoV-2 активно мутирует, и большинство мутаций приходится на S-белок, тогда как N-белок остаётся наиболее консервативным [21]. Такие мутации позволяют вирусу уклоняться от антительной защиты, что приводит к повторным заболеваниям. Кроме того, активная вакцинация населения также внесла свои коррективы в продолжительность антительной защиты от вируса SARS-CoV-2. Мы исследовали 4 группы людей, имевших разную историю контактов с вирусом SARS-CoV-2. Оказалось, что по уровню анти-S антител и IgG-субклассам дважды привитые вакциной «Спутник V» не отличаются от переболевших COVID-19. А вот в группе дважды переболевших COVID-19 (в начале пандемии и повторно вариантом омикрон) уровень и анти-N, и анти-S антител оказался значительно выше, чем у переболевших однократно. Интересно, что анти-N антитела не только увеличились в количестве, но и достигли практически 100% по уровню антител IgG1-субкласса. Это говорит о том, что хотя уровень анти-N антител, а следовательно, и плазмцитов, их синтезирующих, на момент повторного заболевания был уже очень низким, В-клетки памяти ответили вторичным иммунным ответом на повторное распознавание

N-белка, в результате чего произошло дополнительное созревание анти-N антител. Анти-S антитела продемонстрировали высокий бустер-эффект при повторном заболевании.

Клеточный иммунный ответ CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов формировался как на S-, так и на N-белок. Показано, что Т-клеточные ответы формируются не только на структурные, но и на служебные белки вируса SARS-CoV-2 [22]. Уровень ответов на S-белок в четырёх исследованных нами группах значимо не различался. Это свидетельствует о том, что CD8⁺ лимфоциты активно вовлекаются в иммунный ответ как на заболевание, так и на вакцинацию от COVID-19. Так, было показано, что предсуществующие Т-клетки, реагирующие на белки вируса SARS-CoV-2, способны предотвратить развитие клинической картины заболевания [23]. Уровень клеточного ответа на N-белок в группе с гибридным иммунитетом (переболевшие, а позже привитые «Спутник V») оказался значимо ниже, чем в группе переболевших, что объясняется отсутствием N-белка в составе этой вакцины. Неожиданным было обнаружение высокого клеточного иммунного ответа на N-белок у 6 человек в группе привитых. При этом у них не было анти-N антител, и до вакцинации также не было выявлено антител к S-белку вируса SARS-CoV-2. Это может быть связано с гетерологичным иммунным ответом: вероятно, эти люди ранее переболели одним из простудных коронавирусов, которые и до 2019 г. свободно циркулировали в человеческой популяции. N-Белок является чрезвычайно консервативным, и имеются перекрёстные эпитопы для Т-клеточных ответов у разных коронавирусов [13]. Для Т-клеточного ответа любой вирусный белок может быть антигеном, вызывающим атаку цитотоксических клеток. Возможно, наличие гетерологичных иммунных ответов на N-белок простудных коронавирусов обеспечивало защиту у людей, болевших COVID-19 легко или бессимптомно. С другой стороны, нельзя исключить, что эти 6 человек перенесли инфицирование SARS-CoV-2 бессимптомно и без формирования IgG, но ответили формированием Т-клеточного ответа. Такие случаи описаны в литературе [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведённого исследования удалось показать, что гуморальные иммунные ответы на S- и N-белки вируса SARS-CoV-2 формируются независимо друг от друга. При этом в ответ на N-белок формируются преимущественно короткоживущие плазмциты, синтезирующие IgG-антитела всех четырёх субклассов с постепенным переключением с IgG3-

на IgG1-ответ (около 70%). Ответ на S-белок представлен, по-видимому, как короткоживущими плазмócитами, формирующимися в начале ответа, так и долгоживущими плазмócитами. Короткоживущие плазмócиты отвечают на S-белок субклассами антител IgG1 и IgG3, а долгоживущие – субклассом IgG1. Динамика уровня антител, синтезируемых короткоживущими плазмócитами, описывается распределением Фишера, а для описания уровня антител, синтезируемых долгоживущими плазмócитами, более подходит распределение Эрланга. Уровень антител в группах с гибридным иммунитетом превышает таковой в группе с поствакцинальным иммунитетом, а в группе с прорывным иммунитетом – превышает как постинфекционный, так и поствакцинальный иммунитет. Клеточный иммунитет на S- и N-белки вируса SARS-CoV-2 несколько различается в зависимости от способов индукции этого иммунитета (прививка или заболевание). Важно, что гетерологичные иммунные ответы CD8⁺ Т-клеток, сформированные на N-белок других коронавирусов, могут участвовать в иммунной защите от SARS-CoV-2.

Вклад авторов. Афридонова З.Э. – проведение экспериментов; Топтыгина А.П. – концепция, руководство работой, проведение экспериментов, обсуждение результатов, написание и редактирование текста; Михайлов И.С. – математическое моделирование, обсуждение результатов исследования.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИОКТР 121021100125-4 от 10.02.2021 г.

Благодарности. Авторы выражают благодарность ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, РФ за предоставление тест-наборов «N-CoV-2-IgG PS».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Markov, P. V., Ghafari, M., Beer, M., Lythgoe, K., Simmonds, P., Stilianakis, N. I., and Katzourakis, A. (2023) The evolution of SARS-CoV-2, *Nat. Rev. Microbiol.*, **21**, 361-379, <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00878-2>.
2. Meyer, B., Drosten, C., and Müller, M. A. (2014) Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls, *Virus Res.*, **194**, 175-183, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.018>.
3. Sun, B., Feng, Y., Mo, X., Zheng, P., Wang, Q., Li, P., Peng, P., Liu, X., Chen, Z., Huang, H., Zhang, F., Luo, W., Niu, X., Hu, P., Wang, L., Peng, H., Huang, Z., Feng, L., Li, F., Zhang, F., Li, F., Zhong, N., and Chen, L. (2020) Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients, *Emerg. Microbes Infect.*, **9**, 940-948, <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1762515>.
4. Qu, J., Wu, C., Li, X., Zhang, G., Jiang, Z., Li, X., Zhu, Q., and Liu, L. (2020) Profile of immunoglobulin G and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), *Clin. Infect. Dis.*, **71**, 2255-2258, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa489>.
5. Rayati Damavandi, A., Dowran, R., Al Sharif, S., Kashanchi, F., and Jafari, R. (2022) Molecular variants of SARS-CoV-2: antigenic properties and current vaccine efficacy, *Med. Microbiol. Immunol.*, **211**, 79-103, <https://doi.org/10.1007/s00430-022-00729-6>.
6. Wang, Q., Ye, S. B., Zhou, Z. J., Song, A. L., Zhu, X., Peng, J. M., Liang, R. M., Yang, C. H., Yu, X. W., Huang, X., Yu, J., Qiu, Y., and Ge, X. Y. (2023) Key mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 affecting neutralization resistance and viral internalization, *J. Med. Virol.*, **1**, e28407, <https://doi.org/10.1002/jmv.28407>.
7. He, Y., Zhou, Y., Wu, H., Kou, Z., Liu, S., and Jiang, S. (2004) Mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5309-5314, <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5309-5314.2004>.
8. Masters, P. S., and Sturman, L. S. (1990) Background Paper Functions of the Coronavirus Nucleocapsid Protein, in *Coronaviruses and Their Diseases*, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 235-238.
9. Batra, M., Tian, R., Zhang, C., Clarence, E., Sacher, C. S., Miranda, J. N., De La Fuente, J. R. O., Mathew, M., Green, D., Patel, S., Bastidas, M. V. P., Haddadi, S., Murthi, M., Gonzalez, M. S., Kambali, S., Santos, K. H. M., Asif, H., Modarresi, F., Faghihi, M., and Mirsaeidi, M. (2021) Role of IgG against N-protein of SARS-CoV2 in COVID19 clinical outcomes, *Sci. Rep.*, **11**, 3455, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83108-0>.
10. Zhou, R., To, K. K., Wong, Y. C., Liu, L., Zhou, B., Li, X., Huang, H., Mo, Y., Luk, T. Y., Lau, T. T., Yeung, P., Chan, W. M., Wu, A. K., Lung, K. C., Tsang, O. T., Leung, W. S., Hung, I. F., Yuen, K. Y., and Chen, Z. (2020) Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses, *Immunity*, **53**, 864-877.e865, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.026>.

11. Ng, O. W., Chia, A., Tan, A. T., Jadi, R. S., Leong, H. N., Bertoletti, A., and Tan, Y. J. (2016) Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection, *Vaccine*, **34**, 2008-2014, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.063>.
12. Le Bert, N., Tan, A. T., Kunasegaran, K., Tham, C. Y. L., Hafezi, M., Chia, A., Chng, M. H. Y., Lin, M., Tan, N., Linster, M., Chia, W. N., Chen, M. C., Wang, L.-F., Ooi, E. E., Kalimuddin, S., Tambyah, P. A., Low, J. G.-H., Tan, Y.-J., and Bertoletti, A. (2020) SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls, *Nature*, **584**, 457-462, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>.
13. Oliveira, S. C., de Magalhães, M. T. Q., and Homan, E. J. (2020) Immunoinformatic analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and identification of COVID-19 vaccine targets, *Front. Immunol.*, **11**, 587615, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587615>.
14. Топтыгина А. П., Пухальский А. Л., Мамаева Т. А., Алешкин В. А. (2004) Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь, *Бюлл. Эксп. Биол.*, **137**, 293-295, <https://doi.org/10.1023/B:BEVM.0000031564.27747.b4>.
15. Топтыгина А. П., Семикина Е. Л., Закиров Р. Ш., Афридонова З. Э. (2022) Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19, *Инфекц. Иммуно.*, **12**, 495-504, <https://doi.org/10.15789/2220-7619-COT-1809>.
16. Ren, L., Zhang, L., Chang, D., Wang, J., Hu, Y., Chen, H., Guo, L., Wu, C., Wang, C., Wang, Y., Wang, Y., Wang, G., Yang, S., de la Cruz, C. S., Sharma, L., Wang, L., Zhang, D., and Wang, J. (2020) The kinetics of humoral response and its relationship with the disease severity in COVID-19, *Commun. Biol.*, **3**, 780, <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01526-8>.
17. Топтыгина А. П., Алешкин В. А. (2013) Сопоставление первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Приорикс», *Инфекц. Иммуно.*, **3**, 359-364.
18. Korobova, Z. R., Zueva, E. V., Arsentieva, N. A., Batsunov, O. K., Liubimova, N. E., Khamitova, I. V., Kuznetsova, R. N., Savin, T. V., Totolian, A. A., Rubinstein, A. A., Stanevich, O. V., Kulikov, A. N., and Pevtsov, D. E. (2022) Changes in anti-SARS-CoV-2 IgG subclasses over time and in association with diseases severity, *Viruses*, **14**, 941, <https://doi.org/10.3390/v14050941>.
19. Wang, X., Guo, X., Xin, Q., Pan, Y., Hu, Y., Li, J., Chu, Y., Feng, Y., and Wang, Q. (2020) Neutralizing antibody responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in coronavirus disease 2019 in patients and convalescent patients, *Clin. Infect. Dis.*, **71**, 2688-2694, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa721>.
20. Sariol, A., and Perlman, S. (2020) Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections, *Immunity*, **53**, 248-263, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.005>.
21. Shrock, E., Fujimura, E., Kula, T., Timms, R. T., Lee, I. H., Leng, Y., Robinson, M. L., Sie, B. M., Li, M. Z., Chen, Y., Logue, J., Zuiani, A., McCulloch, D., Lelis, F. J. N., Clarke, W. A., Caturegli, P., Laeyendecker, O., Piechocka-Trocha, A., Li, J. Z., Khatri, A., Chu, H. Y., Villani, A.-C., Kays, K., Goldberg, M. B., Hacothen, N., Filbin, M. R., Yu, X. G., Walker, B. D., Wesemann, D. R., Larman, H. B., Lederer, J. A., and Elledge, S. J. (2020) Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity, *Science*, **370**, eabd4250, <https://doi.org/10.1126/science.abd4250>.
22. Peng, Y., Mentzer, A. J., Liu, G., Yao, X., Yin, Z., Dong, D., Dejnirattisai, W., Rostron, T., Supasa, P., Liu, C., López-Camacho, C., Slon-Campos, J., Zhao, Y., Stuart, D. I., Paesen, G. C., Grimes, J. M., Antson, A. A., Bayfield, O. W., Hawkins, D. E., Ker, D. S., Turtle, L., Subramaniam, K., Thomson, P., Zhang, P., Dold, C., Ratcliff, J., Simmonds, P., de Silva, T., Sopp, P., Wellington, D., Rajapaksa, U., Chen, Y. L., Salio, M., Napolitani, G., Paes, W., Borrow, P., Kessler, B., Fry, J. W., Schwabe, N. F., Semple, M. G., Baillie, K. J., Moore, S., Openshaw, P. J., Ansari, A., Dunachie, S., Barnes, E., Frater, J., Kerr, G., Goulder, P., Lockett, T., Levin, R., Cornall, R. J., Conlon, C., Klennerman, P., McMichael, A., Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Knight, J. C., Ogg, G., and Dong, T. (2020) Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19, *Nat. Immunol.*, **21**, 1336-1345, <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>.
23. Swadling, L., Diniz, M. O., Schmidt, N. M., Amin, O. E., Chandran, A., Shaw, E., Pade, C., Gibbons, J. M., le Bert, N., Tan, A. T., Jeffery-Smith, A., Tan, C. C. S., Tham, C. Y. L., Kucykowicz, S., Aidoo-Micah, G., Rosenheim, J., Davies, J., Johnson, M., Jensen, M. P., Joy, G., McCoy, L. E., Valdes, A. M., Chain, B. M., Goldblatt, D., Altman, D. M., Boyton, R. J., Manisty, C., Treibel, T. A., Moon, J. C., van Dorp, L., Balloux, F., McKnight, A., Noursadeghi, M., Bertoletti, A., and Maini, M. K. (2022) Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2, *Nature*, **601**, 110-117, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04186-8>.
24. Schwarzkopf, S., Krawczyk, A., Knop, D., Klump, H., Heinold, A., Heinemann, F. M., Thümmel, L., Temme, C., Breyer, M., Witzke, O., Dittmer, U., Lenz, V., Horn, P. A., and Lindemann, M. (2021) Cellular immunity in COVID-19 convalescents with PCR-confirmed infection but with undetectable SARS-CoV-2-specific IgG, *Emerg. Infect. Dis.*, **27**, 122-129, <https://doi.org/10.3201/2701.203772>.

FEATURES OF THE HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO S- AND N-PROTEINS OF THE SARS-CoV-2 VIRUS

Z. E. Afridonova¹, A. P. Toptygina^{1,2*}, and I. S. Mikhaylov³

¹ *Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology,
125212 Moscow, Russia; e-mail: toptyginaanna@rambler.ru*

² *Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
National Research University "MPEI", 111250 Moscow, Russia*

The pandemic of a new coronavirus infection, which has lasted for more than 3 years, is still accompanied by frequent mutations in the S-protein of the SARS-CoV-2 virus and the emergence of new variants of the virus, causing new outbreaks of the disease. Of all the coronavirus proteins, the S- and N-proteins are the most immunogenic. The aim of this study was to compare the features of humoral and T-cell immune responses to the SARS-CoV-2 S- and N-protein in people with different histories of interaction with this virus. The following were examined: 27 people who had COVID-19, 23 twice vaccinated with the Sputnik V vaccine and did not have COVID-19, 22 people who had COVID-19, and after 6-12 months twice vaccinated with the Sputnik V vaccine, and 25 people who recovered from COVID-19 twice. The level of antibodies was determined by enzyme immunoassay, cellular immunity was determined by the expression of CD107a on CD8^{high} lymphocytes after they recognized antigens of the SARS-CoV-2 virus. It has been shown that the humoral immune response to the N-protein is formed mainly by short-lived plasma cells synthesizing IgG antibodies of all four subclasses with a gradual switch from IgG3 to IgG1. The response to the S-protein is represented by both short-lived plasma cells formed at the beginning of the response (IgG1 and IgG3 subclasses) and long-lived plasma cells (IgG1 subclass). The dynamics of the level of antibodies synthesized by short-lived plasma cells is described by the Fisher equation, and the Erlang equation is more suitable for describing the level of antibodies synthesized by long-lived plasma cells. The level of antibodies in the groups with hybrid immunity exceeds the level with post-vaccination immunity, and in the group with breakthrough immunity it exceeds both post-infection and post-vaccination immunity. Cellular immunity to the S- and N-proteins of the SARS-CoV-2 virus differs somewhat depending on the methods of induction of this immunity (vaccination or disease). Importantly, heterologous CD8⁺ T cell immune responses to the N-protein of other coronaviruses may be involved in immune defense against SARS-CoV-2.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, N-protein, S-protein, antibodies, vaccination, hybrid immunity, cellular immunity, breakthrough immunity

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ЛИМФОИДНОЙ НЕОПЛАЗИИ

© 2024 Н.А. Петинати^{1*#}, А.В. Садовская^{1,2#}, Н.В. Сац¹, Н.М. Капранов¹,
Ю.О. Давыдова¹, Е.А. Фастова¹, А.У. Магомедова¹, А.Н. Васильева¹,
О.А. Алешина¹, Г.П. Арапиди^{3,4,5}, В. Шендер^{3,4}, И.П. Смирнов³, О.В. Побегуц³,
М.А. Лагарькова³, Н.И. Дризе¹, Е.Н. Паровичникова¹

¹ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России,
125167 Москва, Россия; электронная почта: loel@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра иммунологии, 119991 Москва, Россия

³ ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, 119435 Москва, Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

⁵ Московский физико-технический институт (государственный университет),
141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 15.09.2023

После доработки 22.11.2023

Принята к публикации 23.11.2023

Нормальное кроветворение регулируется стромальным микроокружением костного мозга, в состав которого входят разнообразные клетки стромы и лимфоциты. При лимфоидных неоплазиях нарушаются развитие и функционирование клеток иммунной системы, влияющие на строми костного мозга. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) участвуют в регуляции иммунного ответа как за счет межклеточного взаимодействия, так и за счет секреции различных цитокинов. При онкогематологических заболеваниях изменяется стромальное микроокружение костного мозга, в том числе и МСК. Целью исследования было описать изменения, происходящие с иммунологической функцией МСК при лимфоидной неоплазии из ранних клеток-предшественниц, локализованных в костном мозге (острый лимфобластный лейкоз, ОЛЛ), и более поздних, расположенных вне костного мозга (диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома, ДВККЛ). Исследовали параметры роста, экспрессию мембранных маркеров, экспрессию генов интереса и секретом МСК от больных ОЛЛ и ДВККЛ до начала лечения и в ремиссии заболевания. В качестве контроля использовали МСК здоровых доноров соответствующих возрастов. Показано, что концентрация МСК в костном мозге больных ОЛЛ снижена до начала лечения и восстанавливается по достижении ремиссии; у больных ДВККЛ этот параметр не изменен. Способность МСК к пролиферации не была изменена у больных ОЛЛ, а в клетках у больных ДВККЛ достоверно повышена, по сравнению с донорами, и до начала лечения, и по достижению ремиссии заболевания. У пациентов иммунофенотип МСК и экспрессия генов, важных для дифференцировки, поддержания иммунологического статуса и секреции цитокинов, достоверно отличались по многим параметрам от таковых у здоровых доноров и зависели от заболевания. Белки, секретируемые МСК, сильно различались у доноров и пациентов. МСК пациентов секретируют меньше белков, связанных с регуляцией иммунного ответа, дифференцировкой и поддержанием стволовых кроветворных клеток. Лимфоидная неоплазия приводит к значительным изменениям в функциональном иммунологическом статусе МСК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: МСК, ОЛЛ, ДВККЛ, экспрессия генов, секреция белков.

DOI: 10.31857/S0320972524050097 **EDN:** YOBGXM

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

ВВЕДЕНИЕ

Костный мозг отвечает за поддержание состава клеток крови, в том числе иммунных, в течение всей жизни. Помимо своей ключевой кроветворной функции, костный мозг действует как важный лимфоидный орган, в котором находится множество зрелых популяций лимфоцитов, включая В-клетки, Т-клетки, естественные Т-киллеры и клетки врожденного иммунитета [1]. В костном мозге лимфоидные клетки взаимодействуют со стромальным микроокружением и участвуют в регуляции кроветворения и иммунного ответа. Стволовые кроветворные клетки (СКК) находятся в специализированных нишах, которые регулируют их поддержание для пожизненного производства клеток крови. Также ниши обеспечивают хоминг и выживание СКК, регулируют их состояние покоя, самообновление, дифференцировку и пролиферацию. В формировании и функционировании таких ниш участвуют клетки многих типов [2]. Один из основных компонентов ниши – мезенхимные стволовые клетки, дифференцирующиеся в другие многочисленные стромальные клетки, составляющие нишу, удерживающие СКК и отвечающие за иммунологические реакции костного мозга [3].

В-Клеточные лимфопролиферативные заболевания, в число которых входят множественная миелома, лимфома Ходжкина и хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), а также предшествующие состояния, такие как, например, моноклональный В-клеточный лимфоцитоз – это патологии, сопровождающиеся неконтролируемым размножением В-лимфоцитов [4]. Лимфопролиферативные заболевания могут возникать либо в лимфатических тканях (как в случае лимфомы), либо в костном мозге (как в случаях ХЛЛ и множественной миеломы). Течение заболевания и тактика лечения широко варьируют в зависимости от типа неоплазии и других индивидуальных факторов, однако даже экстрамедуллярные опухоли оказывают влияние на стромальное микроокружение костного мозга [5]. Кроме того, на строма костного мозга могут сильно влиять хронические вирусные инфекции. Например, ретикулярные клетки, секретирующие хемокин CXCL12 (CAR-клетки), погибают у мышей с хроническим лимфоцитарным хориоменингитом из-за продукции интерферонов IFN- α и IFN- γ вирус-специфическими CD8⁺ Т-клетками [6]. Хронические вирусные инфекции связаны с угнетением кроветворения, функциональной недоста-

точностью костного мозга и истощением пула СКК [7, 8]. Показано, что хроническая инфекция вирусом лимфоцитарного хориоменингита приводит к гибели большинства мезенхимных CAR-клеток и провоспалительному транскрипционному ремоделированию оставшихся клеток этой ключевой для ниши популяции. Это вызывает долговременные функциональные дефекты и снижение конкурентоспособности СКК. Иммунопатология костного мозга может вызываться вирус-специфическими активированными CD8⁺ Т-клетками, которые накапливаются в костном мозге через интерферон-зависимые механизмы. Комбинированное ингибирование путей IFN I и II типа антителами полностью предотвращает дегенерацию CAR-клеток и защищает СКК от хронической дисфункции. Следовательно, вирусные инфекции и последующие иммунные реакции оказывают длительное влияние на гомеостаз костного мозга, постоянно снижая конкурентоспособность СКК и нарушая секрецию основных стромально-активных веществ, поддерживающих кроветворение [9].

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – неоплазия, возникающая из предшественников В-клеток (В-ОЛЛ) или Т-клеток (Т-ОЛЛ). Заболевание характеризуется неконтролируемой пролиферацией лимфоидных предшественников в костном мозге и образованием большого количества незрелых лимфоцитов, нарушая нормальные гемопоэтические функции. В-ОЛЛ считается генетическим заболеванием, однако в настоящее время все больше данных свидетельствует о том, что микроокружение костного мозга может вносить существенный вклад в поддержание, прогрессирование, ответ на лечение, и, возможно, развитие заболевания независимо от наличия специфических генетических аномалий в кроветворных клетках [10]. Многие данные свидетельствуют о том, что клетки В-ОЛЛ могут модифицировать микроокружение костного мозга, создавая условия, способствующие выживанию злокачественных клеток при химиотерапии, что приводит к рецидиву заболевания. Лейкозные клетки взаимодействуют с компонентами микроокружения костного мозга, в том числе с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (МСК) [11]. Исследования взаимовлияний между микроокружением костного мозга и клетками ОЛЛ привели к открытию потенциальных терапевтических мишеней. Такими мишенями могут стать цитокины/хемокины и их рецепторы, молекулы адгезии, связанные с гипоксией белки

Принятые сокращения: ДВККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; ОУЭ – относительный уровень экспрессии; СКК – стволовые кроветворные клетки; СУФ – средний уровень флуоресценции; АРО – аполипротеины; FDR – алгоритм оценки локальной частоты ложных обнаружений; TGF- β – трансформирующий фактор роста- β .

и пути передачи сигнала [12]. Сложные взаимодействия между лейкозными клетками и компонентами микроокружения костного мозга приводят к участию МСК в подавлении противоопухолевого ответа, так как эти клетки секретируют цитокины, такие как трансформирующий фактор роста- β (TGF- β) и фактор роста гепатоцитов (HGF), которые опосредуют супрессию Т-клеток [13].

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – это гетерогенная группа заболеваний, различающаяся по гистологическим, иммуногистохимическим и молекулярным характеристикам [14]. Только у 10–25% больных ДВККЛ гистологическими или молекулярными методами выявляется поражение костного мозга [15]. Считается, что у оставшихся 75–90% пациентов с ДВККЛ костный мозг не вовлечен в опухолевый процесс. Тем не менее стромальные клетки-предшественницы костного мозга у больных ДВККЛ без вовлечения костного мозга изменены [16]. Такие изменения нельзя объяснить контактным взаимодействием с опухолевыми клетками, как это происходит при лейкозах [17, 18]. Многие опухоли секретируют цитокины и хемокины [19, 20], наличие опухоли в организме может быть рассмотрено как воспалительный процесс [21, 22]. Воспаление связано с активным высвобождением множества факторов, которые могут активировать клетки стромального микроокружения костного мозга, в частности МСК [23]. МСК, активированные IL-1 β , TNF и IFN- γ , секретируют ингибиторы и активаторы воспалительного процесса [24].

Целью исследования было проанализировать молекулярные и физиологические изменения, происходящие под действием лимфоидной неоплазии, в иммунологической функции МСК. Изучали опухоли из ранних клеток-предшественниц, напрямую контактирующих со стромой костного мозга (ОЛЛ), и более зрелых, расположенных исключительно экстрамедуллярно (ДВККЛ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на МСК, выделенных из костного мозга пациентов с ОЛЛ и ДВККЛ, в качестве контроля были использованы МСК из костного мозга здоровых доноров. Чтобы учесть разницу в возрасте, для пациентов с ОЛЛ и ДВККЛ были подобраны две разные группы доноров соответствующего возраста. В связи с этим исследованные показатели были нормированы на значение медианы соответствующей группы доноров.

Данные о количестве образцов, пациентах и донорах представлены в табл. 1.

Культивирование МСК. Костный мозг получали во время диагностических пункций у па-

циентов и эксфузий у доноров гемопоэтических стволовых клеток после подписания ими информированного согласия. Для предотвращения свертывания 2–7 мл костного мозга помещали в стерильные пробирки, содержащие 1 мл гепарина (50 ед./мл). Костный мозг разводили в 2 раза средой α -MEM («ICN», Канада), содержащей 0,2% метилцеллюлозы (1500 cП; «Sigma-Aldrich», США) и оставляли на 40 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость собирали и осаждали центрифугированием при 450 g в течение 10 мин. Количество ядерных клеток определяли при подсчете с генциан-виолетом (1%-ный раствор в 3%-ной уксусной кислоте) в камере Горяева. Клетки (3×10^6) помещали во флакон с площадью дна 25 см² («Corning-Costar», США) в 5 мл полной питательной среды α -MEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Hyclone», США), 2 mM L-глутамин («ICN»), 100 ед./мл пенициллина («Синтез», Россия) и 5 мкг/мл стрептомицина («БиоФармГарант», Россия). МСК культивировали в инкубаторе при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Среду культивирования меняли 2 раза в неделю. После достижения конfluence клетки пассивировали. Для этого флакон с клетками дважды промывали 5 мл раствора Версена и 1 раз – 0,25 мл 0,25%-ного раствора трипсина («ПанЭко», Россия), заливали 0,25 мл раствора трипсина и оставляли при комнатной температуре до открепления клеток от пластика. Добавляли 1 мл среды с эмбриональной телячьей сывороткой, взвешивали клетки и подсчитывали их количество в растворе 0,2%-ного трипанового синего («Sigma-Aldrich») для определения их жизнеспособности (трипановый синий окрашивает только мертвые клетки). При пассивировании во флакон с площадью дна 25 см² высаживали 10^5 клеток в 5 мл среды. Культуры вели на протяжении 4 пассажей.

Временем до P0 считали дни от посадки до достижения конfluence, время до P3 определяли, как время от посадки до третьего пассажа.

Расчет кумулятивной клеточной продукции.

Кумулятивную клеточную продукцию за 3 пассажа вычисляли по формуле:

$$N_{\text{сум}} = N_0 + N_0 \cdot \frac{N_1}{200000} + N_1 \cdot \frac{N_2}{200000} + N_2 \cdot \frac{N_3}{200000}, \quad (1)$$

где N_0 , N_1 , N_2 и N_3 – количество клеток, снятых с двух флаконов для культивирования на 0, 1, 2 и 3 пассажах соответственно.

Определение среднего уровня флуоресценции поверхностных маркеров МСК. Поверхностный фенотип МСК определяли на втором пассаже методом проточной цитометрии. После снятия МСК со дна флакона их дважды отмывали раствором CellWash («BD Biosciences», США) и после этого 2×10^4 клеток инкубировали 20 мин

Таблица 1. Характеристики пациентов и доноров

Диагноз	Группа	Всего	Пол	Число	Возраст, годы	Медиана возраста, лет
ОЛЛ	дебют	31	мужчины	15	19–72	29
			женщины	16	18–55	31
	ремиссия	14	мужчины	5	19–55	24
			женщины	9	18–55	30
ДВККЛ	дебют	40	мужчины	14	30–78	48
			женщины	26	34–79	60
	ремиссия	40	мужчины	14	30–78	48
			женщины	26	34–79	60
Доноры	ОЛЛ	56	мужчины	30	18–48	27
			женщины	26		
	ДВККЛ	30	мужчины	10	30–78	54
			женщины	20		

в темноте с моноклональными антителами. Панили антител были следующими: 1) анти-CD90, меченные PE (5E10; «BD Pharmingen», США), анти-HLA-ABC, меченные FITC (FN50; «BioLegend», США) и анти-HLA-DR, меченные APC (L243; «BioLegend»); 2) анти-CD105, меченные FITC (43A3; «BioLegend»), анти-CD54, меченные APC (HA58; «BioLegend»), анти-CD146, меченные PE (P1H12; «BD Pharmingen»); 3) анти-CD73, меченные PE (AD2; «BD Pharmingen»). Анализ проводили с использованием проточного цитометра CytoFLEX («Beckman Coulter», США), данные анализировали с помощью программы Kaluza Analysis 2.1 («Beckman Coulter»). Популяцию МСК определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния. Оценивали средний уровень флуоресценции (СУФ) по каналам APC, FITC и PE.

Определение относительного уровня экспрессии генов. Выделение РНК. Для выделения РНК клетки первого пассажа (от 10^5 до $4,5 \times 10^5$ клеток) центрифугировали при 300 g и сливали супернатант. Промывали 1 мл фосфатного буфера («MPBio», Франция), центрифугировали при 300 g, сливали супернатант. Заливали осадок 400 мкл TriZol («Ambion by Life Technologies», США) и замораживали при -70°C . После размораживания в пробирку добавляли 120 мкл хлороформа, встряхивали, инкубировали 2 мин при комнатной температуре и центрифугировали 15 мин при 13 500 g и 4°C в центрифуге Centrifuge 5424 R («Eppendorf», Германия). Полученную верхнюю фазу переносили в новые пробирки, добавляли 400 мкл изопропанола, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин при 13 500 g и 4°C .

Сливали супернатант, промывали осадок 1 мл 75%-ного этилового спирта, встряхивали на вортексе и центрифугировали 5 мин при 13 500 g и 4°C . Супернатант сливали и отбирали капли, осадок оставляли просохнуть 5 мин при комнатной температуре. Далее, заливали осадок 100 мкл воды, обработанной ДЭПК, и оставляли на 30 мин на льду для растворения. После встряхивания на вортексе отбирали 1 мкл для измерения количества выделенной РНК. Измерение проводили на приборе NanoDrop One («Thermo Fisher Scientific», США) при длине волны 260 нм, степень чистоты РНК определяли по соотношению 260/280 нм (оно должно быть в пределах 1,8–2,0). К оставшимся после измерения 99 мкл раствора РНК добавляли 10 мкл 3 М ацетата натрия и 250 мкл 96%-ного этилового спирта. Хранили при -20°C .

Синтез кДНК. РНК центрифугировали в смеси этилового спирта и ацетата натрия 10 мин при 13 500 g и 4°C . После этого удаляли супернатант и осадок промывали 1 мл 75%-ного этилового спирта, встряхивали на вортексе и центрифугировали 5 мин при 13 500 g и 4°C . Отбирали супернатант, осадок сушили 5 мин при комнатной температуре. Добавляли обработанную ДЭПК воду из расчета 1 мкл на мкг РНК, оставляли на льду на 30 мин для растворения. Для обратной транскрипции смешивали 2 мкл раствора РНК (2 мкг), по 1,25 мкл праймеров (T13 и случайных гексамеров, 40 пмоль/мкл) и 5,5 мкл обработанной ДЭПК воды, инкубировали в амплификаторе Терцик («ДНК-Технология», Россия) 10 мин при 70°C и 10 мин при 4°C . Добавляли 15 мкл смеси для обратной транскрипции,

Таблица 2. Последовательности праймеров и зондов

Ген	Назначение олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида 5' → 3'
<i>BACT</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	CAACCGCGAGAAGATGACC CAGAGGCGTACAGGGATAGC ROX-AGACCTTCAACACCCCAGCCATGTACG-BHQ2
<i>GAPDH</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	GGTGAAGGTCGGAGTCAACG TGGGTGGAATCATATTGGAACA ROX-CTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCATCA-BHQ2
<i>VEGFA</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	AGGCGAGGCAGCTTGAGTTA ACCCTGAGGGAGGCTCCTT FAM-CCTCGGCTTGTCACATCTGCAAGTACGT-RTQ1
<i>FGF2</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	GAAGAGCGACCCTCACATCAAG TCCGTAACACATTTAGAAGCCAGTA FAM-TCATAGCCAGGTAACGGTTAGCACACACTCCT-RTQ1
<i>IL6</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	ACCTGAACCTTCCAAAGATG CTCCAAAAGACCAGTGATGA FAM-ATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGTG-RTQ1
<i>IL8</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	ACCATCTCACTGTGTGTAAC GTTTGAGATATGTCTTTATGC FAM-CAGTTTTGCCAAGGAGTGCTAAAG-RTQ1
<i>PDGFRB</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	CTCCCTTATCATCCTCATCA TCCACGTAGATGTACTCATG FAM-TCACAGACTCAATCACCTTCCATC-RTQ1
<i>SPP1</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	ATAGTGTGGTTTATGGACTGAG ATTCAACTCCTCGCTTTCC FAM-CCAGTACCCTGATGCTACAGACGAG-RTQ1
<i>BGLAP</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	GCAGCGAGGTAGTGAAGAG GAAAGCCGATGTGGTCAG FAM-CTCCCAGCCATTGATACAGGTAGC-RTQ1
<i>PPARG</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	TACTGTCGGTTTCAGAAATGC CAACAGCTTCTCCTTCTCG FAM-CCATCAGGTTTGGGCGGATGCC-RTQ1
<i>FGFR1</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	CAGAATTGGAGGCTACAAGG TGATGCTGCCGTACTCATTC FAM-CATCATAATGGACTCTGTGGTGC-RTQ1
<i>FGFR2</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	CTCATTTATGGAAAGTGTGGTC TGGGCCGGTGAGGCGATC FAM-CAGGTGGTACGTGTGATTGATGGA-RTQ1
<i>SOX9</i>	праймер прямой праймер обратный зонд	AGCAAGACGCTGGGCAAG GTTCTTACCAGACTTCCTC FAM-CTGGAGACTTCTGAACGAGAGC-RTQ1

Таблица 2 (окончание)

Ген	Назначение олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида 5' → 3'
<i>SDF1</i>	праймер прямой	CTACAGATGCCCATGCCGAT
	праймер обратный	TAGCTTCGGGTCAATGCACA
	зонд	FAM-CAGTTTGGAGTGTTGAGAATTTTGAG-RTQ1
<i>TGFB1</i>	праймер прямой	TGCGTCTGCTGAGGCTCAA
	праймер обратный	CGGTGACATCAAAAGATAACC
	зонд	FAM-AGGAATTGTTGCTGTATTTCTGGTAC-RTQ1
<i>ICAM1</i>	праймер прямой	GCAATGTGCAAGAAGATAGC
	праймер обратный	CTCCACCTGGCAGCGTAG
	зонд	ROX-CACGGTGAGGAAGGTTTTAGCTGTT-RTQ2

инкубировали в амплификаторе Терцик при 42 °C в течение 60 мин. Добавляли 75 мкл воды milliQ. Полученную кДНК хранили при –20 °C.

ПЦР в реальном времени. ПЦР-РВ в модификации Taq-man проводили на приборе AbiPrism Real Time PCR System 7500 («Thermo Fisher Scientific») в 96-луночном планшете («Thermo Fisher Scientific»), объем реакции – 25 мкл. Каждый образец анализировали в трех независимых повторях, использовали положительный контроль (референсная смесь кДНК) для оценки качества реакции и соотнесения результатов разных ПЦР и отрицательный контроль (вместо кДНК добавляли воду). Последовательности праймеров и зондов, использованных в работе, представлены в табл. 2.

ПЦР начинали с 10 мин при 95 °C для активации полимеразы, проводили 40 циклов ПЦР для генов *BACT* и *GAPDH*, 45 циклов – для остальных генов. Параметры цикла: 15 с – 95 °C; 40 с – 60 °C.

Расчет относительного уровня экспрессии генов. Относительный уровень экспрессии (ОУЭ) генов рассчитывали с помощью модифицированного метода $\Delta\Delta Ct$ [25]. Для расчетов использовали среднее арифметическое Ct трех независимых повторов. Ct – это количество циклов, потребовавшееся для достижения порогового значения флуоресценции зонда в ПЦР.

Для каждого гена считали ΔCt по формуле:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{образца}} - Ct_{\text{контроля}}. \quad (2)$$

Сначала рассчитывали ОУЭ генов «домашнего хозяйства» (ДХ) – *BACT* и *GAPDH* – по формуле:

$$ОУЭ_{\text{ДХ}} = 2^{-\Delta Ct}. \quad (3)$$

Далее рассчитывали фактор нормализации (ФН) образца по формуле:

$$ФН = \sqrt{ОУЭ_{\text{BACT}} * ОУЭ_{\text{GAPDH}}}. \quad (4)$$

Для расчета ОУЭ гена интереса применяли формулу:

$$ОУЭ = \frac{(2^{-\Delta Ct})}{ФН}. \quad (5)$$

Анализ секретома. Получение среды, кондиционированной МСК. МСК на 2–3 пассаже высевали из расчета 4×10^3 клеток на $см^2$ во флаконы T175 («Corning-Costar»). После достижения конfluence (3–4 дня) флаконы промывали 5 раз фосфатным буфером без Ca^{2+}/Mg^{2+} («Invitrogen», США), а затем культивировали в течение 24 ч в среде RPMI 1640 без сыворотки и фенолового красного («HyClone»). Кондиционированную среду центрифугировали при 400 g в течение 10 мин и замораживали при –70 °C.

Для анализа LC-MS/MS к каждому образцу добавляли коктейль ингибиторов протеаз (Halt Protease Inhibitor Cocktail; «Thermo Fisher Scientific»), а затем центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин для удаления дебриса. Супернатанты немедленно замораживали и лиофилизировали для уменьшения объема. Лиофилизаты ресуспендировали в течение 30 мин в буфере, содержащем 6 M Gd-HCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) и 2 mM ДТТ. Для осаждения нерастворимой фракции растворы центрифугировали при 16 000 g в течение 10 мин при 4 °C. Образцы концентрировали с помощью центрифужного фильтра (Corning Spin-X UF6; «Sigma-Aldrich», США) для замены буфера. К концентрированным образцам добавляли буфер (8 M мочевины, 2 M тиомочевины, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)) в соотношении 1/3 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Дисульфидные связи восстанавливали 5 mM ДТТ при комнатной температуре в течение 40 мин, а затем алкилировали 10 mM йодацетамидом в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. Алкилированные образцы разбавляли добавлением 50 mM раствора NH_4HCO_3 в соотношении 1/4,

затем добавляли трипсин (0,01 мкг на 1 мкг белка) и инкубировали образцы при 37 °C в течение 14 ч. Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты до конечной концентрации 5%. Пептиды обессоливали с помощью Discovery DSC-18 (пробирки 1 мл, 50 мг) («Sigma-Aldrich»), сушили в вакууме и хранили при –80 °C до анализа. Перед LC-MS/MS образцы были повторно растворены в 5%-ном ацетонитриле, содержащем 0,1% трифторуксусной кислоты, и обработаны ультразвуком.

Анализ проводили на масс-спектрометре Orbitrap Q Exactive HF-X, оснащенном источником нано-ESI и нанопоточным хроматографом высокого давления (UPLC Ultimate 3000) с обращенно-фазовой колонкой C-18 (100 мкм × 300 мм) («Thermo Fisher Scientific»).

Биоинформатическая обработка данных масс-спектрометрии. Необработанные данные с масс-спектрометра были преобразованы в файлы mgf с помощью MSConvert («ProteoWizard Software Foundation», США) с параметрами «--mgf--filter pickPicking true» [1, 2]. Для идентификации белков был проведен поиск с помощью MASCOT (версия 2.5.1; «Matrix Science Ltd.», Великобритания) и X!Tandem (ALANINE, 2017.02.01, 2017.02.01, The Global Proteome Machine Organization) в базе данных белков человека UniProt с конкатенированным набором данных обратной ловушки. Допустимые массы предшественника и фрагмента были установлены 20 ppm и 0,04 Да соответственно. Параметры поиска в базе данных включали следующее: триптическое расщепление с одним [26] возможным пропуском, статическая модификация для карбамидометила (C) и динамические модификации для окисления (M). Для X!Tandem были выбраны параметры, которые позволили быстро проверить ацетилирование N-концевого остатка белка, потерю аммиака с N-концевого глутамина и воды с N-концевой глутаминовой кислоты. Файлы с результатами обрабатывались с помощью программы Scaffold 5 (версия 5.1.0). Использовался алгоритм оценки локальной частоты ложных обнаружений (FDR) со стандартной группировкой белков. Для оценки попаданий пептидов и белков (для обоих) была выбрана FDR = 0,05. Аннотированные в базе Swiss-Prot образцы были отмечены как предпочтительные.

Статистический анализ. Данные представлены в виде индивидуальных значений с отмеченной медианой. Для каждой выборки экспериментальных данных проводили проверку на нормальность с помощью критерия Шапиро–Уилка (при $p < 0,05$ распределение принималось отличным от нормального). Достоверность различий в данных анализировали с помощью теста Манна–Уитни для ненормальных распределений. Статистически значимыми считали различия

при $p < 0,05$. Статистический анализ осуществляли с помощью GraphPad Prism 8.03.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под воздействием лимфоидных неоплазий характеристики МСК изменяются. При ОЛЛ и ДВККЛ кроветворные предшественники, инициирующие развитие опухоли, различаются по степени дифференцированности: при ОЛЛ опухолевую трансформацию претерпевают ранние костномозговые предшественники, а при ДВККЛ – более дифференцированные В-клетки вне костного мозга. Стоит отметить, что в работе были изучены МСК только пациентов с ДВККЛ без поражения костного мозга.

Ростовые характеристики МСК. Время, необходимое для достижения нулевого пассажа МСК пациентов с ОЛЛ до начала лечения, было увеличено ($p < 0,0001$), что косвенно может отражать снижение количества стромальных клеток-предшественниц в костном мозге. По достижению ремиссии этот показатель нормализовался. МСК пациентов с ДВККЛ не отличались от клеток здоровых доноров до начала лечения заболевания, а в ремиссии – достигали Р0 быстрее донорских ($p = 0,0107$). Как следствие, время до Р0 было больше у клеток больных ОЛЛ, чем у МСК больных ДВККЛ в дебюте заболевания (рис. 1, а). В ремиссии заболеваний время до Р0 достоверно не отличалось.

Суммарная клеточная продукция МСК за 3 пассажа у больных ОЛЛ не отличалась от показателей здоровых доноров. При достижении ремиссии суммарная клеточная продукция больных ОЛЛ достоверно увеличивалась по сравнению с донорами ($p = 0,0419$). Суммарная клеточная продукция МСК пациентов с ДВККЛ была повышена относительно МСК доноров как в дебюте ($p = 0,0119$), так и в ремиссии заболевания ($p = 0,0011$), а в дебюте также была значимо выше, чем при дебюте ОЛЛ (рис. 1, б).

Таким образом, нами показано, что при ОЛЛ происходит угнетение роста МСК до лечения и возвращение к норме в ремиссии, в то время как при ДВККЛ, напротив, МСК растут активнее, чем клетки здоровых доноров. МСК больных отличались от донорских клеток и по другим параметрам.

Анализ экспрессии поверхностных маркеров МСК. МСК из костного мозга больных гематологическими заболеваниями и здоровых доноров различаются не только по ростовым характеристикам, но и по уровню экспрессии поверхностных маркеров.

Средний уровень флуоресценции поверхностных маркеров определяли на клетках 6 пациентов с ОЛЛ до начала лечения и 3 – в ремиссии ОЛЛ,

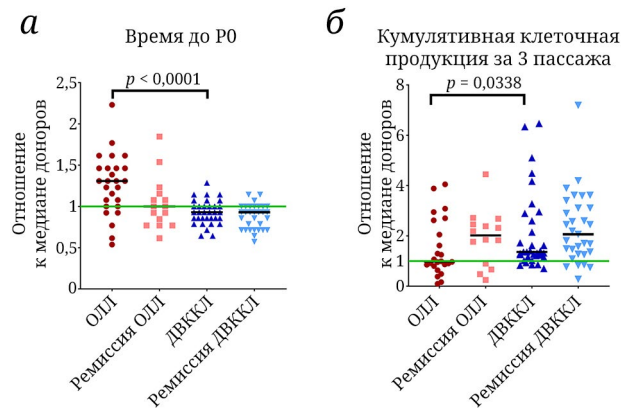


Рис. 1. Время до нулевого пассажа (а) и суммарная клеточная продукция за 3 пассажа (б) МСК больных ОЛЛ и ДВККЛ до начала лечения и в ремиссии заболевания по сравнению с донорами соответствующего возраста. Данные представлены как диаграмма рассеяния, отмечена медиана. Горизонтальной зеленой линией обозначена медиана значений для клеток здоровых доноров

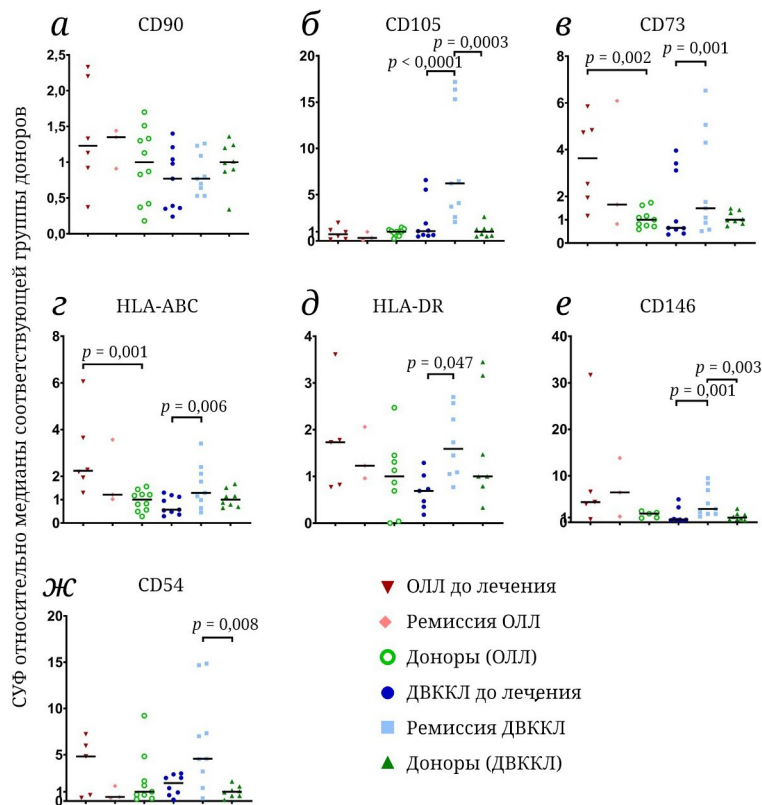


Рис. 2. Средний уровень флуоресценции (СУФ) поверхностных маркеров CD90 (а), CD105 (б), CD73 (в), HLA-ABC (г), HLA-DR (д), CD146 (е) и CD54 (ж) на МСК больных ОЛЛ, ДВККЛ и здоровых доноров соответствующего возраста. По оси ординат отложен СУФ относительно медианы соответствующей группы доноров. Данные представлены как диаграмма рассеяния, отмечена медиана

9 пациентов в дебюте и ремиссии ДВККЛ и 10 доноров (для каждой из групп больных). Согласно критериям, утвержденным Международным обществом клеточной терапии (ISCT), МСК экспрессируют на мембране CD90, CD105 и CD73 [27]. На всех изучаемых клетках эти маркеры присутствовали, однако их СУФ различались (рис. 2, а–в). При ОЛЛ до начала лечения на МСК был достоверно повышен СУФ CD73 по сравнению с донорами (рис. 2, в).

При ДВККЛ этот показатель не отличался от доноров ни до начала лечения, ни в ремиссии заболевания, однако в ремиссии становился достоверно выше, чем до начала лечения. Также МСК больных с ДВККЛ в ремиссии имели повышенный СУФ CD105 (рис. 2, б). До начала лечения при ОЛЛ была существенно повышена экспрессия HLA-ABC, по сравнению с донорами, при ремиссии СУФ этой молекулы снижался, тогда как при ДВККЛ до начала

лечения СУФ HLA-ABC не отличался от донорских, но достоверно повышался при достижении ремиссии (рис. 2, г). Этот же эффект наблюдался для молекул гистосовместимости II класса (HLA-DR) при ДВККЛ (рис. 2, д). Представленность молекул CD146 имела тенденцию к повышению на поверхности МСК больных ОЛЛ до начала лечения и в ремиссии, по сравнению с донорами, а у больных ДВККЛ до начала лечения – не отличалась от доноров, но достоверно повышалась при достижении ремиссии (рис. 2, е). Достоверных различий в экспрессии CD54 между исследованными группами обнаружено не было, кроме повышения в ремиссии ДВККЛ по сравнению с донорами (рис. 2, ж).

Таким образом, были обнаружены достоверные изменения в экспрессии поверхностных маркеров МСК.

Изменения в экспрессии генов факторов, важных для иммунорегулирующей функции МСК. Были изучены паттерны генной экспрессии МСК. Для анализа были выбраны гены факторов, непосредственно участвующих в регуляции иммунного ответа: *IL6*, *IL8*, *TGFB1*; факторов хоминга и адгезии: *SDF1*, *ICAM1*; факторов роста и их рецепторов: *FGF2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *PDGFRB*, *VEGFA*. Была исследована экспрессия генов-маркеров дифференцировки МСК: *PPARG*, *SOX9*, *BGLAP*, *SPP1*, так как их дифференцированные потомки – остеобласты, адипоциты и другие – также регулируют иммунный ответ.

У больных ОЛЛ экспрессия гена *IL6* в МСК была достоверно повышена по отношению к донорам в дебюте заболевания ($p < 0,0001$) и не нормализовалась после достижения ремиссии ($p < 0,0001$), а при ДВККЛ – возрастала после химиотерапии по сравнению с дебютом (рис. 3, а) и здоровыми донорами ($p = 0,0018$). При этом до начала лечения экспрессия гена *IL6* была выше при ОЛЛ, чем при ДВККЛ.

Также до начала лечения при ДВККЛ наблюдалось повышение уровня экспрессии *IL8* относительно здоровых доноров ($p = 0,0220$), а после лечения ОУЭ этого гена возрастал еще больше (рис. 3, б). ОУЭ *TGFB1* был понижен в МСК больных ОЛЛ в дебюте, по сравнению с клетками доноров ($p = 0,004$), и еще сильнее снижался в ремиссии ($p = 0,0002$). У больных ДВККЛ также наблюдалось снижение ОУЭ этого гена после лечения по сравнению с дебютом заболевания (рис. 3, в). В МСК пациентов с ДВККЛ в дебюте и ремиссии был повышен ОУЭ *FGF2*, по сравнению с донорами ($p = 0,0121$, $p = 0,0206$ соответственно), в дебюте заболевания он был достоверно выше, чем в МСК больных ОЛЛ (рис. 3, г). Рецепторы к *FGF2* различаются по своей экспрессии у пациентов с ОЛЛ и ДВККЛ (рис. 3, д и е). Так, в дебюте ДВККЛ МСК имели пониженный ОУЭ *FGFR1* ($p = 0,0166$) и по-

вышенный ОУЭ *FGFR2* ($p = 0,0017$). В МСК больных ОЛЛ и ДВККЛ ОУЭ *FGFR1* не был достоверно снижен ни в дебюте, ни при ремиссии заболевания, а ОУЭ *FGFR2* был достоверно повышен в МСК больных ДВККЛ, по сравнению с донорами, и значимо снижался при достижении ремиссии; у больных с ОЛЛ такие изменения не наблюдались.

ОУЭ маркеров дифференцировки МСК различались между изученными нозологиями. ОУЭ маркера жировой дифференцировки *PPARG* был повышен в МСК пациентов с ОЛЛ в дебюте заболевания, по сравнению с донорами ($p < 0,0001$), и оставался повышенным в ремиссии ($p < 0,0001$). В обеих точках экспрессия гена *PPARG* была выше при ОЛЛ, чем при ДВККЛ (рис. 3, ж). ОУЭ *SOX9*, маркера хрящевой дифференцировки, у больных ОЛЛ был ниже, чем у доноров ($p = 0,0049$) в дебюте заболевания, и ниже, чем у больных ДВККЛ в дебюте и ремиссии (рис. 3, з).

При ДВККЛ была нарушена и экспрессия некоторых ростовых факторов и их рецепторов. При ДВККЛ в ремиссии была снижена экспрессия *PDGFRB* по отношению к донорам ($p = 0,0006$) и дебюту заболевания (рис. 3, н). ОУЭ *SDF1* (рис. 3, м) был повышен при ДВККЛ по сравнению с донорами как до начала лечения, так и по достижению ремиссии ($p < 0,0001$ и $p = 0,0028$ соответственно). При ОЛЛ экспрессия *VEGFA* была снижена до начала лечения, по сравнению с донорами ($p = 0,0036$), но восстанавливалась до нормы по достижению ремиссии (рис. 3, л). Экспрессия *ICAM1* возрастала в ремиссии ОЛЛ по сравнению с дебютом заболевания (рис. 3, о).

Таким образом, в клетках больных ОЛЛ и ДВККЛ изменен ОУЭ ростовых факторов, факторов адгезии и интерлейкинов. Изменения генов-маркеров дифференцировки МСК также демонстрируют склонность к адипогенной дифференцировке при ОЛЛ.

Изменения в секрете МСК пациентов с лимфоидными неоплазиями способствует снижению противоопухолевого иммунитета. Был исследован секрет МСК у 2 пациентов с ОЛЛ, у 6 пациентов с ДВККЛ и у 21 донора. Достоверных изменений, совпадающих с изменениями экспрессии генов, выявлено не было, что может быть связано с маленькой выборкой или с посттранскрипционными изменениями. Однако были выявлены изменения в секреции белков, уровень экспрессии генов которых не был исследован, в том числе функционально связанных с белками, ОУЭ генов которых были изменены. Больные с ОЛЛ и ДВККЛ сильно различались по возрасту, поэтому при анализе секрета были использованы две соответствующие группы доноров. Количество проанализированных белков секрета представлено на рис. 4.

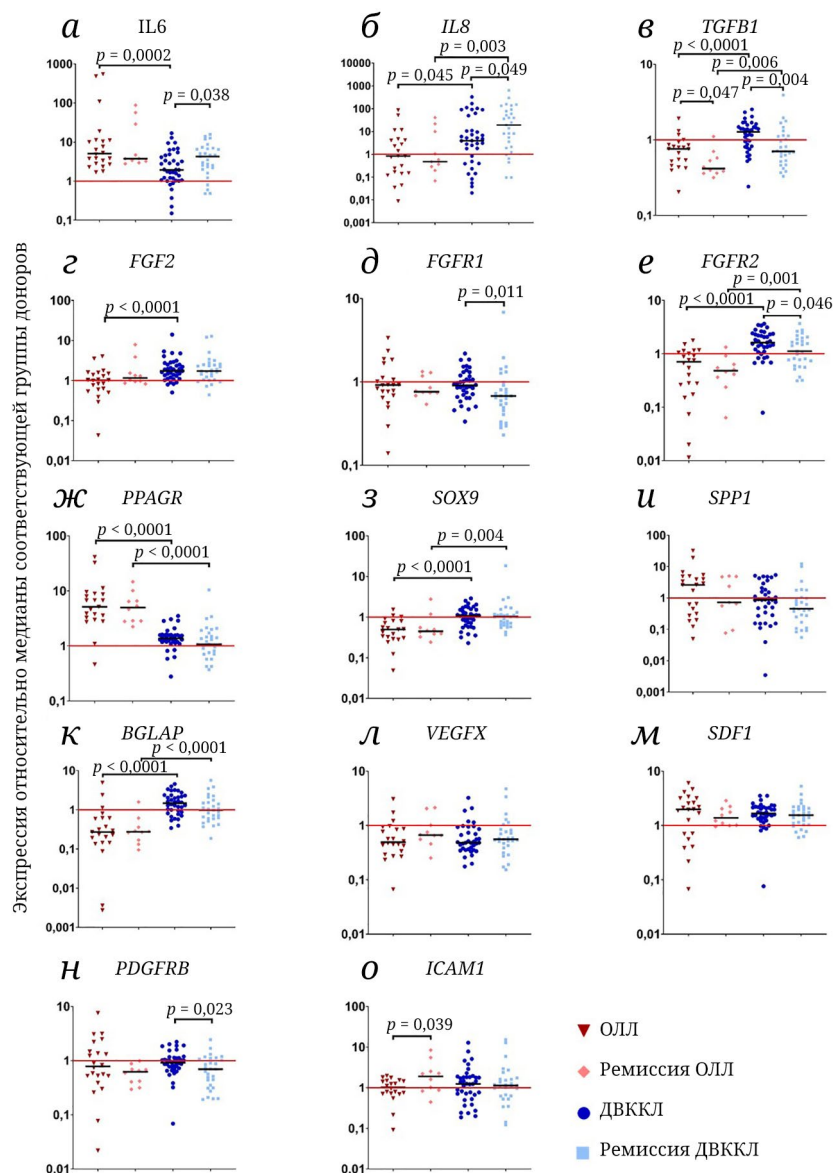


Рис. 3. Уровни экспрессии генов *IL6* (а), *IL8* (б), *TGFB1* (в), *FGF2* (г), *FGFR1* (д), *FGFR2* (е), *PPARG* (ж), *SOX9* (з), *SPP1* (и), *BGLAP* (к), *VEGFA* (л), *SDF1* (м), *PDGFRB* (н), *ICAM1* (о) в МСК больных ОЛЛ и ДВККЛ до начала лечения и при ремиссии заболевания, нормированные на медиану значения ОУЭ в клетках соответствующих здоровых доноров. По оси ординат отложена экспрессия относительно медианы соответствующей группы доноров. Данные представлены как диаграмма рассеяния, отмечена медиана. Горизонтальная красная линия – медиана ОУЭ доноров

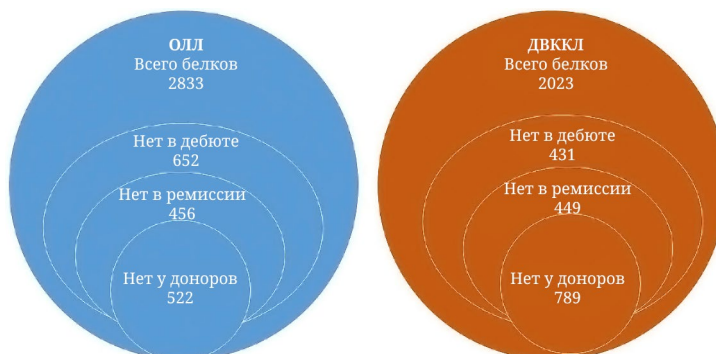


Рис. 4. Диаграмма распределения изученных секретруемых белков МСК ОЛЛ и ДВККЛ до начала лечения и в ремиссии заболевания. Обозначено количество белков, не секретруемых разными группами МСК, но секретруемых другими группами

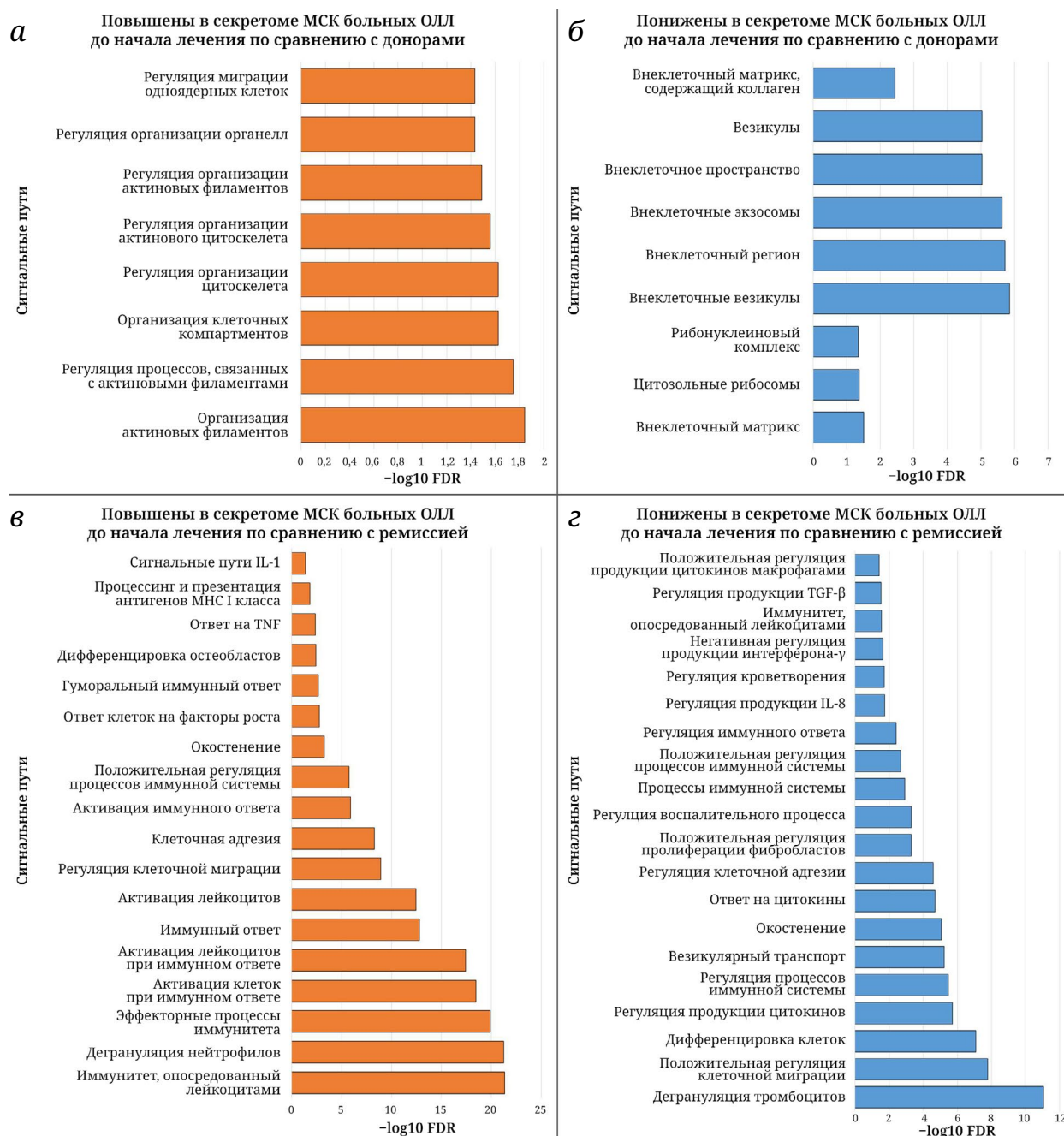


Рис. 5. Анализ обогащения белков сигнальных путей по базе данных GO. Представлены наиболее важные сигнальные пути, компоненты которых по-разному представлены в секретах МСК пациентов с ОЛЛ и доноров. Учтены только достоверные изменения ($p < 0,05$). Гистограммы представляют собой значения $-\log_{10} \text{FDR}$ (шанс ложного обнаружения, false discovery rate). *а* – Повышены в секрете МСК больных ОЛЛ до начала лечения по сравнению с МСК доноров. *б* – Понижены в секрете МСК больных ОЛЛ до начала лечения по сравнению с МСК доноров. *в* – Повышены в секрете МСК больных ОЛЛ до начала лечения по сравнению с МСК при ремиссии заболевания. *г* – Понижены в секрете МСК больных ОЛЛ до начала лечения по сравнению с МСК при ремиссии заболевания

МСК больных и соответствующих доноров секретируют 938 общих белков. Среди белков, не выявленных в МСК пациентов, могут быть те факторы, недостаточность которых влияет на функции стромального микроокружения костного мозга. В секрете МСК больных ОЛЛ не были обнаружены 1444 белка и 433 белка не секрети-

ровались МСК больных ДВККЛ. Из них секреция 31 белка была обнаружена в МСК больных ОЛЛ. К ним относятся белки, важные для регуляции иммунного ответа – PDGFA, POSTN, LGALS1 и KIT. 800 белков секретируются как МСК доноров, так и МСК больных ДВККЛ, при этом МСК доноров не секретируют 793 из изученных белков.

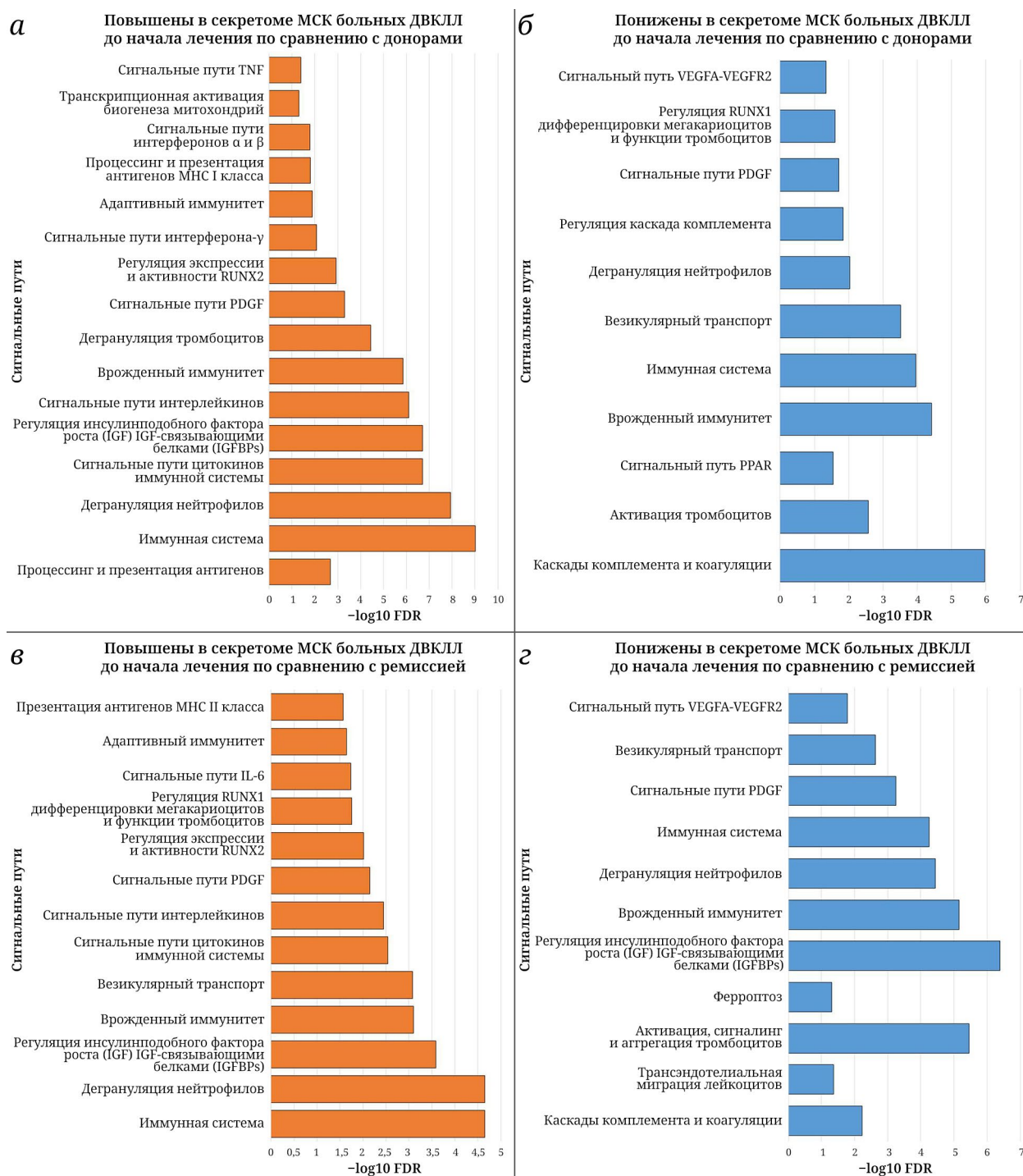


Рис. 6. Анализ обогащения белков сигнальных путей по базе данных GO. Представлены наиболее важные сигнальные пути, компоненты которых по-разному представлены в секретоме МСК пациентов с ДВКЛЛ и доноров. Учтены только достоверные изменения ($p < 0,05$). Гистограммы представляют собой значения $-\log_{10} \text{FDR}$ (шанса ложного обнаружения, false discovery rate). **а** – Повышены в секретоме МСК больных ДВКЛЛ до начала лечения по сравнению с МСК доноров. **б** – Понижены в секретоме МСК больных ДВКЛЛ до начала лечения по сравнению с МСК доноров. **в** – Повышены в секретоме МСК больных ДВКЛЛ до начала лечения по сравнению с МСК при ремиссии заболевания. **г** – Понижены в секретоме МСК больных ДВКЛЛ до начала лечения по сравнению с МСК при ремиссии заболевания

При ОЛЛ до начала лечения, по сравнению с донорами, была повышена секреция 70 белков, наиболее интересными из которых представляют CXCL12, POSTN, HLA-DRB, LGALS1. Помимо этих

важных для иммунного ответа белков, была повышена секреция белков, регулирующих клеточную миграцию и относящихся к организации цитоскелета (рис. 5, а). Одновременно была снижена

секреция 15 белков, в том числе VCAM1, CSF1, CTGF, ADAMTS1. Белки с пониженной секрецией участвуют в везикулярном транспорте и организации внеклеточного матрикса (рис. 5, б).

По достижении ремиссии в МСК больных ОЛЛ изменяется секреция белков, связанных с иммунным ответом (рис. 5, в и г). Повышается, по сравнению с началом заболевания, секреция белков, участвующих в функционировании хемокинов и цитокинов, везикулярном транспорте, дифференцировке МСК и др. При этом другие белки, участвующие в тех же сигнальных путях, могут понижаться.

В ремиссии ОЛЛ повышена относительно доноров секреция 62 белков, включая PTMA, DCD, LIMCH1 и POSTIN, и понижена секреция 80 белков, в их числе VCAM1, LTBP1, C3, ANXA1, IGFBP-1, -3 и -6; LGALS1, ENO1.

Полученные данные указывают на значительные нарушения функциональных свойств МСК при ОЛЛ как до начала лечения, так и по достижении ремиссии.

В МСК больных ДВККЛ до начала лечения, по сравнению с донорами, была повышена секреция 77 белков, среди них B2M, CD59, HLA-C, PDGFRA, CSF1, SOD1, CAPG, а снижена – 44 белков, среди которых APO (аполипопротеины), ACAN, S100A9, LTBP4. Белки, секреция которых была повышена, участвуют в сигнальных путях цитокинов иммунной системы, в том числе TNF, интерферонов и интерлейкинов, врожденного и адаптивного иммунитета (рис. 6, а). Белки с пониженной секрецией также участвуют в некоторых из этих путей (рис. 6, б). Понижена секреция белков, относящихся к дифференцировке МСК и системе комплемента.

При достижении ремиссии повышается секреция 15 белков. За исключением B2M, эти белки отличаются от тех, секреция которых повышена до начала лечения. К важным сигнальным путям, измененным по достижении ремиссии, относятся белки, участвующие в везикулярном транспорте, иммунном ответе и дифференцировке (рис. 6, в). Обращает на себя внимание секреция белков, связанных с презентацией антигенов главным комплексом гистосовместимости II класса. В стандартных культуральных условиях не активированные МСК практически не экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости II класса, тогда как при ДВККЛ это происходит. В то же время снижается секреция 73 белков, включающих APO, ACAN, S100A9, LTBP4, PDGFA, CFHR1, C4BPA, CRP. Очевидно, что в ремиссии остаются сниженными белки APO, ACAN, S100A9, LTBP4, к которым присоединяются такие важные для иммунного ответа белки, как PDGFA, и различные субъединицы белков комплемента – CFHR1, C4BPA, CRP. Множество белков, сниженных в секрете МСК, задейство-

ваны в иммунной системе – системе комплемента, активации тромбоцитов и нейтрофилов (рис. 6, г).

Таким образом, изменения, наблюдаемые в секретах МСК больных ОЛЛ и ДВККЛ, указывают на системное воспаление, затрагивающее костный мозг при обеих нозологиях. В ремиссии секреция связанных с воспалением белков спадает, однако нормализации секрета МСК не происходит. Ни один из белков, секреция которых была изменена по сравнению с донорами в дебюте и ремиссии заболеваний, не совпадал между ОЛЛ и ДВККЛ. Это же относится и к белкам, различающимся между дебютом и ремиссией при ОЛЛ и ДВККЛ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В иммунный процесс вовлечены не только клетки, относящиеся непосредственно к иммунной системе, но и множество других клеток организма, в том числе МСК. *In vitro* показано, что МСК способны модулировать иммунный ответ как за счет прямого межклеточного взаимодействия, так и за счет секреции различных факторов. Кроме того, МСК, являясь предшественниками стромального микроокружения костного мозга, регулируют образование всех клеток крови, и в том числе клеток иммунной системы. Лимфоидные опухоли приводят к клеточному дисбалансу иммунной системы не только за счет нарушения лимфопоэза, но и за счет изменения свойств других, связанных с иммунной системой, клеток.

Рассматриваемые в данной работе лимфо-пролиферативные заболевания – ДВККЛ и ОЛЛ – различаются по степени зрелости клеток и локализации. При ОЛЛ слабодифференцированные лимфоидные предшественники находятся в костном мозге, а при ДВККЛ опухоль из более зрелых В-клеток может не затрагивать костный мозг, как происходило у пациентов, МСК которых мы изучали в работе. Тем не менее известно, что свойства МСК значительно меняются не только при ОЛЛ [28], когда они находятся в непосредственной близости к злокачественным клеткам и взаимодействуют с ними, но и при ДВККЛ, при отсутствии прямого контакта [5].

Поскольку в культуру вносится всегда одно и то же количество ядросодержащих клеток костного мозга, время достижения конfluентности после посадки зависит от количества прикрепившихся к пластику клеток, способных пролиферировать, и таким образом может косвенно отражать количество мезенхимных предшественников в костном мозге. Увеличение времени до P0 только у МСК больных в дебюте ОЛЛ, скорее всего, связано с тем, что только в этом случае МСК непосредственно контактируют с опухолевыми клетками

и могут повреждаться ими. Эти данные соотносятся с результатами других исследований, свидетельствующими о повреждении стромального микроокружения при острых лейкозах [29–31]. При ДВККЛ, напротив, можно предположить активацию стромального микроокружения, так как наблюдается повышение продукции клеток этих пациентов как в дебюте, так и в ремиссии. Более того, в ремиссии также сокращается время достижения Р0, т.е. значительно увеличивается концентрация стромальных предшественников.

Существует мнение, что лейкоз ассоциирован с хроническим воспалением [32, 33]. Изучение поверхностного фенотипа МСК больных ОЛЛ показало, что на них повышен СУФ белков главного комплекса гистосовместимости I класса (HLA-ABC) и экто-5'-нуклеотидазы (CD73) в дебюте заболевания. Кроме того, в секретоме МСК больных ОЛЛ в дебюте заболевания повышено содержание HLA-DRB. МСК больных в дебюте ДВККЛ не отличаются от клеток здоровых доноров по этим параметрам, однако по достижению ремиссии на них достоверно повышается поверхностная экспрессия HLA обоих классов (HLA-ABC и HLA-DR), CD73, CD54 и CD146. В секретоме МСК больных ДВККЛ повышено содержание белков HLA-C и B2M в дебюте заболевания, что частично сохраняется в ремиссии. Эти изменения предполагают, что клетки, на которых обычно слабо экспрессированы молекулы HLA, находились в провоспалительной среде в организме и остались активированными при переносе в культуру. CD73 оказывает иммуносупрессивное действие за счет генерации аденозина. Повышение поверхностной экспрессии этого маркера указывает на то, что МСК оказывают противовоспалительное действие. Известно, что повышенная экспрессия CD73 встречается во многих типах опухолевых клеток и клетках опухолевого микроокружения [34–36]. По-видимому, этот механизм ускользания от иммунного контроля реализуется МСК больных ОЛЛ и ДВККЛ. CD54 (или ICAM-1) – это молекула адгезии, экспрессия которой повышается при активации клеток [37, 38]. CD146 – молекула адгезии, считается маркером МСК, имеющих высокий пролиферативный потенциал и способность к дифференцировке [39]. Исходя из этого, можно ожидать более быстрого роста или большей клеточной продукции у МСК с повышенной экспрессией этого маркера, что и наблюдается у клеток больных ДВККЛ после лечения. В работе изучали МСК больных ДВККЛ без инвазии опухолевых клеток в костный мозг. При этом в МСК больных ДВККЛ активация не наблюдалась в дебюте заболевания, а происходила в ремиссии, что, вероятно, связано с перенесенным лечением. Химиотерапия активирует и сильно повреждает иммунную систему пациентов [40].

В ремиссии ДВККЛ на МСК также обнаруживается повышенное содержание CD105, или эндоглина. Эндоглин совместно с TGF- β участвует в удержании СКК в состоянии покоя [41]. Уровень экспрессии гена *TGFB1* в МСК был снижен в дебюте ОЛЛ, что могло способствовать пролиферации опухолевых клеток. После химиотерапии ОУЭ *TGFB1* снижается как при ОЛЛ, так и при ДВККЛ. Возможно, это необходимо для восстановления кроветворения и иммунитета, которые неизбежно повреждаются в ходе лечения.

Среди факторов, влияющих на иммунный ответ, в дебюте ОЛЛ наблюдалось повышение уровня экспрессии гена провоспалительного цитокина *IL6*, не нормализующееся по достижении ремиссии. Вероятно, МСК вносят вклад в повышение уровня этого фактора, наблюдаемое в крови пациентов [42]. Мы не выявили достоверного повышения уровня *IL-6* в секретоме МСК, что может быть связано с недостаточной выборкой и ограничениями метода, поскольку другие группы наблюдали повышенную секрецию *IL-6* МСК больных ОЛЛ, используя метод ELISA [43]. У больных ДВККЛ в дебюте заболевания отмечается повышенная экспрессия *IL8*, а после лечения – повышенная экспрессия *IL6* и *IL8*. Увеличение в ремиссии экспрессии провоспалительных интерлейкинов может отражать массивные перестройки в иммунных процессах, связанные как с проводимой химиотерапией, так и с возникающими на ее фоне инфекционными осложнениями, что совпадает с наблюдениями других авторов [9].

SDF-1 (CXCL-12) важен для взаимодействия с СКК. Его экспрессия в МСК пациентов не отличалась от здоровых доноров ни при ОЛЛ, ни при ДВККЛ. В предыдущих исследованиях отмечалось, что экспрессия *SDF1* не изменяется при ОМЛ [44, 45], но уровень белка на поверхности МСК больных повышен [46]. Было показано, что при ОЛЛ, напротив, содержание SDF-1 в костном мозге падает [43, 47]. В изученных в данной работе МСК наблюдалась тенденция к повышению экспрессии этого фактора. В секретоме МСК больных ОЛЛ выявлено повышение этого фактора по сравнению с донорами. Можно предположить, что регуляция SDF-1 при острых лейкозах происходит не на уровне транскрипции.

И при ОЛЛ, и при ДВККЛ изменяется экспрессия цитокинов, участвующих в формировании и регенерации стромы. В дебюте ОЛЛ в МСК снижается экспрессия *VEGFA*, несмотря на то что в крови пациентов обнаруживается повышение концентрации VEGF-A [48, 49]. Возможно, МСК снижают экспрессию этого ростового фактора из-за петли обратной связи, а за его секрецию ответственны злокачественные клетки [48]. В МСК ДВККЛ нарушена экспрессия многих факторов роста и их рецепторов.

Не исключено, что эти изменения способствовали бы распространению опухоли на костный мозг, если бы пациенты оставались без лечения.

При ОЛЛ также наблюдалось изменение относительного уровня экспрессии генов-маркеров предрасположенности МСК к различным линиям дифференцировки. Так, повышенная экспрессия *PPARG* предполагает, что МСК больных ОЛЛ более предрасположены к жировой дифференцировке, чем МСК здоровых доноров. Это подтверждается также снижением экспрессии *SOX9* – маркера хрящевой дифференцировки, который, согласно некоторым исследованиям, способен ингибировать дифференцировку МСК в адипоциты [50]. Согласно литературным данным, МСК больных ОЛЛ проявляют повышенную склонность к жировой дифференцировке [28, 43]. Снижение экспрессии *SOX9* также было отмечено [43]. Стоит подчеркнуть, что изменения в экспрессии этих генов сохранялись и после достижения пациентами ремиссии. Возможно, более серьезные изменения МСК при ОЛЛ вызваны контактом с опухолевыми клетками.

При ДВККЛ изменения экспрессии факторов, характеризующих дифференцировочный потенциал МСК, обнаружено не было.

Исследование сигнальных путей показало опосредованную связь между изменениями в экспрессии генов *IL8*, *IL6*, *TGFB1*, *VEGFA*, *PDGFRB*, *PPARG* и в секретоме.

Анализ секретомы МСК больных ОЛЛ до и после лечения выявил снижение секреции белков, участвующих в регуляции иммунного ответа и везикулярном транспорте, по сравнению с донорами. Секреция везикул важна для регуляторной и трофической функций МСК [51]. Нарушение везикулярного транспорта говорит о повреждении МСК. МСК по-другому взаимодействуют и с внеклеточным матриксом, который участвует в регуляции стволовых кроветворных клеток и В-лимфопоэзе [52]. К наиболее интересным белкам, секреция которых снижена в МСК до начала лечения, относятся: *ADAMTS1* – металлопротеаза, ингибирующая ангиогенез и связанная с *VCAM1* (чья секреция также снижена) [53]; *CTGF* – фактор роста соединительной ткани, играющий важную роль при некоторых формах рака, фиброзных заболеваниях и во многих биологических процессах, включая клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию, ангиогенез [54]; *CSF1* – фактор роста макрофагов, воздействующий на макрофаги и моноциты и стимулирующий повышение фагоцитарной и хемотаксической активности, а также цитотоксичности в отношении опухолевых клеток [55]. Факторы, повышено секретируемые МСК пациентов с ОЛЛ до лечения, по сравнению с донорскими, регулируют миграцию клеток и связанную с ней перестройку актинового цитоскелета. Они могут

привлекать в костный мозг как иммунные клетки, так и циркулирующие опухолевые клетки.

Наличие опухоли в организме, как правило, связано с хроническим воспалением [21, 22]. Наши наблюдения согласуются с этой гипотезой. По достижению ремиссии МСК снижают секрецию факторов, участвующих в ответе на провоспалительные цитокины, такие как *IL-1*, *TNF*, и других факторов, сопровождающие иммунный ответ (рис. 5, в). Некоторые из этих факторов были понижены до начала лечения и повышались при достижении ремиссии (рис. 5, г). Отмечаются сигнальные пути, имеющие компоненты, секреция которых изменяется разнонаправленно по достижению ремиссии.

В ремиссии понижено секретируются: субъединица комплемента *C3*; белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста – *IGFBP1*, *IGFBP3*, регулирующий рост клеток, и *IGFBP6*, регулирующий рост и иммунный ответ дендритных клеток [56]; *LGALS1* или галектин-1 – белок, ингибирующий клеточную пролиферацию и участвующий в иммуносупрессии *CD8⁺* Т-клеток [57]; *ENO1* – гликолитический фермент, имеющий функции опухолевого супрессора и важный для хеморезистентности при лимфомах [58]; *ANXA1*, аннексин A1, ингибирует клетки врожденного иммунитета и способствует активации Т-клеток. Активация Т-клеток приводит к высвобождению аннексина A1 и экспрессии его рецептора. Этот путь, по-видимому, точно регулирует силу передачи сигналов Т-клеточного рецептора (TCR). Повышенная экспрессия аннексина A1 при патологических состояниях может усиливать передачу сигналов TCR через сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), тем самым вызывая гиперактивацию Т-клеток [59]. Понятно, что при снижении секреции перечисленных белков опухоль легче уходит от иммунного надзора, частично обеспечивающегося МСК. Можно заключить, что в МСК больных ОЛЛ происходит комплекс изменений, способствующих ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора.

МСК больных ДВККЛ, вошедших в исследование, иммунологически активированы, несмотря на то что костный мозг не был непосредственно вовлечен в опухолевый процесс. На это указывает повышение секреции белков сигнальных путей, обеспечивающих иммунный ответ, в том числе презентацию антигенов главным комплексом гистосовместимости и реакцию на провоспалительные цитокины. После лечения снижается секреция белков, относящихся к воспалительным процессам.

При дебюте и ремиссии в секретоме МСК ДВККЛ, по сравнению с донорами, снижено количество *APO*, *ACAN*, *S100A9* и *LTBP4*.

При достижении ремиссии снижается еще и секреция PDGFA, CFHR1, C4BPA, CRP.

ACAN, или аггрекан, имеет решающее значение в морфогенезе хрящевого скелета во время развития и экспрессируется хондроцитами [60]. Отсутствие экспрессии этого белка может быть связано с нарушениями хрящевой и костной дифференцировки у МСК пациентов с ДВККЛ. Кроме того, аггрекан может участвовать в презентации антигенов, как это показано для хондроцитов при воспалении [61].

Белок S100A9 – это кальций-связывающий белок A9, также известный как белок 14, связанный с фактором, ингибирующим миграцию (MRP14). Известно, что внутриклеточный S100A9 снижает способность нейтрофилов отвечать на бактериальные патогены [62].

Снижение белка LTBP4 – ключевого регулятора трансформирующего фактора роста бета, связано с функциями TGF- β . TGF- β биологически латентен после секреции. LTBP4 контролирует активацию TGF- β , поддерживая его в латентном состоянии во внеклеточном пространстве. Таким образом, LTBP4 – важный регулятор передачи сигналов TGF- β и опосредованно связан с развитием, иммунитетом, восстановлением после травм и заболеваниями, играя центральную роль в регуляции воспаления, фиброза и прогрессирования рака [63]. CFHR1, C4BPA, CRP – элементы системы комплемента, в норме секретируемые в том числе МСК и перитцитами и защищающие организм от инфекций [64].

Снижение представленности всех этих белков в секретоме МСК подтверждает ухудшение их физиологических функций, связанных с кроветворением и иммунитетом, при ДВККЛ.

Повышение секреции B2M, CD59, HLA-C, PDGFRA, CSF1, SOD1, CAPG в дебюте ДВККЛ в секретоме МСК указывает на активацию МСК в костном мозге больных ДВККЛ без вовлечения опухоли. В ремиссии уровень этих белков, за исключением B2M, нормализуется, т.е. происходящие изменения частично обратимы.

Сравнение секретомов МСК больных ОЛЛ и ДВККЛ подтвердило наличие существенных функциональных изменений, по сравнению с донорами, и отличие нозологий друг от друга. МСК больных ДВККЛ не секретируют множество белков, секретируемых МСК доноров и больных ОЛЛ, в их секретоме не обнаружены такие белки, участвующие в регуляции иммунного ответа, как PDGFA, POSTN, LGALS1 (снижен в секретоме МСК при ОЛЛ) и KIT. POSTN – это секретируемый белок внеклеточного матрикса, который участвует в развитии и регенерации тканей, связывается с интегринами, поддерживая адгезию и миграцию, и играет роль в поддержании раковых стволовых клеток и метастазировании [65]. Ростовые факторы, поддер-

живающие стромальные клетки и стволовые кроветворные клетки, также отсутствуют в секретоме МСК больных ДВККЛ, что подтверждает нарушения в МСК костного мозга без участия непосредственного контакта с опухолевыми В-клетками.

Анализ функционального статуса МСК выявил как различия, так и сходства между дефектами, возникающими в МСК при трансформации ранних кроветворных предшественников в костном мозге (ОЛЛ) и более зрелых вне костного мозга (ДВККЛ). Основные различия могут быть связаны с участием лимфоцитов костного мозга в дифференцировке МСК [66]. При ОЛЛ изменяется предрасположенность МСК к костной и жировой дифференцировке, отмечаемая на уровне генной экспрессии и секреции белков. При ДВККЛ часть отличий от ОЛЛ имеет возрастной характер. Можно отметить разнонаправленные изменения в сигнальных путях ростовых факторов IGF и PDGF, выявленные только при ДВККЛ.

Таким образом, независимо от локализации опухоли, происходят значительные изменения в функциональном статусе МСК костного мозга, способствующие снижению противоопухолевого иммунитета при лимфоидных неоплазиях. Кроме того, при обеих патологиях МСК приобретают черты стареющих клеток, связанные с хроническим воспалением. «Старение» МСК может быть причиной неполного восстановления кроветворения у этих пациентов в течение длительного периода после достижения ремиссии.

Выявление конкретных признаков изменения стромы костного мозга указывает на возможность оценки риска рецидива [46]. Более подробное изучение метаболизма МСК пациентов позволит выявить препараты, модулирующие активные формы кислорода, связанные с воспалением и старением клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лимфоидные неопластические образования оказывают патологическое действие на функционирование МСК костного мозга. Изменяется концентрация этих клеток в костном мозге, их способность к пролиферации, иммунофенотип, паттерн экспрессии генов, важных для дифференцировки, поддержания иммунологического статуса и экспрессии цитокинов. Функции МСК разнообразны и образуют комплекс реакций на состояние и запросы организма. Изменения в иммунологическом статусе МСК зависят от нозологии и, несмотря на принципиальные различия, в целом, способствуют оптимизации ниши для нужд опухоли и ускользанию опухолевых клеток от иммунологического надзора. Полученные данные демонстри-

руют важность МСК не только для поддержания нормального кроветворения на уровне СКК, но и для иммунитета, а также указывают на возможность терапевтического воздействия не только на собственно опухолевые клетки, но и на стромальное микроокружение костного мозга. Результаты работы дают основания для поиска конкретных мишеней среди сигнальных путей, активирующихся в МСК при воспалении. Лимфоидные опухоли – это не только трансформация клеток кроветворного происхождения разной степени зрелости, но и сопутствующие изменения в стромальном микроокружении.

Вклад авторов. Е.Н. Паровичникова – руководство работой с пациентами; Н.А. Петинати, Н.И. Дризе – концепция и руководство работой; Е.А. Фастова, А.У. Магомедова, А.Н. Васильева, О.А. Алешина – работа с пациентами; Н.А. Петинати, А.В. Садовская, Н.В. Сац, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова – проведение экспериментов с МСК; М.А. Лагарькова – руководство анализом секрета МСК; Г.П. Арапиди, В. Шендер, И.П. Смирнов, О.В. Побегуц – исследование и анализ секрета МСК; Н.А. Петинати, А.В. Садовская, Н.И. Дризе – обсуждение результатов исследования; Н.А. Петинати, А.В. Садовская, Н.И. Дризе – написание текста статьи; М.А. Лагарькова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-001-00170; образцы пациентов с ДВККЛ и доноров) и Российского научного фонда (грант № 22-15-00018; <https://rscf.ru/project/22-15-00018/>; образцы пациентов с ОЛЛ и доноров).

Благодарности. В работе использовали оборудование (планшет-ридер Infinite 200 («Tecan», Австрия)) центра коллективного пользования Пушкинского научного центра. Благодарим Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России за LC-MS/MS анализ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в процессе исследований, соответствуют этическим стандартам национального комитета (на проведение исследования было получено разрешение этического комитета по исследовательской этике (ФГБУ НМИЦ Гематологии МЗ РФ, протокол № 171 от 27.04.2023)), Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schürch, C.M., Caraccio, C., and Nolte, M. A. (2021) Diversity, localization, and (patho)physiology of mature lymphocyte populations in the bone marrow, *Blood*, **137**, 3015-3026, <https://doi.org/10.1182/blood.2020007592>.
- Kaushansky, K., and Zhan, H. (2018) The regulation of normal and neoplastic hematopoiesis is dependent on microenvironmental cells, *Adv. Biol. Regul.*, **69**, 11-15, <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.06.003>.
- Beerman, I., Luis, T.C., Singbrant, S., Lo Celso, C., and Méndez-Ferrer, S. (2017) The evolving view of the hematopoietic stem cell niche, *Exp. Hematol.*, **50**, 22-26, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2017.01.008>.
- Luca, D. C. (2021) Update on lymphoblastic leukemia/lymphoma, *Clin. Lab. Med.*, **41**, 405-416, <https://doi.org/10.1016/j.JCLL.2021.04.003>.
- Petinati, N. A., Bigildeev, A. E., Karpenko, D. S., Sats, N. V., Kapranov, N. M., Davydova, Y.O., Fastova, E. A., Magomedova, A. U., Kravchenko, S. K., Arapidi, G. P., Rusanova, M. I., Lagarkova, M. M., Drize, N. I., and Savchenko, V. G. (2021) Humoral effect of a B-cell tumor on the bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 207-216, <https://doi.org/10.1134/S0006297921020097>.
- Zhou, X., Ramachandran, S., Mann, M., and Popkin, D. L. (2012) Role of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in understanding viral immunology: past, present and future, *Viruses*, **4**, 2650-2669, <https://doi.org/10.3390/v4112650>.
- Schürch, C. M., Riether, C., and Ochsenbein, A. F. (2014) Cytotoxic CD8⁺ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells, *Cell Stem Cell*, **14**, 460-472, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.002>.
- Demerdash, Y., Kain, B., Essers, M. A. G., and King, K. Y. (2021) Yin and Yang: the dual effects of interferons on hematopoiesism, *Exp. Hematol.*, **96**, 1-12, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2021.02.002>.
- Isringhausen, S., Mun, Y., Kovtonyuk, L., Kräutler, N. J., Suessbier, U., Gomariz, A., Spaltro, G., Helbling, P. M., Chyn Wong, H., Nagasawa, T., Manz, M. G., Oxenius, A., and Nombela-Arrieta, C. (2021) Chronic viral infections persistently alter marrow stroma and impair hematopoietic stem cell fitness, *J. Exp. Med.*, **218**, e20192070, <https://doi.org/10.1084/jem.20192070>.

10. Fallati, A., Di Marzo, N., D'amico, G., and Dander, E. (2022) Mesenchymal stromal cells (MSCs): an ally of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) cells in disease maintenance and progression within the bone marrow hematopoietic niche, *Cancers*, **14**, 3303, <https://doi.org/10.3390/CANCERS14143303>.
11. Kihira, K., Chelakkot, V. S., Kainuma, H., Okumura, Y., Tsuboya, N., Okamura, S., Kurihara, K., Iwamoto, S., Komada, Y., and Hori, H. (2020) Close interaction with bone marrow mesenchymal stromal cells induces the development of cancer stem cell-like immunophenotype in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells, *Int. J. Hematol.*, **112**, 795-806, <https://doi.org/10.1007/s12185-020-02981-z>.
12. Chiarini, F., Lonetti, A., Evangelisti, C., Buontempo, F., Orsini, E., Evangelisti, C., Cappellini, A., Neri, L. M., McCubrey, J. A., and Martelli, A. M. (2016) Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: from biology to therapeutic targeting, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 449-463, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.015>.
13. Zhi-Gang, Z., Wei-Ming, L., Zhi-Chao, C., Yong, Y., and Ping, Z. (2008) Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patient with hematological malignant diseases, *Leuk. Lymphoma*, **49**, 2187-2195, <https://doi.org/10.1080/10428190802455875>.
14. Beltran, B. E., Quiñones, P., Morales, D., Malaga, J. M., Chavez, J. C., Sotomayor, E. M., and Castillo, J. J. (2018) Response and survival benefit with chemoimmunotherapy in Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma, *Hematol. Oncol.*, **36**, 93-97, <https://doi.org/10.1002/hon.2449>.
15. Swerdlow, S. H. (2017) In *WHO Classification of Tumours* (Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., and Thiele, J., eds) Lyon, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 199-215.
16. Fastova, E. A., Magomedova, A. U., Petinati, N. A., Sats, N. V., Kapranov, N. M., Davydova, Y. O., Drize, N. I., Kravchenko, S. K., and Savchenko, V. G. (2019) Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in patients with diffuse large B-Cell lymphoma, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 150-153, <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04480-6>.
17. Chen, Q., Yuan, Y., and Chen, T. (2014) Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients, *Mol. Med. Rep.*, **9**, 293-298, <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1789>.
18. Shipounova, I. N., Petrova, T. V., Svinareva, D. A., Momotuk, K. S., Mikhailova, E. A., and Drize, N. I. (2009) Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia, *Clin. Transl. Sci.*, **2**, 67-74, <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2008.00074.x>.
19. Kotyza, J. (2017) Chemokines in tumor proximal fluids, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.*, **161**, 41-49, <https://doi.org/10.5507/bp.2016.062>.
20. Vilgelm, A. E., and Richmond, A. (2019) Chemokines modulate immune surveillance in tumorigenesis, metastasis, and response to immunotherapy, *Front. Immunol.*, **10**, 333, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00333>.
21. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation, *Nature*, **454**, 436-444, <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
22. Okrój, M., and Potempa, J. (2019) Complement activation as a helping hand for inflammophilic pathogens and cancer, *Front. Immunol.*, **9**, 3125, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03125>.
23. Lund, F.E. (2008) Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity, *Curr. Opin. Immunol.*, **20**, 332-338, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.003>.
24. Munir, H., Ward, L. S. C., and McGettrick, H. M. (2018) Mesenchymal stem cells as endogenous regulators of inflammation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1060**, 73-98, https://doi.org/10.1007/978-3-319-78127-3_5.
25. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protocols*, **3**, 1101-1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
26. Praveen Kumar, Kandoi, S., Misra, R., and Verma, R. S. (2019) The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **46**, 1-9, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>.
27. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement, *Cytotherapy*, **8**, 315-317, <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
28. Vanegas, N.-D. P., Ruiz-Aparicio, P. F., Uribe, G. I., Linares-Ballesteros, A., and Vernot, J.-P. (2021) Leukemia-Induced cellular senescence and stemness alterations in mesenchymal stem cells are reversible upon withdrawal of B-cell acute lymphoblastic leukemia cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22158166>.
29. Schroeder, T., Geyh, S., Gerding, U., and Haas, R. (2016) Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies, *Blood Res.*, **51**, 225-232, <https://doi.org/10.5045/br.2016.51.4.225>.
30. Passaro, D., Di Tullio, A., Abarrategi, A., Rouault-Pierre, K., Foster, K., Ariza-McNaughton, L., Montaner, B., Chakravarty, P., Bhaw, L., Diana, G., Lassailly, F., Gribben, J., and Bonnet, D. (2017) Increased vascular permeability

- in the bone marrow microenvironment contributes to disease progression and drug response in acute myeloid leukemia, *Cancer Cell*, **32**, 324-341.e6, <https://doi.org/10.1016/j.CCELL.2017.08.001>.
31. Shipounova, I. N., Petinati, N. A., Bigildeev, A. E., Drize, N. J., Sorokina, T. V., Kuzmina, L. A., Parovichnikova, E. N., and Savchenko, V. G. (2017) Alterations of the bone marrow stromal microenvironment in adult patients with acute myeloid and lymphoblastic leukemias before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Leuk. Lymphoma*, **58**, 408-417, <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1187277>.
 32. Ludin, A., Gur-Cohen, S., Golan, K., Kaufmann, K. B., Itkin, T., Medaglia, C., Lu, X.-J., Ledergor, G., Kollet, O., and Lapidot, T. (2014) Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment, *Antioxid. Redox Signal.*, **21**, 1605-1619, <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5941>.
 33. Récher, C. (2021) Clinical implications of inflammation in acute myeloid leukemia, *Front. Oncol.*, **11**, 623952, <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.623952>.
 34. Beavis, P. A., Stagg, J., Darcy, P. K., and Smyth, M. J. (2012) CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses, *Trends Immunol.*, **33**, 231-237, <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.009>.
 35. Jin, D., Fan, J., Wang, L., Thompson, L.F., Liu, A., Daniel, B. J., Shin, T., Curiel, T. J., and Zhang, B. (2010) CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression, *Cancer Res.*, **70**, 2245-2255, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3109>.
 36. Petruk, N., Tuominen, S., Åkerfelt, M., Mattsson, J., Sandholm, J., Nees, M., Yegutkin, G. G., Jukkola, A., Tuomela, J., and Selander, K. S. (2021) CD73 facilitates EMT progression and promotes lung metastases in triple-negative breast cancer, *Sci. Rep.*, **11**, <https://doi.org/10.1038/S41598-021-85379-Z>.
 37. Bui, T. M., Wiesolek, H. L., and Sumagin, R. (2020) ICAM-1: a master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis, *J. Leukoc. Biol.*, **108**, 787-799, <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R>.
 38. Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A. I., Le, A. D., Shi, S., Shao, C., and Shi, Y. (2010) Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression, *J. Immunol.*, **184**, 2321-2328, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902023>.
 39. Russell, K.C., Phinney, D. G., Lacey, M. R., Barrilleaux, B. L., Meyertholen, K. E., and O'Connor, K. C. (2010) *In vitro* high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment, *Stem Cells*, **28**, 788-798, <https://doi.org/10.1002/stem.312>.
 40. Schirmacher, V. (2019) From chemotherapy to biological therapy: a review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment, *Int. J. Oncol.*, **54**, 407-419, <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>.
 41. Borges, L., Oliveira, V. K. P., Baik, J., Bendall, S. C., and Perlingeiro, R. C. R. (2019) Serial transplantation reveals a critical role for endoglin in hematopoietic stem cell quiescence, *Blood*, **133**, 688-696, <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-874677>.
 42. Portale, F., Cricrì, G., Bresolin, S., Lupi, M., Gaspari, S., Silvestri, D., Russo, B., Marino, N., Ubezio, P., Pagni, F., Vergani, P., Te Kronnie, G., Valsecchi, M. G., Locatelli, F., Rizzari, C., Biondi, A., Dander, E., and D'Amico, G. (2019) ActivinA: a new leukemia-promoting factor conferring migratory advantage to B-cell precursor-acute lymphoblastic leukemic cells, *Haematologica*, **104**, 533-545, <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.188664>.
 43. Balandrán, J.C., Purizaca, J., Enciso, J., Dozal, D., Sandoval, A., Jiménez-Hernández, E., Alemán-Lazarini, L., Perez-Koldenkova, V., Quintela-Núñez del Prado, H., Rios de los Ríos, J., Mayani, H., Ortiz-Navarrete, V., Guzman, M. L., and Pelayo, R. (2017) Pro-inflammatory-related loss of CXCL12 niche promotes acute lymphoblastic leukemic progression at the expense of normal lymphopoiesis, *Front. Immunol.*, **7**, 666, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00666>.
 44. Desbourdes, L., Javary, J., Charbonnier, T., Ishac, N., Bourgeois, J., Iltis, A., Chomel, J.-C., Turhan, A., Guilloton, F., Tarte, K., Demattei, M.-V., Ducrocq, E., Rouleux-Bonnin, F., Gyan, E., Hérault, O., and Domenech, J. (2017) Alteration analysis of bone marrow mesenchymal stromal cells from *de novo* acute myeloid leukemia patients at diagnosis, *Stem. Cells Dev.*, **26**, 709-722, <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0295>.
 45. Chandran, P., Le, Y., Li, Y., Sabloff, M., Mehic, J., Rosu-Myles, M., and Allan, D. S. (2015) Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors, *Leuk. Res.*, **39**, 486-493, <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2015.01.013>.
 46. Kim, J.-A., Shim, J.-S., Lee, G.-Y., Yim, H. W., Kim, T.-M., Kim, M., Leem, S.-H., Lee, J.-W., Min, C.-K., and Oh, I.-H. (2015) Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia, *Cancer Res.*, **75**, 2222-2231, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3379>.
 47. Van den Berk, L. C. J., van der Veer, A., Willemse, M. E., Theeuwes, M. J. G. A., Luijendijk, M. W., Tong, W. H., van der Sluis, I. M., Pieters, R., and den Boer, M. L. (2013) Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in pediatric

- precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, **122**, 2643-2643, <https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.2643.2643>.
48. El-Obeid, A., Sunnuqrut, N., Hussain, A., Al-Hussein, K., Gutiérrez, M. I., and Bhatia, K. (2004) Immature B cell malignancies synthesize VEGF, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR), *Leuk. Res.*, **28**, 133-137, [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(03\)00188-7](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(03)00188-7).
49. Mizia-Malarz, A., and Sobol-Milejska, G. (2017) Assessment of angiogenesis in children with acute lymphoblastic leukemia based on serum vascular endothelial growth factor assay, *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.*, **38**, 321-325, https://doi.org/10.4103/IJMPO.IJMPO_109_17.
50. Azadniv, M., Myers, J. R., McMurray, H. R., Guo, N., Rock, P., Coppage, M. L., Ashton, J., Becker, M. W., Calvi, L. M., and Liesveld, J. L. (2020) Bone marrow mesenchymal stromal cells from acute myelogenous leukemia patients demonstrate adipogenic differentiation propensity with Implications for leukemia cell support, *Leukemia*, **34**, 391-403, <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0568-8>.
51. Ren, K. (2019) Exosomes in perspective: a potential surrogate for stem cell therapy, *Odontology*, **107**, 271-284, <https://doi.org/10.1007/s10266-018-0395-9>.
52. Morales-Hernández, A., and McKinney-Freeman, S. (2021) GABA gets blood on its hands, *Blood*, **137**, 723-724, <https://doi.org/10.1182/blood.2020008772>.
53. Luque, A., Carpizo, D. R., and Iruela-Arispe, M. L. (2003) ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165, *J. Biol. Chem.*, **278**, 23656-23665, <https://doi.org/10.1074/JBC.M212964200>.
54. Hall-Glenn, F., and Lyons, K. M. (2011) Roles for CCN2 in normal physiological processes, *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 3209-3217, <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0782-7>.
55. Nemunaitis, J. (1993) Macrophage function activating cytokines: potential clinical application, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **14**, 153-171, [https://doi.org/10.1016/1040-8428\(93\)90022-V](https://doi.org/10.1016/1040-8428(93)90022-V).
56. Liso, A., Venuto, S., Coda, A. R. D., Giallongo, C., Palumbo, G. A., and Tibullo, D. (2022) IGFBP-6: at the crossroads of immunity, tissue repair and fibrosis, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, <https://doi.org/10.3390/ijms23084358>.
57. Gandhi, M. K., Moll, G., Smith, C., Dua, U., Lambley, E., Ramuz, O., Gill, D., Marlton, P., Seymour, J. F., and Khanna, R. (2007) Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic hodgkin lymphoma, *Blood*, **110**, 1326-1329, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-066100>.
58. Zhu, X., Miao, X., Wu, Y., Li, C., Guo, Y., Liu, Y., Chen, Y., Lu, X., Wang, Y., and He, S. (2015) ENO1 promotes tumor proliferation and cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in non-Hodgkin's lymphomas, *Exp. Cell Res.*, **335**, 216-223, <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2015.05.020>.
59. Perretti, M., and D'Acquisto, F. (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation, *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 62-70, <https://doi.org/10.1038/nri2470>.
60. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., and Yang, B. B. (2002) Structure and function of aggrecan, *Cell Res.*, **12**, 19-32, <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290106>.
61. Sengprasert, P., Leearamwat, N., Ngarmukos, S., Yuktananda, P., Tanavalee, A., and Reantragoon, R. (2022) Upregulation of antigen presentation function and inflammation in chondrocytes by induction of proteoglycan aggrecan peptides (P16-31 and P263-280), *Clin. Exp. Rheumatol.*, **40**, 596-607, <https://doi.org/10.55563/clinexprheumatol/hjzqfs>.
62. Monteith, A. J., Miller, J. M., Maxwell, C. N., Chazin, W. J., and Skaar, E. P. (2021) Neutrophil extracellular traps enhance macrophage killing of bacterial pathogens, *Sci. Adv.*, **7**, eabj2101, <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj2101>.
63. Su, C.-T., and Urban, Z. (2021) LTBP4 in health and disease, *Genes*, **12**, 795, <https://doi.org/10.3390/genes12060795>.
64. Xavier, S., Sahu, R. K., Landes, S. G., Yu, J., Taylor, R. P., Ayyadevara, S., Megyesi, J., Stallcup, W. B., Duffield, J. S., Reis, E. S., Lambris, J. D., and Portilla, D. (2017) Pericytes and immune cells contribute to complement activation in tubulointerstitial fibrosis, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **312**, F516-F532, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00604.2016>.
65. Morra, L., and Moch, H. (2011) Periostin Expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update, *Virchows Arch.*, **459**, 465-475, <https://doi.org/10.1007/s00428-011-1151-5>.
66. Ding, L., and Morrison, S. J. (2013) Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches, *Nature*, **495**, 231-235, <https://doi.org/10.1038/nature11885>.

MOLECULAR CHANGES IN IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BONE MARROW MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN LYMPHOID NEOPLASIA

N. A. Petinati^{1*#}, A. V. Sadovskaya^{1,2#}, N. V. Sats¹, N. M. Kapranov¹, Yu. O. Davydova¹,
E. A. Fastova¹, A. U. Magomedova¹, A. N. Vasilyeva¹, O. A. Aleshina¹,
G. P. Arapidi^{3,4,5}, V. O. Shender^{3,4}, I. P. Smirnov³, O. V. Pobeguts³,
M. A. Lagarkova³, N. I. Drize¹, and E. N. Parovichnikova¹

¹ National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of the Russian Federation,
125167 Moscow, Russia; e-mail loel@mail.ru

² Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia

³ Federal State Budgetary Institution Lopukhin Federal Research and Clinical Center
of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia

⁴ Institute of Bioorganic Chemistry
named after Academicians M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia

⁵ Moscow Institute of Physics and Technology (State University),
141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

The immune system and bone marrow stromal cells play an important role in maintaining normal hematopoiesis. Lymphoid neoplasia disturbs not only the development of immune cells, but other immune response mechanisms as well. Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) of the bone marrow are involved in regulation of immune response through both intercellular interactions and secretion of various cytokines. In hematological malignancies, the stromal microenvironment of the bone marrow, including MSCs, is altered. The aim of the study was to analyze the effects of lymphoid neoplasia from early precursor cells that are in direct contact with the bone marrow stroma (acute lymphoblastic leukemia /ALL/) and later extramedullary cells (diffuse large B-cell lymphoma /DLBCL/) on the immunological function of MSCs. Growth parameters, immunophenotype, expression pattern of genes of interest, and secretion pattern of bone marrow MSCs from patients with ALL and DLBCL at the onset of the disease and in remission were studied. MSCs from healthy donors of the corresponding ages were used as controls. It has been shown that the concentration of MSCs in the bone marrow of patients with ALL is reduced at the onset of the disease and is restored upon reaching remission; in patients with DLBCL this parameter does not change. The proliferative capacity of MSCs did not change in patients with ALL; however, the cells of the patients both at the onset and in remission of DLBCL proliferated significantly faster than donors'. In patients' MSCs, immunophenotype and expression of the genes important for differentiation, immunological status maintenance, and cytokine expression differed significantly from those of healthy donors and depended on the nosology of the disease. The secretomes of MSCs varied greatly; a number of proteins associated with the regulation of immune response, differentiation and maintenance of hematopoietic stem cells were depleted in the secretomes of patients' cells. Lymphoid neoplasia leads to dramatic changes in functional immunological status of MSCs.

Keywords: MSCs, ALL, DLBCL, gene expression, protein secretion

МИКРОГЛИЯ И ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ КАК ИСТОЧНИК IL-6 В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

© 2024 В.С. Гоголева^{1*}, К.Т. Нгуен², М.С. Друцкая¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
117997 Москва, Россия; электронная почта: violettegogoleva@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.12.2023

После доработки 01.02.2024

Принята к публикации 06.02.2024

Рассеянный склероз (РС) – это комплексное аутоиммунное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), приводящее к разрушению миелиновой оболочки нейронов и нарушению проводимости нервных сигналов. Изучение молекулярных механизмов развития РС критически важно, так как заболевание характеризуется ранней манифестацией, хроническим течением и терапией, основанной на симптоматическом лечении. Известно, что цитокины играют ключевую роль в патогенезе РС, при этом одним из ключевых медиаторов является интерлейкин-6 (IL-6). В настоящей работе была исследована роль IL-6, продуцируемого микроглией и дендритными клетками, в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЕАЕ), широко используемой модели РС на мышах. Работу проводили на мышах с клеточно-специфичным удалением IL-6 из CX₃CR1⁺-клеток, в том числе из микроглии, и из дендритных клеток CD11c⁺. Было установлено, что мыши с удалением IL-6 из микроглии или из дендритных клеток развивают более слабые симптомы по сравнению с мышами дикого типа. В ЦНС мышей с инактивацией IL-6 в микроглии на пике ЕАЕ происходило повышение доли регуляторных Т-клеток (T_{reg}) и снижение процентного содержания патогенетических IFN γ -продуцирующих CD4⁺ Т-клеток, что коррелировало с уменьшением количества провоспалительных моноцитов. В то же время при удалении IL-6 из микроглии наблюдалось увеличение содержания CCR6⁺ Т-клеток и GM-CSF-продуцирующих Т-клеток. У мышей с дефицитом IL-6 в дендритных клетках наблюдалось не только ранее описанное увеличение доли T_{reg} и уменьшение доли Т-хелперов, продуцирующих IL-17A (T_H17-клеток), но и уменьшение продукции GM-CSF и IFN γ во вторичных лимфоидных органах. Таким образом, функции IL-6 в организме зависят от источника и локализации иммунного ответа: IL-6 из микроглии выполняет как патогенетические, так и протективные функции именно в ЦНС, в то время как IL-6 из дендритных клеток, помимо критически важного участия в соотношении T_{reg} и T_H17-клеток, может стимулировать продукцию цитокинов, ассоциированных с патогенетическими функциями Т-клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: интерлейкин-6, микроглия, дендритные клетки, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, рассеянный склероз, мышинные модели.

DOI: 10.31857/S0320972524050106 EDN: YOAHJS

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, поражающее центральную нервную систему (ЦНС) и

вызывающее такие серьезные последствия, как нарушения зрения, опорно-двигательного аппарата и когнитивных функций. В течение последних десятилетий наблюдается тенденция к увеличению количества людей, у которых диагностирован РС,

Принятые сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ЕАЕ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; IL – интерлейкин; T_H – Т-хелперы; T_{reg} – регуляторные Т-клетки; ΔDC – удаление гена только в дендритных клетках; ΔMG – удаление гена только в микроглии.

* Адресат для корреспонденции.

однако на данный момент доступны методы терапии, направленные исключительно на модуляцию симптомов заболевания [1]. В связи с этим поиск новых терапевтических мишеней остается крайне актуальной задачей. Одной из наиболее востребованных экспериментальных моделей РС на мышах является экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ) [2]. Патогенез ЕАЕ главным образом обусловлен активацией, последующей дифференцировкой и инфильтрацией в ЦНС $CD4^+$ Т-клеток в ответ на иммунизацию антигенами, входящими в состав миелиновой оболочки нейронов, в полном адьюванте Фрейнда [3]. Критическую роль в патогенезе ЕАЕ выполняют цитокины, одним из которых является IL-6. В частности, было показано, что фармакологическая и генетическая инактивация IL-6 в мышинной модели рассеянного склероза приводит к уменьшению тяжести заболевания [4] или абсолютной резистентности [5].

Установлено, что патогенетическая роль IL-6 обусловлена различными механизмами, участвующими в регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и развития популяций $CD4^+$ Т-клеток. Было показано, что при иммунизации миелиновым пептидом MOG_{35–55} у мышей дикого типа, по сравнению с мышами, дефицитными по IL-6, на поверхности эндотелиальных клеток, входящих в состав ГЭБ, наблюдалась повышенная экспрессия таких молекул адгезии, как VCAM-1 и ICAM-1 [5]. Известно, что для передачи сигнала от IL-6 необходима активация двух субъединиц рецепторного комплекса IL-6 – IL-6R α и gp130. Оказалось, что *транс*-презентация IL-6 (передача внутриклеточного сигнала за счет взаимодействия комплекса IL-6R–IL-6 на поверхности одной клетки с gp130 на поверхности другой) необходима для поляризации патогенетических Т-хелперов, продуцирующих IL-17A (Т_H17-клетки) в модели ЕАЕ [6]. В подтверждение этому удаление gp130 с поверхности Т-клеток подавляет дифференцировку $CD4^+$ Т-клеток в регуляторные Т-клетки (Т_{reg}), экспрессирующие транскрипционный фактор FoxP3, тем самым способствуя развитию Т_H17-клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор ROR γ t⁺ [7]. Примечательно, что существует положительная обратная связь между IL-6 и IL-17A, продуцируемым патогенетическими Т_H17-клетками: IL-17A стимулирует продукцию IL-6 астроцитами, что дополнительно способствует поляризации таких Т_H17-клеток [8, 9].

Основными источниками IL-6 в ЦНС выступают различные клетки неиммунного происхождения, а именно: нейроны, астроциты и эндотелиальные клетки [10], однако в модели ЕАЕ главный источник IL-6 представлен миелоидными клетками [6], а именно: дендритными клетками и микро-

глией (резидентные макрофаги ЦНС). Несмотря на то что имеется много данных, свидетельствующих о различных функциях IL-6 в модели ЕАЕ, недостаточно изучены особенности продукции цитокинов Т-клетками в ходе развития заболевания в зависимости от конкретной субпопуляции миелоидных клеток, что и стало предметом исследования настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мыши. Работу проводили на линиях мышей с делецией гена *Il6* в миелоидных клетках: *Cd11c^{Cre} × Il6^{fl/fl}* (мыши с делецией гена *Il6* преимущественно в дендритных клетках) [11] и *Cx3cr1^{CreER} × Il6^{fl/fl}* (мыши с делецией гена *Il6* в миелоидных клетках CX₃CR1⁺, в том числе в микроглии). Для получения линии мышей с делецией гена *Il6* в миелоидных клетках CX₃CR1⁺ скрещивали мышей *Il6^{fl/fl}* [12] и мышей *Cx3cr1^{CreER}* [13]. В экспериментах были использованы самки и самцы возрастом 9–12 недель. Мышей разводили и содержали на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН и Автономного экспериментально-биологического комплекса для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660). Эксперименты на генетически-модифицированных мышах в модели ЕАЕ были одобрены Биоэтическим комитетом ИМБ РАН (Протокол № 3 от 21.09.2023).

Введение тамоксифена. Тамоксифен («Sigma Aldrich», США) растворяли в кукурузном масле («Sigma Aldrich») из расчета 15 мг/мл путем длительной инкубации и постоянного перемешивания на термостатической бане при 37 °С в защищенном от света месте в течение ночи. Полученный раствор раскатывали по 2 мл в пробирки и хранили при +4 °С в течение 5 дней. Для удаления IL-6 в микроглии мышам *Cx3cr1^{CreER} × Il6^{fl/fl}* и контрольной группе мышей дикого типа (*Il6^{fl/fl}*) в возрасте 8–9 недель вводили 100 мкл раствора тамоксифена внутрибрюшинно из расчета 75 мг/кг каждый день в течение 5 дней.

Индукция ЕАЕ. Мышей подкожно иммунизировали 100 мкл суспензии MOG_{35–55}-пептида (миелин-олигодендроцитарный гликопротеин; «Anaspec», США) в полном адьюванте Фрейнда («Sigma Aldrich») с добавлением 5 мг/мл убитых *Mycobacterium tuberculosis* («Difco», США). После введения суспензии MOG_{35–55}-пептида в тот же день и еще через 2 дня мышам вводили коклюшный токсин («Sigma Aldrich») внутрибрюшинно из расчета 200 нг на мышь для увеличения проницаемости ГЭБ. После индукции ЕАЕ проводили оценку

развития клинических симптомов заболевания по шкале от 0 до 5, где 5 – наибольшая степень заболевания; 0 – нет симптомов; 0,5 – частичная потеря тонуса хвоста; 1 – полная потеря тонуса хвоста; 1,5 – частичное нарушение рефлекса переворачивания; 2 – полное нарушение рефлекса переворачивания; 3 – отказ одной задней конечности; 3,5 – отказ обеих задних конечностей; 4 – отказ одной передней конечности и обеих задних конечностей; 4,5 – отказ всех конечностей.

Выделение клеток. Для выделения периферических лейкоцитов крови мыши проводили забор крови в пробирки, содержащие раствор гепарина; затем проводили центрифугирование в градиенте плотности Фиколла в течение 30 мин без ускорения и торможения (1,077 г/см³, «ПанЭко», Россия). Для последующего анализа отбирали фракции, содержащие периферические мононуклеазы. Суспензию клеток из селезенки и лимфатических узлов получали путем механической гомогенизации через 70-мкм фильтр («NEST», Китай) в растворе PBS с добавлением 2% FBS. Лизис эритроцитов в суспензии спленоцитов проводили путем добавления буфера ACK (Ammonium-Chloride-Potassium: 1,5 M NH₄Cl; 100 mM KHCO₃; 10 mM EDTA-2Na в дистиллированной воде; pH 7,2). Иммунные клетки из ЦНС выделяли по ранее описанному протоколу [14]. Вкратце, мышей подвергали анестезии и проводили транскардиальную перфузию с использованием 0,9%-ного раствора NaCl. Затем извлекали спинной и головной мозг и механически гомогенизировали. Ферментативную диссоциацию проводили в растворе DPBS с добавлением 1,5 мг/мл коллагеназы II («Gibco») и 50 мкг/мл ДНКазы I («Roche», Швейцария). Реакцию останавливали путем добавления большого объема холодного PBS, содержащего 2% FBS. Полученную суспензию клеток гомогенизировали с помощью шприца с иглой размером 18G × 1,5". Затем проводили разделение фракции иммунных клеток в градиенте плотности Перколл («GE Healthcare», США) 30/37/70 при центрифугировании (500 g, 25 °C, 40 мин, без ускорения и торможения).

Цитофлуориметрический анализ. Для измерения продукции цитокинов CD4⁺ Т-клетками суспензию клеток из селезенки или лимфатических узлов инкубировали в течение 4 ч при 37 °C, в атмосфере 5% CO₂ в присутствии 50 нг/мл фобол-12-миристан-13-ацетата (ФМА; «Sigma Aldrich»), 500 нг/мл иономицина («Sigma Aldrich») и 3 мкг/мл брэфельдина А («eBioscience», США). Для блокировки неспецифического связывания антител с Fcγ-рецепторами все клеточные суспензии инкубировали в течение 20 мин при 4 °C с антителами к CD16/CD32 (клон 2.4G2, коллекция in-house DRFZ), после чего клетки отмывали центрифугированием в PBS, содержащем 2% FBS. К клеткам

добавляли эпитопспецифичные антитела к поверхностным маркерам: anti-CD45 (клон 30-F11, «BioLegend», США), anti-CD11b (клон M1/70, «BioLegend»), anti-Ly6C (клон HK1.4, «Invitrogen», США), anti-MHCII (клон M5/114.15.2, «BioLegend»), anti-CX₃CR1 (клон SA011F11, «BioLegend»), anti-CD4 (клон RM4-5, «BioLegend»), anti-TCRb (клон H57-597, «eBioscience»), anti-IFNγ (клон XMG1.2, «BioLegend»), anti-IL-17A (клон eBio17B7, «BioLegend»), anti-GM-CSF (клон MP1-22E9, «BioLegend»), anti-FoxP3 (клон FJK-16s, «Invitrogen»), anti-RORγt (клон B2D, «Invitrogen»). Для окрашивания мертвых клеток и их исключения из последующего анализа использовали Fixable Viability Dye («eBioscience»). Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II или BDFACSAria III («Beckton Dickinson», США). Популяцию CD45⁺CD4⁺CX₃CR1⁺ моноцитов крови или CD45⁺CD11b⁺CX₃CR1⁺ микроглии сортировали на приборе BDFACSAria III с чистотой >90%. Полученные данные анализировали с помощью FlowJo Software («Beckton Dickinson»).

Иммуноферментный анализ. Отсортированные моноциты и клетки микроглии активировали липополисахаридом (LPS, (100 нг/мл в течение 4 ч)). Затем оценивали концентрацию IL-6 в супернатанте методом ИФА с использованием набора для IL-6 мыши ELISA Ready-SET-Go! («eBioscience», США), следуя протоколу производителя.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 9. Выборки проверяли на нормальность распределения с помощью критериев Шапиро–Уилка или Колмогорова–Смирнова. В случае нормального распределения для сравнения выборок использовали *t*-критерий Стьюдента или однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В противном случае использовали непараметрические тесты Манна–Уитни или Крускала–Уоллиса. Различия считали достоверными при *p* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

IL-6 из миелоидных клеток выполняет критически важную роль в патогенезе ЕАЕ. Для изучения роли IL-6 из миелоидных клеток в развитии ЕАЕ эксперименты проводили на двух группах генетически модифицированных мышей с генетической инактивацией IL-6: 1) только в дендритных клетках (IL6^{ΔDC}), 2) только в микроглии (IL6^{ΔMG}). Контрольная группа была представлена мышами дикого типа из того же помета (IL6^{fl/fl}). Мыши с удалением IL-6 в дендритных клетках были ранее получены в лаборатории и характеризуются конститутивной инактивацией IL-6 в клетках CD11c⁺ [11, 15]. Получение мышей с дефи-

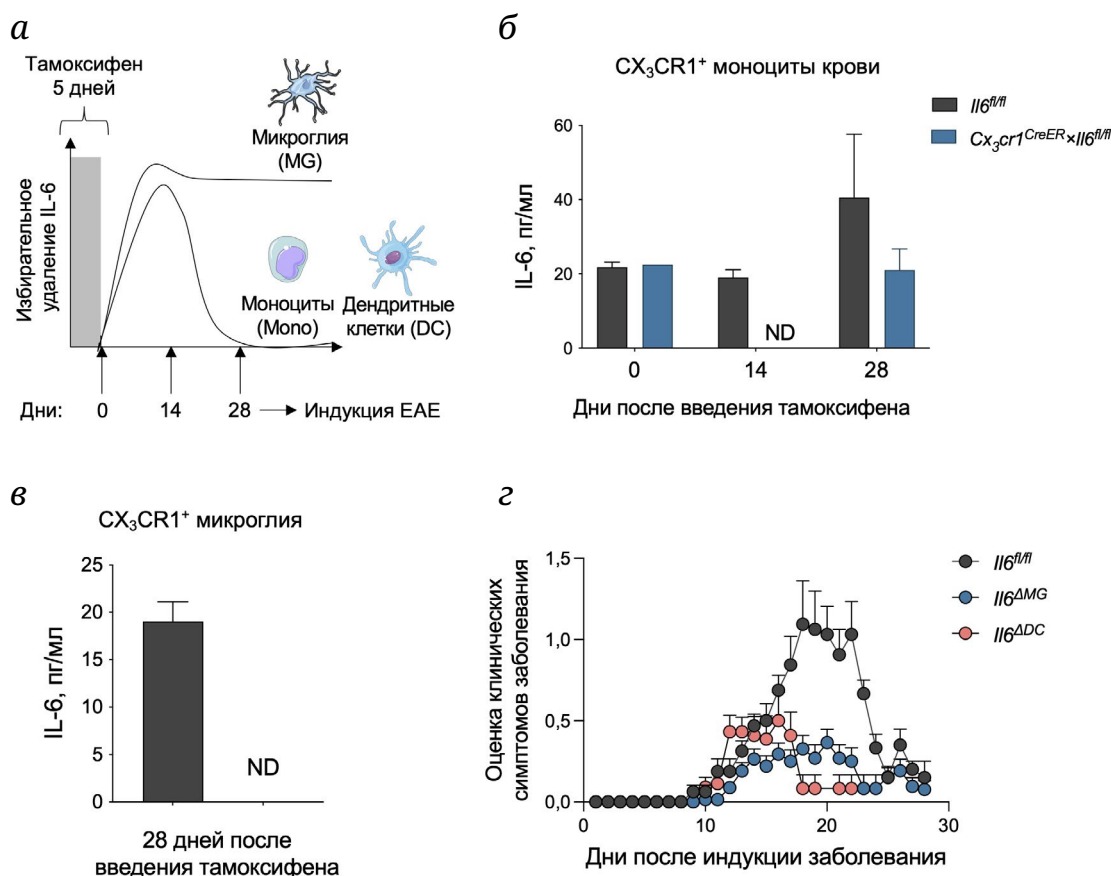


Рис. 1. Мыши с тамоксифен-зависимой инактивацией IL-6 в CX3CR1⁺ микроглии устойчивы к развитию EAE. *а* – Схема эксперимента. Мышам вводили тамоксифен из расчета 75 мкг/г в течение 5 дней. Далее, через 7–14 дней после курса тамоксифена удаление IL-6 детектировали как в тканерезидентных макрофагах, так и в моноцитах, но уже через 28 дней происходило обновление пула моноцитов из костного мозга и дефицит IL-6 наблюдали только в тканерезидентных макрофагах, в том числе в микроглии; *б* – концентрация IL-6 в супернатанте отсортированных моноцитов CX3CR1⁺, выделенных из периферической крови мышей *Cx3cr1^{CreER} × Il6^{fl/fl}* на 0, 14, 28 дни после введения тамоксифена и активированных LPS в течение 4 ч; ND – не детектируется; *в* – концентрация IL-6 в супернатанте отсортированной микроглии CX3CR1⁺, выделенной из ЦНС мышей *Cx3cr1^{CreER} × Il6^{fl/fl}* на 28 день после введения тамоксифена и активированной LPS в течение 4 ч; *г* – динамика развития клинических симптомов EAE у мышей дикого типа (*Il6^{fl/fl}*), мышей с удалением IL-6 только в микроглии (*Il6^{ΔMG}*) и мышей с удалением IL-6 только в дендритных клетках (*Il6^{ΔDC}*), иммунизированных MOG_{35–55}-пептидом в полном адъюванте Фрейнда. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в трех независимых экспериментах с минимальным количеством мышей в группе *n* = 4 в каждом эксперименте

цитом IL-6 в микроглии проводили путем скрещивания мышей *Cx3cr1^{CreER}*, экспрессирующих тамоксифен-зависимую Cre-рекомбиназу под контролем промотора CX3CR1 [13], и мышей с «флосированным» геном *Il6* (*Il6^{fl/fl}*) [12]. Принцип работы этой системы заключается в клеточно-специфичном удалении окаймленного loxP-сайтами («флосированного») гена *Il6* Cre-рекомбиназой, спшитой с мутантной формой эстрогенового рецептора, только в клетках CX3CR1⁺ в ответ на введение тамоксифена (рис. 1, *а*).

Для тканеспецифичной инактивации IL-6 исключительно в клетках микроглии мышам *Cx3cr1^{CreER} × Il6^{fl/fl}* и контрольным мышам дикого типа (*Il6^{fl/fl}*) вводили тамоксифен из расчета 75 мкг/г в течение 5 дней; через 14 дней после введения

тамоксифена удаление IL-6 происходило как в моноцитах (рис. 1, *б*), дендритных клетках, так и в микроглии [13]. После полного обновления пула миелоидных клеток CX3CR1⁺ из костного мозга, а именно через 28 дней после введения тамоксифена, такие мыши сохраняли делецию *Il6* только в популяции долгоживущих тканерезидентных макрофагов, в том числе в клетках микроглии (рис. 1, *в*).

Индукцию EAE проводили путем иммунизации MOG_{35–55}-пептидом в полном адъюванте Фрейнда и последующего введения коклюшного токсина для повышения проницаемости ГЭБ. Оценку клинических симптомов заболевания начинали с 8-го дня после иммунизации. Было установлено, что мыши с дефицитом IL-6 только в микроглии или только в дендритных клетках

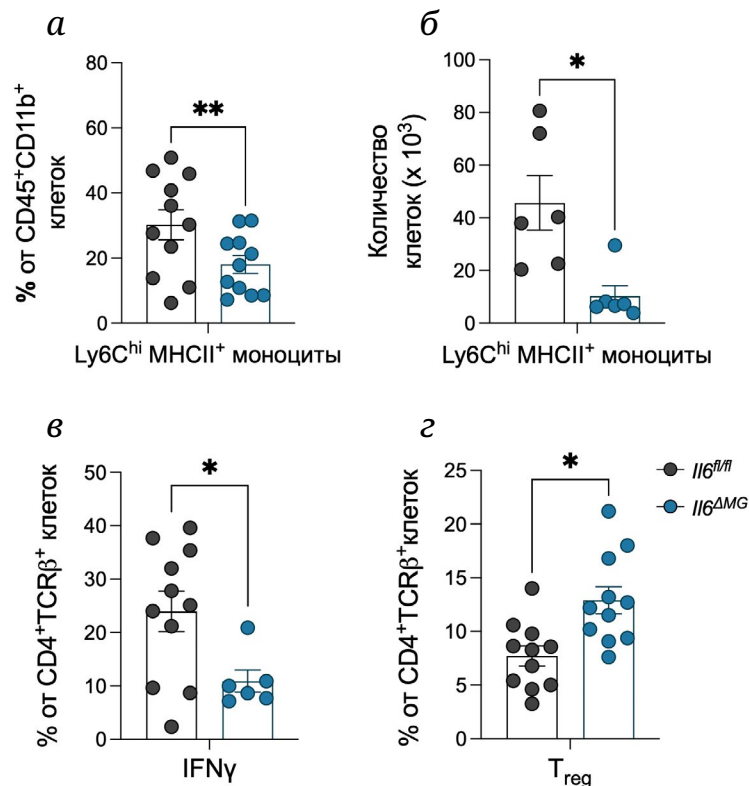


Рис. 2. IL-6, продуцируемый микроглией, стимулирует развитие патогенетических моноцитов в ЦНС и продукцию IFN γ на пике ЕАЕ. *а* – Доля Ly6C^{hi}MHCII⁺-клеток от CD45⁺CD11b⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ; *б* – абсолютное количество Ly6C^{hi}MHCII⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ; *в* – доля IFN γ -продуцирующих клеток, рестимулированных ФМА/иономицином, от клеток CD4⁺TCR β ⁺ в ЦНС на пике ЕАЕ; *г* – доля FoxP3⁺ T_{reg} от CD4⁺TCR β ⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ. Представлены объединенные (*а*, *в* и *г*) или репрезентативные данные (*б*) с числом мышей каждого генотипа $n = 5-6$. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Использовали *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

развивают более слабые симптомы заболевания по сравнению с контрольной группой мышей дикого типа (рис. 1, *г*). Эти результаты согласуются с литературными данными о том, что именно дендритные клетки [6] и микроглия [16] являются критически важными источниками IL-6 в модели ЕАЕ.

IL-6 из микроглии регулирует иммунный ответ в ЦНС на пике ЕАЕ. Поскольку микроглия – это тканерезидентные макрофаги ЦНС, то предполагается, что опосредуемые этими клетками функции будут в основном затрагивать процессы, происходящие в ЦНС. В связи с этим на 16-й день после иммунизации, что соответствовало эффекторной фазе заболевания, проводили цитофлуориметрический анализ содержания миелоидных клеток и антиген-специфичных CD4⁺ T-клеток в ЦНС. Было установлено, что у мышей с инактивацией IL-6 в микроглии происходило уменьшение процентного (рис. 2, *а*) и абсолютного (рис. 2, *б*) содержания Ly6C^{hi}MHCII⁺-моноцитов, являющихся исключительно патогенетическими в модели ЕАЕ. Кроме этого, происходило уменьшение процентного содержания IFN γ -продуцирующих CD4⁺ T-клеток

(рис. 2, *в*). Эти результаты согласуются между собой, т.к. именно IFN γ обеспечивает дифференцировку Ly6C^{hi}-моноцитов в MHCII⁺-эффекторные дендритные клетки [17]. Параллельно, эти результаты соответствуют литературным данным о стимуляции развития T_{reg} (рис. 2, *г*) при низких концентрациях IFN γ [18].

Как было установлено в ходе текущей работы, мыши с делецией гена, кодирующего IL-6, в микроглии развивают более слабые симптомы ЕАЕ, по сравнению с мышами дикого типа, однако они не обладают полной устойчивостью к развитию заболевания (рис. 1, *г*). При этом у таких мышей происходит повышение процентного содержания T_{reg}, подавляющих развитие ЕАЕ (рис. 2, *г*), то есть, возможно, присутствует дополнительный компонент, обеспечивающий развитие клинических симптомов. Нами было выдвинуто предположение, что у таких мышей может происходить увеличение инфильтрации патогенетических T-клеток в ЦНС. Известно, что ось CCR6/CCL20 является ключевой для миграции иммунных клеток в ЦНС и особенно необходима для первой волны инфильтрации T-клеток в ЦНС [19]. Действительно, у мышей

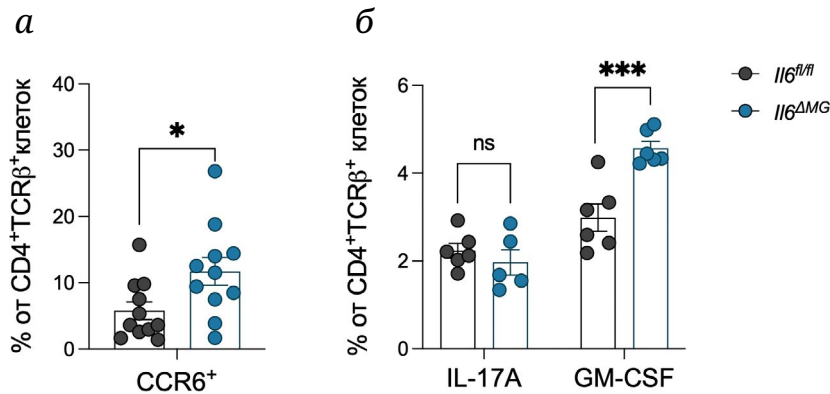


Рис. 3. Делеция гена, кодирующего IL-6 в микроглии, приводит к увеличению миграции Т-клеток и индукции GM-CSF-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток в ЦНС. *а* – Процентное содержание CCR6⁺-клеток от CD4⁺TCRβ⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ. *б* – Доля GM-CSF-продуцирующих клеток, рестимулированных ФМА/иономицином, от CD4⁺TCRβ⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ. Представлены объединенные (*а*) или репрезентативные данные (*б*) с числом мышей каждого генотипа *n* = 5–6. Данные представлены как среднее ± SEM. Использовали *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна–Уитни; * *p* < 0,05; *** *p* < 0,001; ns – недостоверные отличия

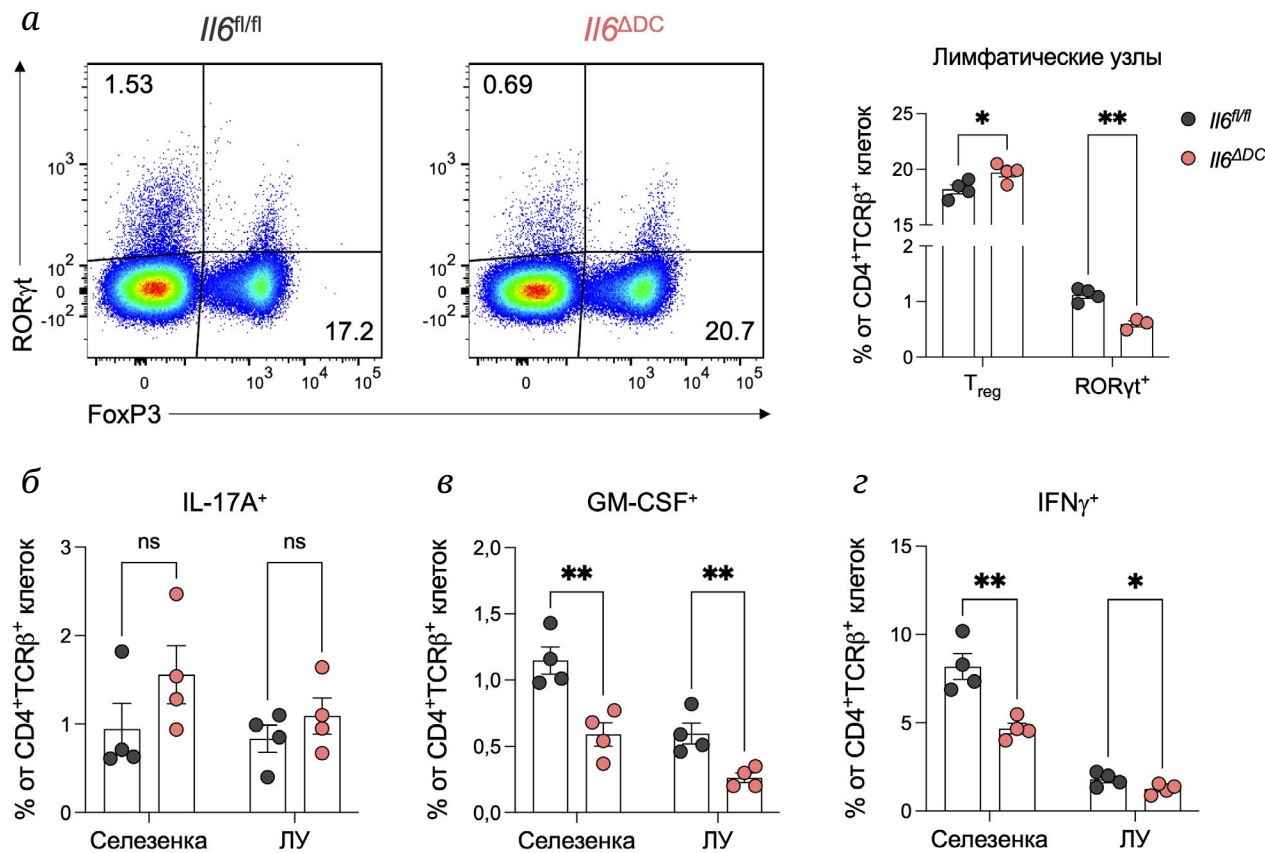


Рис. 4. IL-6 из дендритных клеток стимулирует продукцию цитокинов CD4⁺ Т-клетками в периферических лимфоидных органах на пике ЕАЕ. *а* – Репрезентативные поточечные диаграммы (слева) и процентное содержание (справа) RORγt⁺ и FoxP3⁺ CD4⁺ Т-клеток, выделенных из лимфатических узлов мышей *IL6^{fl/fl}* и *IL6^{ΔDC}* на пике ЕАЕ. *б–г* – Процентное содержание IL-17A-, GM-CSF-, IFNγ-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток, выделенных из селезенки и лимфатических узлов и рестимулированных ФМА/иономицином. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в двух независимых экспериментах. Использовали *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна–Уитни; * *p* < 0,05; *** *p* < 0,001; ns – недостоверные отличия

с удалением IL-6 в микроглии было обнаружено повышение доли CCR6⁺ Т-клеток в ЦНС (рис. 3, *а*). Более того, у таких мышей увеличивалось про-

центное содержание GM-CSF-, но не IL-17A-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток (рис. 3, *б*). Известно, что продукция GM-CSF Т-клетками в модели ЕАЕ кри-

тически важна для патогенеза заболевания [20, 21]. При этом GM-CSF способствует миграции иммунных клеток в ЦНС [22]. Таким образом, повышенное содержание CCR6⁺ Т-клеток в ЦНС коррелирует с увеличением поляризации Т-клеток в GM-CSF-продуцирующие клетки.

Таким образом, у мышей с инактивацией IL-6 в микроглии, в соответствии с уменьшением тяжести клинических симптомов ЕАЕ, обнаружено снижение процентного и количественного содержания воспалительных Ly6S^{hi}MHCII⁺-моноцитов в ЦНС, коррелирующее со сниженной продукцией IFN γ Т-клетками и увеличением доли протективных T_{reg}. В то же время у мышей с инактивацией IL-6 в микроглии частичная устойчивость к ЕАЕ может быть связана с повышением миграции Т-клеток в ЦНС в совокупности с увеличением процентного содержания GM-CSF-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток.

IL-6 из дендритных клеток не только определяет соотношение T_H17/T_{reg}, но и влияет на продукцию IFN γ и GM-CSF в периферических лимфоидных органах в модели ЕАЕ. Известно, что одной из функций IL-6 в модели ЕАЕ является ингибирование транскрипционного фактора FoxP3, что, в свою очередь, подавляет развитие протективных T_{reg} [23]. С другой стороны, IL-6 критически важен для развития T_H17-клеток [6]. Действительно, у мышей с удалением IL-6 в дендритных клетках было обнаружено уменьшение процентного содержания ROR γ ⁺ T_H17-клеток и увеличение процентного содержания FoxP3⁺ T_{reg} (рис. 4, а) в лимфатических узлах на пике ЕАЕ, что согласуется со всеми литературными сведениями о патогенетической роли IL-6, продуцируемого дендритными клетками.

На следующем этапе изучали продукцию цитокинов Т-клетками, выделенными из лимфатических узлов и селезенки мышей *IL6^{fl/fl}* и *IL6^{ΔDC}* на пике ЕАЕ и рестимулированными ФМА/иономицином. Было выявлено, что удаление IL-6 из дендритных клеток не влияет на продукцию IL-17А Т-клетками (рис. 4, б), что согласуется с литературными данными [6]. Однако *IL6^{ΔDC}*-мыши характеризовались снижением продукции GM-CSF (рис. 4, в) и IFN γ (рис. 4, г) как в лимфатических узлах, так и в селезенке.

Таким образом, мыши с удалением IL-6 в дендритных клетках характеризуются увеличением доли T_{reg} и уменьшением продукции IFN γ и GM-CSF Т-клетками в периферических лимфоидных органах, что объясняет развитие слабых симптомов ЕАЕ. При этом результаты настоящей работы говорят о том, что IL-6 из дендритных клеток может не только участвовать в индукции патогенетических T_H17-клеток [6], но и стимулировать продукцию GM-CSF и IFN γ Т-клетками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитокины играют ключевую роль в патогенезе ЕАЕ. IL-6 является одним из немногих цитокинов, абсолютно необходимых для развития ЕАЕ [24, 25]. Несмотря на то что в ЦНС главным источником IL-6 являются астроциты [10], показано, что в модели ЕАЕ главным источником IL-6 являются миелоидные клетки [6]. При этом удаление IL-6 в миелоидных клетках LysM⁺ (макрофагах, нейтрофилах) не влияет на течение заболевания [6, 26]. Оказалось, что критически важными для патогенеза ЕАЕ популяциями, продуцирующими IL-6, являются микроглия и дендритные клетки [6].

Действительно, результаты этой работы демонстрируют, что удаление IL-6 в микроглии приводит к развитию слабых симптомов ЕАЕ по сравнению с мышами дикого типа. Стоит отметить, что в другом исследовании было выявлено, что удаление IL-6 в микроглии обеспечивало уменьшение тяжести клинических симптомов ЕАЕ у самок, но не у самцов [16], тем самым подтверждая корреляцию преобладания развития РС у женщин. В настоящей работе было установлено, что у мышей с удалением IL-6 в микроглии происходит уменьшение количества провоспалительных Ly6S^{hi}MHCII⁺-моноцитов, играющих центральную роль в процессе демиелинизации. Этот результат согласуется с литературными данными, демонстрирующими снижение уровня демиелинизации в спинном мозге при удалении IL-6 в микроглии [16]. С другой стороны, речь может идти об одной из *вырожденных* функций IL-6, поскольку тот же фенотип наблюдается при удалении IL-6 из различных его источников в ЦНС, а именно астроцитов и нейронов [16]. Кроме этого, при удалении IL-6 в микроглии наблюдалось уменьшение продукции IFN γ Т-клетками, что, с одной стороны, объясняет снижение количества Ly6S^{hi}MHCII⁺-моноцитов [17], с другой стороны, согласуется с увеличением процентного содержания протективных T_{reg} в ЦНС [18].

При этом в противоречии с уменьшением клинических симптомов ЕАЕ у мышей с удалением IL-6 в микроглии происходило увеличение миграции CD4⁺ Т-клеток в ЦНС и продукции ими GM-CSF. Действительно, в другом исследовании было показано, что инфильтрация Т-клеток при удалении IL-6 из различных клеточных источников в ЦНС не изменяется [16]. Кроме того, полученные результаты служат доказательством корреляции коэкспрессии CCR6 и GM-CSF в инфильтрирующих ЦНС Т-клетках [27]. В совокупности эти данные позволяют предположить, что в контексте нейровоспаления клетки микроглии выполняют как протективные, так и патогенетические функции.

С другой стороны, результаты настоящей работы указывают на исключительно патогенетическую роль IL-6 из дендритных клеток [6]. Действительно, IL-6 из дендритных клеток важен для поддержания баланса ROR γ t⁺ T_H17-клеток и FoxP3⁺ T_{reg}. В недавних исследованиях был предложен вариант терапевтического таргетирования этого сигнального пути за счет ингибирования STAT3 малой молекулой [28] для иммуномодуляции клинической картины у пациентов с РС. Примечательно, что в настоящей работе показано, что IL-6 из дендритных клеток также важен для стимуляции продукции Т-клетками IFN γ и GM-CSF, хотя IL-6 не считался цитокином, необходимым для стимуляции продукции GM-CSF [21].

Таким образом, IL-6, продуцируемый клетками микроглии, может выполнять как патогенетические, так и протективные функции, тогда как IL-6 из дендритных клеток играет исключительно патогенетическую роль.

Вклад авторов. М.С. Друзкая – концепция и руководство работой; В.С. Гоголева, К.Т. Нгуен –

проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования, написание текста; М.С. Друзкая – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00389).

Благодарности. Авторы выражают благодарность К.-С.Н. Атретханы, Д.М. Поташниковой, А.П. Дыгай, Р.В. Зварцеву за ценные советы и методическую помощь в работе. Авторы выражают признательность С.А. Недоспасову за ценные замечания и общее руководство проектом. Работа по сортировке клеток поддержана программой развития МГУ (комплекс для клеточной сортировки на базе FACSAria SORP; «Beckton Dickinson», США).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Charabati, M., Wheeler, M. A., Weiner, H. L., and Quintana, F. J. (2023) Multiple sclerosis: neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting, *Cell*, **186**, 1309-1327, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.008>.
- Steinman, L., Patarca, R., and Haseltine, W. (2023) Experimental encephalomyelitis at age 90, still relevant and elucidating how viruses trigger disease, *J. Exp. Med.*, **220**, <https://doi.org/10.1084/jem.20221322>.
- Krishnarajah, S., and Becher, B. (2022) T(H) cells and cytokines in encephalitogenic disorders, *Front. Immunol.*, **13**, 822919, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822919>.
- Gijbels, K., Brocke, S., Abrams, J. S., and Steinman, L. (1995) Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation, *Mol. Med.*, **1**, 795-805.
- Eugster, H. P., Frei, K., Kopf, M., Lassmann, H., and Fontana, A. (1998) IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis, *Eur. J. Immunol.*, **28**, 2178-2187, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199807\)28:07<2178::AID-IMMU2178>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28:07<2178::AID-IMMU2178>3.0.CO;2-D).
- Heink, S., Yogev, N., Garbers, C., Herwerth, M., Aly, L., Gasperi, C., Husterer, V., Croxford, A. L., Moller-Hackbarth, K., Bartsch, H. S., Sotlar, K., Krebs, S., Regen, T., Blum, H., Hemmer, B., Misgeld, T., Wunderlich, T. F., Hidalgo, J., Oukka, M., Rose-John, S., et al. (2017) Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T(H)17 cells, *Nat. Immunol.*, **18**, 74-85, <https://doi.org/10.1038/ni.3632>.
- Korn, T., Mitsdoerffer, M., Croxford, A. L., Awasthi, A., Dardalhon, V. A., Galileos, G., Vollmar, P., Stritesky, G. L., Kaplan, M. H., Waisman, A., Kuchroo, V. K., and Oukka, M. (2008) IL-6 controls Th17 immunity *in vivo* by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3⁺ regulatory T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18460-18465, <https://doi.org/10.1073/pnas.0809850105>.
- Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y., and Hirano, T. (2008) Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction, *Immunity*, **29**, 628-636, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.018>.
- Ma, X., Reynolds, S. L., Baker, B. J., Li, X., Benveniste, E. N., and Qin, H. (2010) IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes, *J. Immunol.*, **184**, 4898-4906, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000142>.
- Erta, M., Quintana, A., and Hidalgo, J. (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system, *Int. J. Biol. Sci.*, **8**, 1254-1266, <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>.
- Круглов А. А., Носенко, М. А., Корнеев, К. В., Свириева Е. Н., Друзкая М. С., Идальго Х., Недоспасов, С. А. (2016) Получение и предварительная характеристика мышей с генетическим дефицитом IL-6 в дендритных клетках, *Иммунология*, **37**, 316-319, <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-316-319>.

12. Quintana, A., Erta, M., Ferrer, B., Comes, G., Giralt, M., and Hidalgo, J. (2013) Astrocyte-specific deficiency of interleukin-6 and its receptor reveal specific roles in survival, body weight and behavior, *Brain Behav. Immun.*, **27**, 162-173, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.10.011>.
13. Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Williams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., and Jung, S. (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis, *Immunity*, **38**, 79-91, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>.
14. Mufazalov, I. A., and Waisman, A. (2016) Isolation of central nervous system (CNS) infiltrating cells, *Methods Mol. Biol.*, **1304**, 73-79, https://doi.org/10.1007/7651_2014_114.
15. Gubernatorova, E. O., Gorshkova, E. A., Namakanova, O. A., Zvartsev, R. V., Hidalgo, J., Drutsкая, M. S., Tumanov, A. V., and Nedospasov, S. A. (2018) Non-redundant functions of IL-6 produced by macrophages and dendritic cells in allergic airway inflammation, *Front. Immunol.*, **9**, 2718, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02718>.
16. Sanchis, P., Fernandez-Gayol, O., Comes, G., Escrig, A., Giralt, M., Palmiter, R. D., and Hidalgo, J. (2020) Interleukin-6 derived from the central nervous system may influence the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis in a cell-dependent manner, *Cells*, **9**, 330, <https://doi.org/10.3390/cells9020330>.
17. Amorim, A., De Feo, D., Friebel, E., Ingelfinger, F., Anderfuhren, C. D., Krishnarajah, S., Andreadou, M., Welsh, C. A., Liu, Z., Ginhoux, F., Greter, M., and Becher, B. (2022) IFN γ and GM-CSF control complementary differentiation programs in the monocyte-to-phagocyte transition during neuroinflammation, *Nat. Immunol.*, **23**, 217-228, <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01117-7>.
18. Ottum, P. A., Arellano, G., Reyes, L. I., Iruretagoyena, M., and Naves, R. (2015) Opposing roles of interferon-gamma on cells of the central nervous system in autoimmune neuroinflammation, *Front. Immunol.*, **6**, 539, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00539>.
19. Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009) C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE, *Nat. Immunol.*, **10**, 514-523, <https://doi.org/10.1038/ni.1716>.
20. Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011) ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation, *Nat. Immunol.*, **12**, 560-567, <https://doi.org/10.1038/ni.2027>.
21. Komuczki, J., Tuzlak, S., Friebel, E., Hartwig, T., Spath, S., Rosenstiel, P., Waisman, A., Opitz, L., Oukka, M., Schreiner, B., Pelczar, P., and Becher, B. (2019) Fate-mapping of GM-CSF expression identifies a discrete subset of inflammation-driving T helper cells regulated by cytokines IL-23 and IL-1 β , *Immunity*, **50**, 1289-1304.e1286, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.006>.
22. McQualter, J. L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T. W., Hamilton, J. A., Reid, H. H., and Bernard, C. C. (2001) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis, *J. Exp. Med.*, **194**, 873-882, <https://doi.org/10.1084/jem.194.7.873>.
23. Korn, T., and Hiltensperger, M. (2021) Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets, *Cytokine*, **146**, 155654, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155654>.
24. Samoilova, E. B., Horton, J. L., Hilliard, B., Liu, T. S., and Chen, Y. (1998) IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells, *J. Immunol.*, **161**, 6480-6486.
25. Okuda, Y., Sakoda, S., Bernard, C. C., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T., and Yanagihara, T. (1998) IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein, *Int. Immunol.*, **10**, 703-708, <https://doi.org/10.1093/intimm/10.5.703>.
26. Drutsкая, M. S., Gogoleva, V. S., Atretkhany, K. S. N., Gubernatorova, E. O., Zvartsev, R. V., Nosenko, M. A., and Nedospasov, S. A. (2018) Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin 6 as identified by reverse genetics, *Mol. Biol.*, **52**, 963-974, <https://doi.org/10.1134/S0026893318060055>.
27. Restorick, S. M., Durant, L., Kalra, S., Hassan-Smith, G., Rathbone, E., Douglas, M. R., and Curnow, S. J. (2017) CCR6⁺ Th cells in the cerebrospinal fluid of persons with multiple sclerosis are dominated by pathogenic non-classic Th1 cells and GM-CSF-only-secreting Th cells, *Brain Behav. Immun.*, **64**, 71-79, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.03.008>.
28. Aqel, S. I., Yang, X., Kraus, E. E., Song, J., Farinas, M. F., Zhao, E. Y., Pei, W., Lovett-Racke, A. E., Racke, M. K., Li, C., and Yang, Y. (2021) A STAT3 inhibitor ameliorates CNS autoimmunity by restoring Teff:Treg balance, *JCI Insight*, **6**, e142376, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142376>.

MICROGLIA AND DENDRITIC CELLS AS A SOURCE OF IL-6 IN A MOUSE MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

V. S. Gogoleva^{1*}, Q. Chi Nguyen², and M. S. Drutskaya¹

¹ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: violettegogoleva@mail.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Multiple sclerosis (MS) is a complex autoimmune disease of the central nervous system (CNS), characterized by myelin sheath destruction and compromised nerve signal transmission. Understanding the molecular mechanisms driving MS development is critical due to its early onset, chronic course, and therapeutic approaches based only on symptomatic treatment. Cytokines are known to play a pivotal role in the pathogenesis of MS, with interleukin-6 (IL-6) being one of the key mediators. This study investigates the contribution of IL-6 produced by microglia and dendritic cells to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a widely used mouse model of MS. Mice with conditional inactivation of IL-6 in CX₃CR1⁺ cells, including microglia, or CD11c⁺ dendritic cells, displayed less severe symptoms as compared to their wild-type counterparts. Mice with microglial IL-6 deletion exhibited an elevated proportion of regulatory T cells and a reduced percentage of pathogenic IFN γ -producing CD4⁺ T cells, accompanied by a decrease in pro-inflammatory monocytes, in the CNS at the peak of EAE. At the same time, deletion of IL-6 from microglia resulted in an increase of CCR6⁺ T cells and GM-CSF-producing T cells. Conversely, mice with IL-6 deficiency in dendritic cells showed not only the previously described increase in the proportion of regulatory T cells and a decrease in the proportion of T_H17 cells, but also a reduction in the production of GM-CSF and IFN γ in secondary lymphoid organs. In summary, IL-6 functions during EAE depend on both the source and the localization of the immune response: microglial IL-6 exerts both pathogenic and protective functions specifically in the CNS, whereas dendritic cell-derived IL-6, in addition to being critically involved in the balance of regulatory T cells and T_H17 cells, may stimulate the production of cytokines associated with the pathogenetic functions of T cells.

Keywords: interleukin-6, microglia, dendritic cells, experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis, mouse models

АССОЦИИРОВАННЫЙ С ФОСФАТАЗОЙ CD45 ЛИМФОЦИТАРНЫЙ ФОСФОПРОТЕИН LPAP РЕГУЛИРУЕТ ЕЁ СТАБИЛЬНОСТЬ

© 2024 Н.А. Круглова^{1*}, Д.В. Мазуров², А.В. Филатов^{2,3*}

¹ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
ФГБУН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия;
электронная почта: natalya.a.kruglova@yandex.ru

² ГИЦ «Институт иммунологии» ФМБА России,
115522 Москва, Россия; электронная почта: avfilat@yandex.ru

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра иммунологии, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.11.2023

После доработки 14.01.2024

Принята к публикации 16.01.2024

Ассоциированный с фосфатазой лимфоцитарный фосфопротеин (LPAP) является белком-партнёром фосфатазы CD45, однако его функция до сих пор мало изучена. Образование прочного комплекса между LPAP и CD45 позволяет предположить, что LPAP способен регулировать CD45, однако прямых биохимических подтверждений этому до сих пор не получено. Мы обнаружили, что на лимфоидных клетках Jurkat уровни белков LPAP и CD45 взаимосвязаны и коррелируют между собой. Нокаут LPAP приводит к снижению, а повышение его уровня, напротив, вызывает увеличение количества поверхностного CD45. На нелимфоидных клетках K562 такой корреляции не обнаруживалось. Мы предполагаем, что LPAP регулирует стабильность фосфатазы CD45, что, в свою очередь, способно влиять на процессы активации лимфоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: LPAP, CD45, Т-клеточный рецептор, активация лимфоцитов.

DOI: 10.31857/S0320972524050118 **EDN:** YNXWDM

ВВЕДЕНИЕ

Ассоциированный с фосфатазой лимфоцитарный фосфопротеин (LPAP) впервые был описан как молекула, тесно связанная с фосфатазой CD45 [1]. Белок CD45 играет важную роль в активации лимфоцитов, и он исследован довольно хорошо [2]. LPAP, в отличие от своего партнёра, изучен недостаточно полно. LPAP не имеет гомологов в протеоме человека и его функция до сих пор неизвестна. В литературе имеются лишь косвенные данные о его роли в активации Т-клеток и в развитии В-клеток [3]. Тесная связь LPAP с фосфатазой CD45 и его множественное фосфорилирование, в том числе ERK-зависимое фосфорилирование по Ser163, позволяют предположить, что этот белок – один из участников активационного каскада [4, 5]. Молекула CD45 способна регулировать киназу Lck, необходимую для запуска активационного каска-

да лимфоцитов после стимуляции Т-клеточного антигенспецифического рецептора (TCR). Взаимодействуя с CD45, LPAP может влиять на передачу сигнала от TCR лимфоцитов.

Образование прочного комплекса между LPAP и CD45 позволяет предположить, что эти белки связаны функционально. Поскольку LPAP не имеет фосфорилированных тирозинов, он не является непосредственным субстратом фосфатазы CD45, которая дефосфорилирует только модифицированные тирозины. Имеются некоторые указания на то, что LPAP препятствует образованию димеров CD45, которые характеризуются сниженной по сравнению с мономерной формой фосфатазной активностью, и, таким образом, опосредованно регулирует активность CD45 [6].

В ряде наблюдений было показано, что молекула CD45 важна для поддержания стабильности LPAP и его мышинового гомолога CD45-AP. Во-первых,

Принятые сокращения: LPAP – ассоциированный с фосфатазой лимфоцитарный фосфопротеин; mKO – моноклональная культура с нокаутом гена интереса; pKO – поликлональная культура с нокаутом гена интереса.

* Адресат для корреспонденции.

в лимфоцитарных клеточных линиях с нокадауном фосфатазы CD45 белок LPAP синтезируется, но быстро деградирует [1]. Во-вторых, в экспериментах на линии Т-клеток с индуцируемой экспрессией CD45 установлено, что накопление белка LPAP в клетке начинается только после активации синтеза CD45 [7]. Нокадаун CD45 с помощью короткой шпилечной РНК (shRNA) снижает уровень белка LPAP [8]. Данные об обратном влиянии LPAP на CD45 ограничены и противоречивы. В лимфоцитах двух линий мышей с нокаутом LPAP уровень белка CD45 снижен [9, 10], в третьей нокаутной по LPAP линии мышей такого эффекта не наблюдалось [11], как и в клетках Jurkat с нокадауном LPAP [12].

Данные литературы указывают на то, что влияние CD45 на уровень белка LPAP осуществляется на посттранскрипционном уровне [1, 13]. Так, в клетках Jurkat WT (CD45⁺) и J45.01 (CD45⁻) детектируется высокий уровень мРНК LPAP, но белок обнаруживается только в клетках Jurkat дикого типа. При трансфекции конструкции, кодирующей CD45, в клетки J45.01 уровень белка LPAP восстанавливался [1]. Транскрипционный анализ CD45⁺ и CD45⁻ вариантов Т-лимфоцитов показал, что продукция мРНК LPAP и CD45 регулируется независимо друг от друга [13].

Таким образом, совокупность опубликованных данных указывает на связь между уровнями белков LPAP и CD45. Мы предположили, что LPAP для CD45 выполняет роль шаперона, который контролирует стабильность и уровень белка CD45. Для проверки этого предположения были получены клетки Jurkat, нокаутные по CD45 или по LPAP, а также серия линий с различным уровнем белка LPAP. На этих линиях показана корреляция между уровнями белков LPAP и CD45. Существование корреляции подтверждено на клональных и поликлональных популяциях. Полученные данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что функция LPAP состоит в регуляции экспрессии CD45 в клетке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток, антитела и точная цитометрия. Клетки линий Jurkat и K562 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота, L-глутамина (4 мМ) и гентамицина (80 мг/л) (все реагенты – «ПанЭко», Россия) в увлажнённой атмосфере с 5%-ным CO₂ при 37 °С. Мышинные моноклональные антитела CL7 (IgG2a, анти-LPAP), LT45 (IgG2a, анти-CD45), EC101 (IgG1, анти-CD59), MC7E7 (IgG1, анти-CD98) были получены ранее в нашей лаборатории [4]. Были также использованы антитела анти-CD69-PE («BioLegend», США), ОКТ3

(«eBioscience», США), анти-Flag M2 («Sigma-Aldrich», США).

При внутриклеточном окрашивании к осадку клеток добавляли 1 мл PBS с 1%-ным параформальдегидом и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки два раза отмывали в PBS, осадок ресуспендировали в буфере для пермеабиллизации (PBS, содержащий 0,1%-ный сапонин, 0,1%-ный БСА, 0,05%-ный NaN₃). Клетки в пермеабиллизирующем буфере смешивали с антителом CL7-Alexa 594 или LT45-Alexa 594 и инкубировали 30 мин, после чего два раза отмывали в пермеабиллизирующем буфере. При поверхностном окрашивании реакцию и отмывки вели в PBS. Флуоресценцию окрашенных клеток измеряли на приборе CytoFLEX S («Beckman Coulter», США). Клетки сортировали с помощью прибора FACSaria II («Becton Dickinson Biosciences», США).

Создание клеточных линий Jurkat с нокаутом по LPAP или CD45 с помощью CRISPR/Cas9 методом double-nicking. Две таргетные последовательности для генов *PTPRCAP* и *PTPRC*, кодирующих LPAP и CD45 соответственно, выбирали с помощью онлайн-ресурса www.genome-engineering.org [14]. Олигонуклеотиды синтезировали в компании «Евроген» (таблица).

Олигонуклеотиды отжигали и клонировали в вектор pKS-gRNA-BB по рестрикционному сайту BbsI [15, 16]. Для осуществления нокаута клетки Jurkat ($1,5 \times 10^6$) трансфицировали с помощью системы для электропорации Neon («Thermo Fisher Scientific», США) по протоколу производителя. Смесь для электропорации в буфере R содержала по 0,5 мкг плазмид, кодирующих гидовые РНК gR-LPAP-1 и gR-LPAP-3 для нокаута LPAP или gRNA-CD45-1 и gRNA-CD45-2 для нокаута CD45, и 3 мкг плазмиды pcDNA3.3-Cas9 D10A (#41816, «Addgene», США). В случае нокаутирования LPAP через 24 ч после трансфекции клетки клонировали в 96-луночный планшет, через три недели тестировали на экспрессию LPAP и выбирали нокаутные клоны. В случае нокаутирования CD45 через 5 суток после трансфекции оценивали экспрессию CD45 в клетках, наращивали и сортировали популяцию, негативную по CD45.

Создание клеточных линий Jurkat с нокаутом по LPAP методом SORTS. Нокаутирование проводили по методу SORTS (Surface Oligopeptide knock-in for Rapid Target Selection) [17]. Кратко, принцип метода состоял в следующем. С помощью технологии CRISPR/Cas9 в ген целевого белка вставлялась короткая ДНК-конструкция (процесс, который также называется нокин), которая блокировала экспрессию эндогенного белка. При этом в клетках с нокаутом на плазматической мембране экспрессировался маркерный пептид. Наличие метки позволяло отбирать клетки с нокаутом,

Олигонуклеотиды для гидовых РНК (gRNA) *PTPRCAP* и *PTPRC*

Название	Последовательность
5'-gR-LPAP-1	CACCGCATCCCGAGCCCTAAGGTGC
3'-gR-LPAP-1	AAACGCACCTTAGGGCTCGGGATGC
5'-gR-LPAP-3	CACCGCGCTGCCACCCGAGCCCAAG
3'-gR-LPAP-3	AAACCTTGGGCTCGGGTGGCAGCGC
5'-gRNA-CD45-1	CACCGAAATGACAGCGCTTCCAGAA
3'-gRNA-CD45-1	AAACTTCTGGAAGCGCTGTCAATTC
5'-gRNA-CD45-2	CACCGAGGTGATATTACCCTCAGTC
3'-gRNA-CD45-2	AAACGACTGAGGGTAATATCACCTC
5'-2A-LPAP	<u>CGAAAGTGGTCTTGGTCACCCAGCCTGCCCCACACCAGGCCCCACCCCAGGTGCTGAGCCCTCTG-</u> <u>AGCCCCTGCTGTCTCCACAGGCTCTGCCCTGCGGATCCGGCGCAACAAAC</u>
3'-2A-LPAP	<u>GCGGCGCCAGGCCAGTGCTAGGCCAGTGGCCAGCAGTAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGGACAA-</u> <u>CGGTGACAGAGCTGGAGCCACGCTGTCTCCGCACACAAAAAACCAACACAC</u>

Примечание. Последовательности плеч гомологии подчёркнуты, а жирным выделены области комплементарности к матричной плазмиде.

а использование двух меток – клетки с нокаутом по двум аллелям. С этой целью в компании «Евроген» заказывали синтез двух олигонуклеотидов с плечами гомологии: 5'-2A-LPAP и 3'-2A-LPAP (таблица).

Полученные олигонуклеотиды использовали в качестве праймеров для получения донорной ДНК. Матрицей для ПЦР служили плазмиды pUHR-mClover-AID-P2A-CD5HA2-bglpA и pUHR-mClover-AID-P2A-CD5Flag2-bglpA, предназначенные для введения в геном клеток конструкций, кодирующих пептидную метку HA или Flag соответственно [17]. ПЦР-Продукты разгоняли в 1%-ном агарозном геле, вырезали фрагмент размером около 450 п.о., который затем выделяли из геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (#K0692, «Thermo Fisher Scientific») по инструкции производителей. Концентрацию продуктов измеряли на приборе NanoDrop-2000 («Thermo Fisher Scientific»).

Для осуществления нокаута клетки Jurkat ($1,5 \times 10^6$) трансфицировали с помощью системы для электропорации Neon, как описано выше. Смесь для электропорации в буфере R содержала по 0,5 мкг плазмид, кодирующих гидовые РНК gR-LPAP-1 и gR-LPAP-3, 3 мкг плазмиды pcDNA3.3-Cas9 D10A (#41816, «Addgene»), 0,4 мкг донорной ДНК (очищенный ПЦР-продукт, см. выше), кодирующей метку HA, и 0,7 мкг донорной ДНК, кодирующей метку Flag. Через 5 суток после трансфекции клетки тестировали на эффективность моно- и биаллельного нокина по экспрессии эпитопных тагов HA и Flag, используя проточную цитометрию. Клетки наращивали и проводили несколько

раундов сортировки позитивных популяций. Полученные клетки для простоты называли LPAP^{рКО} (КО – нокаут, рКО – поликлональная культура с нокаутом гена интереса).

Получение клеточных линий со стабильной экспрессией LPAP. Клетки HEK293T сеяли по 0,1 млн на лунку 24-луночного планшета, через день культивирования проводили трансфекцию с помощью реагента Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США). Для этого использовали три плазмиды: 0,87 мкг упаковочного вектора ВИЧ-1 pCMVΔ8.2R (#12263, «Addgene»), 1,3 мкг вектора переноса pUHR-LPAP-wt, 0,27 мкг плазмиды pCMV VSVG (#8454, «Addgene»), кодирующей белок G из вируса везикулярного стоматита. Через 6 ч меняли среду, через 48 ч отбирали супернатант и фильтровали его через 0,45-мкм фильтр. Для трансдукции клетки-мишени сеяли по 0,1 млн на лунку 24-луночного планшета и добавляли по 250 мкл супернатанта, содержащего лентивирус. Через 2 суток оценивали эффективность трансдукции с помощью проточной цитометрии. Пул трансдуцированных клеток клонировали, клоны тестировали методом проточной цитометрии.

Активация клеток. Клетки активировали с помощью 10 нг/мл форбол-12-миристин-13-ацетата (PMA, «Sigma-Aldrich»), культивируя в течение 4 ч. Альтернативно клетки активировали путём культивирования 24 ч в планшетах, лунки которых были предварительно покрыты анти-CD3 антителом OKT3 («eBioscience», США) в концентрации от 0,1 до 10 мкг/мл. Активацию останавливали путём добавления к клеткам холодного PBS.

Иммунопреципитация (IP). Клетки суспендировали на холоду в лизирующем буфере, содержащем 1% (w/v) Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 1 mM фенилметилсульфонилфторида, 10 mM NaF и 1 mM ортованадата натрия (все реагенты – «Merck», США). После 30 мин инкубации на льду ядра и нерастворимые клеточные мембраны удаляли центрифугированием в течение 30 мин при 4 °C (20 000 g). IP проводили с помощью антител CL7 или LT45, ковалентно иммобилизованных на носителе AffiGel-Hz («Bio-Rad», США). Иммунопреципитаты трижды отмывали в лизирующем буфере, белок элюировали в буфере образца для SDS-PAGE (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10%-ный глицерин, 2%-ный SDS, 1%-ный 2-меркаптоэтанол и 0,05%-ный бромфеноловый синий) прогреваванием в течение 5 мин при 80 °C.

Электрофорез и Вестерн-блоттинг (WB). Элюированные белки разделяли электрофорезом в 10- или 18%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях в буферной системе Лэммли. После SDS-PAGE белки переносили на PVDF-мембрану полусухим методом. Мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком в PBS с 0,1%-ным Tween-20. Антигены проявляли с помощью первичных, а затем вторичных антител против мышиного IgG, меченных пероксидазой хрена («GE Healthcare», США). Сигнал детектировали на приборе ChemiDoc XRS («Bio-Rad») с использованием реагентов для хемилюминесценции фирмы «Millipore» (США).

Статистическая обработка данных. Для статистического анализа и визуализации данных использовали программу GraphPad Prism 8 («GraphPad Software», США). Данные сравнивались с помощью одновыборочного *t*-критерия. На рисунках приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение (SD). Корреляцию оценивали с использованием непараметрического критерия Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Уровень белков LPAP и CD45 падает в отсутствии белка-партнёра. Ранее было обнаружено, что в отсутствии фосфатазы CD45 уровень LPAP в клетке падает [1]. В то же время данные об обратном влиянии LPAP на экспрессию CD45 противоречивы. Для того чтобы оценить взаимное влияние этих двух белков, мы, используя технологию CRISPR/Cas9, получили клетки Jurkat, нокаутные по CD45 или LPAP.

Мы обнаружили, что в Т-клеточной линии Jurkat, нокаутной по CD45, уровень LPAP составлял лишь 10% от количества белка на родительской

линии, что соответствовало уровню аутофлуоресценции клеток дикого типа (рис. 1, а, б). Чтобы более полно изучить взаимосвязь между экспрессией LPAP и CD45, мы создали панель субклин Jurkat LPAP^{KO} с помощью двух различных подходов. Во-первых, мы использовали «традиционный» способ нокаутирования гена LPAP с помощью технологии CRISPR/Cas9 и путём последующего клонирования получили серию моноклональных культур Jurkat LPAP^{KO} (далее обозначены LPAP^{mKO}, mKO – моноклональная культура с нокаутом гена интереса). Во-вторых, с помощью недавно разработанного метода SORTS [18] мы получили поликлональную линию Jurkat, нокаутную по гену LPAP (далее обозначена LPAP^{pKO}). Второй подход имеет некоторые преимущества. Во-первых, клеточная линия Jurkat является гетерогенной и при работе с отдельными клонами этой линии велик риск того, что наблюдаемый фенотип обусловлен особенностями конкретного клона, а не экспериментальным воздействием. Во-вторых, было показано, что клоны могут сильно отличаться от родительской популяции и поликлональной популяции нокаут-ов, полученных методом сортировки, из-за закрепления нецелевых изменений генома [17–19].

Во всех культурах Jurkat LPAP^{mKO} экспрессия CD45 оказалась сниженной и в среднем составила 30% от уровня дикого типа (рис. 1, в). Уровень CD45 в клетках Jurkat LPAP^{pKO} составлял 37% от уровня CD45 в клетках дикого типа (рис. 1, г). Согласие между данными, полученными на отдельных клонах и на поликлональной популяции, позволяет исключить вклад межклональной вариабельности в наблюдаемый нами фенотип снижения уровня CD45. В контроле в качестве «посторонних» белков мы использовали молекулы CD59 и CD98, для которых отсутствуют данные об их взаимодействии с LPAP. Уровень «посторонних» белков CD59 и CD98 также снижался, но в значительно меньшей степени, чем CD45 (рис. 1, в; $p < 0,0001$). Это указывает на специфичный характер снижения уровня белка CD45 при нокауте LPAP.

Экспрессия CD45 коррелирует с уровнем белка LPAP. Обнаружив, что нокаут LPAP приводит к падению уровня белка CD45, мы решили выяснить, способно ли восстановление в клетке уровня LPAP повысить экспрессию фосфатазы. С этой целью мы выбрали один из клонов Jurkat LPAP^{mKO} и с помощью стабильной лентивирусной трансдукции ввели в него ген, кодирующий LPAP^{WT} (LPAP дикого типа). Затем полученную популяцию клонировали и эффект восстановления экспрессии белков LPAP и CD45 оценили с помощью проточной цитометрии. При тестировании 21 субклона Jurkat мы обнаружили высокий уровень корреляции между экспрессией CD45 и LPAP (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,77$, $p < 0,0001$) (рис. 2, а).

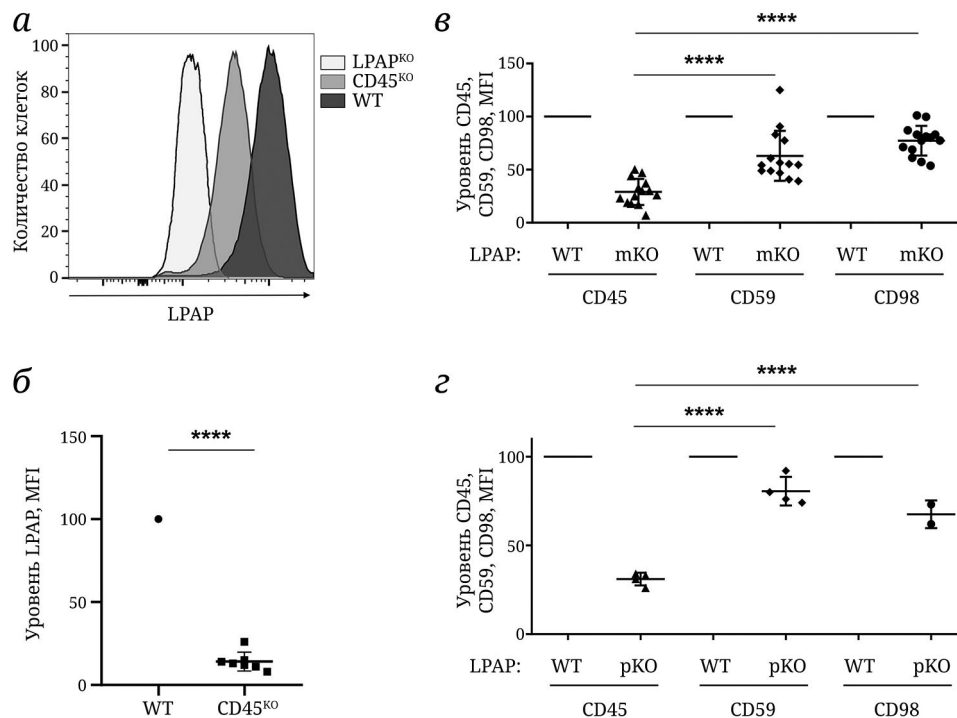


Рис. 1. Уровень белков LPAP и CD45 падает в отсутствии белка-партнёра. *а* – Репрезентативные цитограммы экспрессии LPAP на клетках Jurkat дикого типа (WT), а также на клетках CD45^{KO} или LPAP^{KO}; *б* – экспрессия LPAP по результатам тестирования 7 клонов CD45^{KO}; *в, г* – экспрессия CD45 и «посторонних» белков CD59 и CD98 в культурах Jurkat LPAP^{mKO} (*в*) или в LPAP^{pKO} (*г*). Уровни экспрессии белков LPAP, CD45, CD59 и CD98 определяли с помощью проточной цитометрии. Нормализованный уровень экспрессии CD45 сравнивали с контрольным значением 100 с помощью одновыборочного *t*-критерия Стьюдента (*б*). Для сравнения уровня белков в клетках дикого типа и нокаутных использовали метод ANOVA с post hoc анализом с помощью теста Тьюки (*в, г*), **** $p < 0,0001$

В противоположность этому для тестируемых клонов не наблюдалось заметной корреляции между LPAP и посторонним белком CD98 ($r = 0,02$) (рис. 2, б). В качестве дополнительного контроля мы использовали клоны Jurkat WT, в которых также не прослеживалась корреляция между уровнем LPAP и CD45 (рис. 2, в). Этот контроль показывает, что корреляция, проявляющаяся на рис. 2, а, не является результатом процедуры клонирования.

Поскольку описанный результат был показан на клетках, полученных из единственного клона Jurkat LPAP^{KO}, и мог быть обусловлен особенностями случайно выбранного клона, мы решили подкрепить его с помощью данных, полученных на поликлональном нокауте. Для этого в клетки Jurkat LPAP^{pKO} путём лентивирусной трансдукции был введён ген, кодирующий LPAP^{WT}, или ген GFP в случае контроля. При трансдукции использовали три возрастающие дозы вируса (#1, #2, #3), после чего в полученных культурах анализировали экспрессию LPAP и CD45 с помощью проточной цитометрии. При увеличении уровня LPAP (рис. 2, г) количество CD45 в клетках также возрастало (рис. 2, д, е). Различие между уровнем поверхностного и общего CD45, наблюдаемое в клетках pKO,

не исчезало при реэкспрессии LPAP (рис. 2, д). Это свидетельствует о том, что в отсутствие LPAP происходит именно деградация CD45, а не задержка и накопление зрелой фосфатазы в везикулярной системе клетки.

В клетках с повышенной экспрессией LPAP уровень CD45 возрастает. На предыдущем этапе мы обнаружили корреляцию между уровнями LPAP и CD45 в клетках Jurkat, когда уровень LPAP варьировался от 0% до 100%, а уровень CD45 – от 30% до 100% в перерасчёте на их эндогенные уровни экспрессии. Закономерно возникал вопрос, сохранится ли эта корреляция при дальнейшем увеличении уровня LPAP в клетках. С помощью лентивирусной трансдукции в клетки Jurkat была введена конструкция, которая содержала кассету LPAP-Flag-IRES-GFP. После двух раундов сортировки клеток GFP^{hi} уровень LPAP заметно увеличивался (рис. 3, а). Для того чтобы различить эндогенный LPAP и экзогенный LPAP-Flag, был проведён электрофорез в 18%-ном геле. При этом наблюдалось увеличение интенсивности полосы с повышенной молекулярной массой, которая соответствовала белку LPAP с пептидной меткой Flag, по сравнению с интенсивностью полос эндогенного LPAP (рис. 3, б).

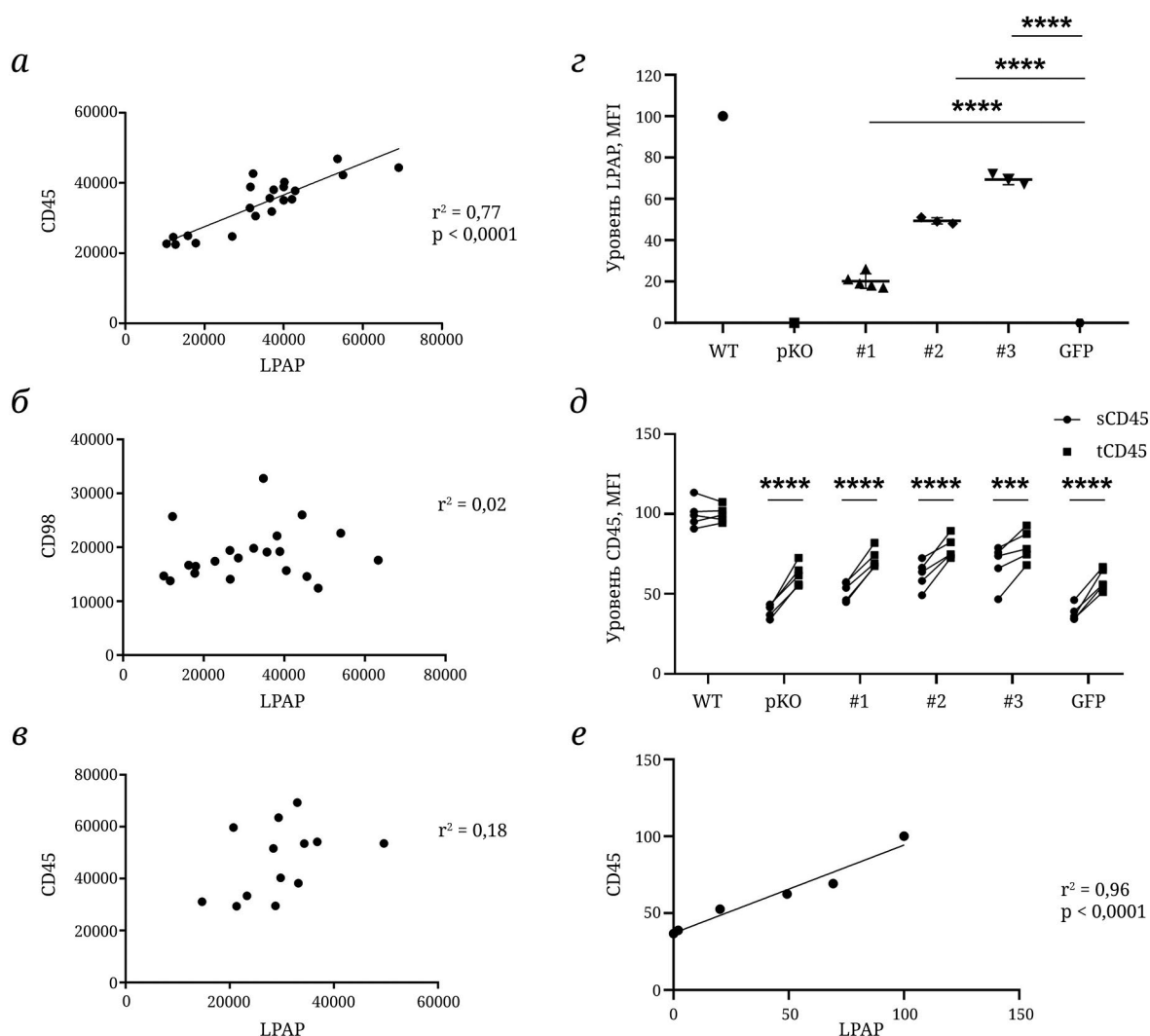


Рис. 2. Уровень CD45 коррелирует с уровнем белка LPAR. а, б – Корреляция между уровнями LPAR и CD45 (а) или LPAR и CD98 (б) в клонах Jurkat LPAR^{KO} с реэкспрессией LPAR^{WT}; в – корреляция между уровнями LPAR и CD45 в клонах Jurkat LPAR^{WT}; г, д – уровень LPAR (г) и CD45 (д) на клетках Jurkat LPAR^{KO}, стабильно трансдуцированных возрастающей дозой вируса для реэкспрессии LPAR^{WT} (#1, #2, #3) или экспрессии GFP. Экспрессия LPAR нормирована относительно клеток Jurkat LPAR^{WT}. Для CD45 показаны значения для поверхностного (sCD45) и общего (tCD45) уровня; е – корреляция между уровнями LPAR и CD45 в клонах Jurkat LPAR^{KO}, стабильно трансфицированных LPAR^{WT}. Уровни экспрессии определяли по значениям MFI, которые были нормализованы относительно среднего значения для Jurkat WT после вычитания фонового уровня в клетках Jurkat CD45^{KO} или Jurkat LPAR^{KO}. Приведены индивидуальные значения, а также среднее $\pm$ SD. Нормализованный уровень экспрессии LPAR в трансдуцированных клетках сравнивали со значением ноль в клетках, экспрессирующих GFP, с помощью одновыборочного *t*-критерия Стьюдента (г). Для сравнения уровня поверхностного (s) и общего (t) CD45 в клетках Jurkat LPAR^{KO} и трансдукантах использовали метод ANOVA с post hoc анализом с помощью теста Тьюки. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Средние значения для уровня LPAR и sCD45 из панели д использованы для расчёта корреляции (е)

Мы предположили, что в лимфоидных клетках Jurkat существует особый механизм гомеостатической регуляции уровня LPAR, который невозможно обойти путём лентивирусной трансдукции. С учётом этого мы обратили внимание на клетки K562 эритромиелоидной линии дифференцировки, которые несут на поверхности CD45, но практически лишены эндогенного LPAR (MFI = 3000). После лентивирусной трансдукции клетки K562 экспрессировали LPAR-Flag на высо-

ком уровне (MFI = 116 000) (рис. 3, в). Одновременно с этим в 3,1 раза возрастал и уровень белка CD45 (рис. 3, г). Таким образом, как повышение экспрессии LPAR, так и его эктопическая экспрессия приводят к увеличению экспрессии CD45.

Нокаут LPAR снижает CD3-индуцированную экспрессию активационной молекулы CD69. Одним из ранних проявлений активации клеток является выход на поверхность мембрану белка CD69. Для того чтобы оценить возможный вклад

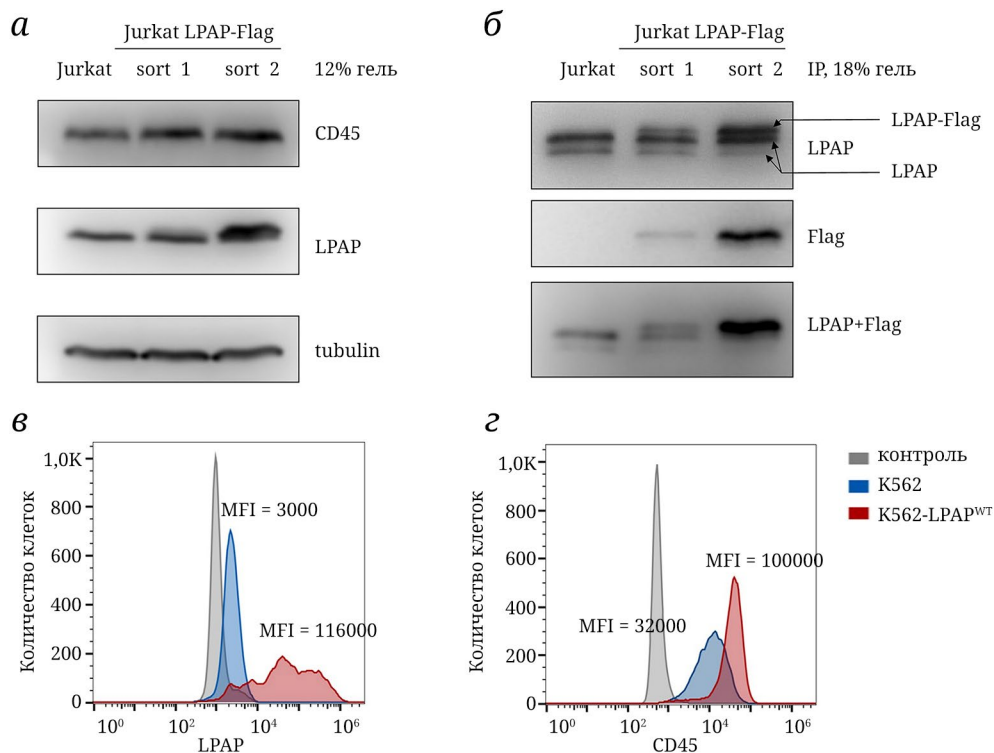


Рис. 3. В клетках с повышенной экспрессией LPAP уровень CD45 возрастает. *а, б* – Уровень белка LPAP анализировали в клеточных линиях Jurkat и Jurkat LPAP-Flag после первой и второй сортировки (sort 1 и sort 2). Клетки лизировали (*а, б*), белок LPAP или CD45 выделяли с помощью иммунопреципитации (IP) (*б*), образцы разделяли методом электрофореза в 12%-ном (*а*) или 18%-ном (*б*) геле, проводили Вестерн-блоттинг с указанными антителами. Нижний блот (*б*) окрашивали антителами против Flag и LPAP. Формы LPAP и LPAP-Flag указаны стрелками; *в, з* – экспрессия LPAP и CD45 на поверхности клеток K562 дикого типа, а также стабильно трансдуцированных LPAP-Flag

LPAP в проведение внутриклеточного сигнала, мы сравнили экспрессию молекулы CD69 на клетках Jurkat WT и Jurkat LPAP^{PKO} при активации под действием PMA или антител против рецептора CD3. При стимуляции PMA клетки рКО экспрессировали на 40% меньше молекул CD69, чем клетки дикого типа (рис. 4, *а*). Затем мы использовали более физиологический стимул – кросс-линкирование CD3 с помощью антитела ОКТ3. Поскольку экспрессия CD69 на клетках Jurkat, активированных ОКТ3, имеет бимодальное распределение (рис. 4, *б*, левая панель), мы сравнили нокаутные по LPAP клетки и клетки дикого типа по двум параметрам: проценту активированных клеток и MFI CD69⁺ клеток из популяции с высоким уровнем CD69 (гейтирование на соответствующие популяции приведено на рис. 4, *б*, средняя и правая панели).

Клетки Jurkat характеризуются довольно низким уровнем экспрессии CD3, который детектируется только на части клеток. Мы предполагаем, что именно эти клетки отвечают на стимуляцию антителом ОКТ3, что приводит к бимодальному характеру распределения CD69. При активации через CD3 значимая разница между Jurkat WT и клетка-

ми LPAP^{PKO} наблюдалась в образцах с высокой концентрацией ОКТ3 (10 и 1 мкг/мл). При этом в случае популяции рКО активировались практически все клетки, но уровень CD69 на них был снижен по сравнению с клетками дикого типа (рис. 4, *б*, левая панель). Эта разница могла быть связана с неодинаковым уровнем CD3 на двух типах клеток (рис. 4, *в*, левая панель). В популяции рКО процент CD3⁺-клеток был выше (рис. 4, *в*, средняя панель), в то время как MFI CD3⁺-популяции – ниже по сравнению с клетками дикого типа (рис. 4, *в*, правая панель), что соответствовало результату по экспрессии CD69.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Роль белка LPAP в клетке остаётся неизвестной, однако образование прочного комплекса с CD45 указывает на то, что функция LPAP может быть связана с регуляцией фосфатазы. Изменение статуса фосфорилирования LPAP при активации клеток позволяет предположить, что LPAP является участником сигнального каскада Т-клеточного рецептора лимфоцитов [5].

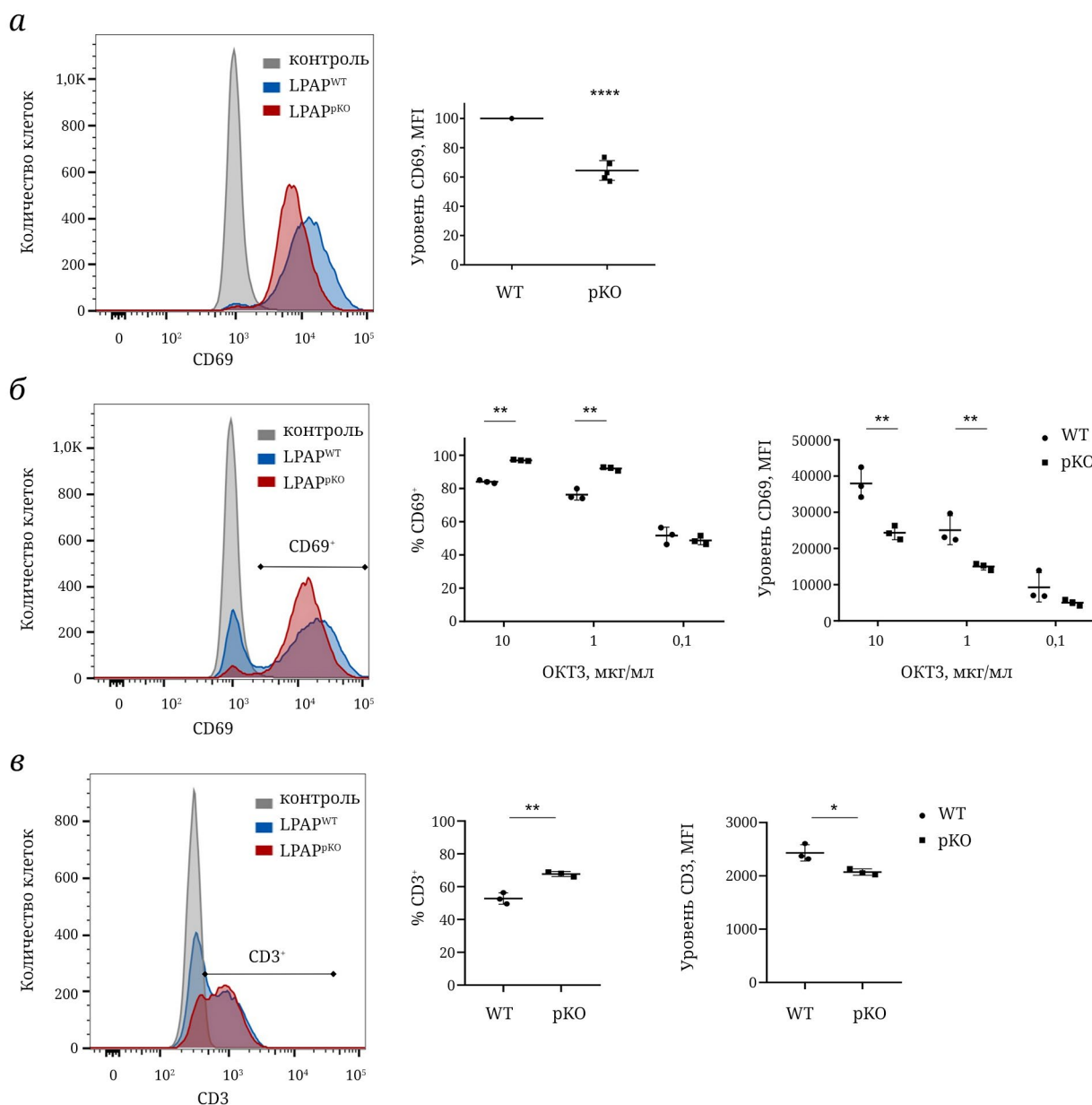


Рис. 4. Сравнение экспрессии молекул CD69 и CD3 на клетках Jurkat дикого типа и с нокаутом по LPAR. *а* – Экспрессия CD69 на клетках, активированных с помощью РМА; *б* – экспрессия CD69 на клетках, активированных с помощью антитела ОКТЗ; *в* – экспрессия CD3 на клетках, активированных с помощью антитела ОКТЗ. Уровни CD69 (*б*) и CD3 (*в*) сравнивали с помощью двухвыборочного *t*-критерия. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Некоторые исследования показывают, что фосфатаза CD45 необходима для поддержания стабильности LPAR [7, 13]. С этим хорошо согласуются полученные нами данные о том, что в клетках Jurkat, нокаутных по CD45, уровень LPAR падает на 90%. Ранее мы показали, что при нокадауне CD45 с помощью shRNA экспрессия LPAR снижалась более чем в два раза [8]. Наконец, клеточная линия J45.01, полученная на основе Jurkat и экспрессирующая лишь 5–8% CD45 по сравнению с диким типом [20], экспрессирует LPAR в три раза меньше, чем дикий тип [8]. Таким образом, имеются согласующиеся между собой данные о том, что при уменьшении

уровня CD45 количество LPAR в клетке существенно снижается.

Чтобы ответить на вопрос о возможном влиянии LPAR на уровень белка CD45, мы получили панель субклиний Jurkat, нокаутных по LPAR. Было обнаружено, что в популяции нокаутов уровень CD45 оказался сниженным до 30% от уровня дикого типа. Это наиболее выраженный эффект из всех описанных в литературе [9–11]. Можно было бы предположить, что LPAR влияет не на стабильность фосфатазы CD45, а на её локализацию. Однако наши данные о влиянии LPAR на общий и поверхностный уровень CD45 (рис. 2, *д*, *е*)

не поддерживают это предположение. Далее мы показали, что при восстановлении экспрессии LPAP уровень CD45 повышался, при этом наблюдалась корреляция между уровнями этих белков. С помощью лентивирусной трансдукции клеток Jurkat нам не удалось добиться существенного превышения уровня LPAP по сравнению с клетками дикого типа. В отличие от этого, клетки эритромиелоидной линии K562, не несущие эндогенного LPAP, были способны к стабильной гиперэкспрессии этого белка. Мы предполагаем, что в лимфоидных клетках существует жёсткий механизм, контролирующий уровень LPAP, который отсутствует в нелимфоидных клетках. Следует отметить, что на клетках Jurkat преимущественно представлена изоформа CD45RB, а на клетках K562 – изоформа CD45R0. Ранее нами было показано, что LPAP ассоциируется со всеми изоформами примерно в равной мере [8], следовательно, различное поведение LPAP на клетках Jurkat и K562 не может быть объяснено связью с различными изоформами CD45.

Данные, которые мы получили ранее, а также результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что фосфатаза CD45 поддерживает стабильность LPAP и влияет на его статус фосфорилирования, а белок LPAP, в свою очередь, способен регулировать уровень CD45. Стабильность белка CD45, вероятно, не полностью определяется молекулой LPAP. Это приводит к тому, что даже при полном нокауте LPAP детектируется не менее 30% белка CD45 от уровня в клетках дикого типа. Косвенные данные показывают, что LPAP может влиять на силу ответа Т-клеток на низкоаффинные лиганды [21], а также участвовать в регуляции дифференцировки В-клеток [3]. Можно предположить, что всё это происходит опосредованно, путём регуляции уровня CD45.

Группой Schraven et al. (1991) было показано, что без CD45 белок LPAP синтезируется, но быстро деградирует [7]. Можно предположить, что верно и обратное утверждение в отношении стабильности CD45. Возможно, что в отсутствии белка-партнёра в молекулах CD45 и LPAP остаются открытыми участки, ответственные за распознавание системной деградации. Баланс активности убиквитинлигаз и деубиквитинилирующих белков важен для регуляции сигнальных путей, включая каскад от Т-клеточного рецептора [22]. Например, убиквитинилирование цепей TCR под действием CBL-b необходимо для деградации рецептора и ослабления сигнального каскада на поздних этапах активации Т-клеток. Другим примером белка, чья главная функция заключается в связывании и поддержании стабильности партнёра, является трансмембранный полипептид типа 6 (СМТМ6), который взаимодействует с лигандом программируемого клеточного рецептора смерти [23].

Биоинформатический анализ предсказывает, что большая часть цитоплазматического участка LPAP не имеет выраженной структуры [24], и LPAP можно отнести к внутренне неупорядоченным белкам (intrinsically disordered protein, IDP). Такие белки могут приобретать определённую конформацию при взаимодействии с молекулой-партнёром [25]. Внутренне неупорядоченные белки благодаря своей способности взаимодействовать с различными партнёрами часто выступают в роли белков-адаптеров или белков-платформ для сборки многокомпонентных комплексов. Они могут вступать во взаимодействия с высокой специфичностью и умеренной аффинностью, что необходимо для строго регулируемых во времени процессов и делает их важными участниками сигнальных каскадов [26]. Возможно, LPAP опосредует взаимодействия CD45 с другими белками.

Вопрос о вкладе LPAP в активационный сигнальный каскад Т-лимфоцитов пока остаётся открытым. В нашей работе нокаутные по LPAP популяции Jurkat экспрессировали меньше молекул CD69 при активации с помощью РМА и ОКТ3. Исходя из этих данных, можно было бы сделать предположение о прямом влиянии LPAP на сигнальный каскад, однако такая интерпретация осложняется возможным действием LPAP опосредованно через регуляцию экспрессии CD45. Косвенным указанием на возможное участие LPAP в активации Т-лимфоцитов является наблюдение того, что сниженная экспрессия LPAP на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах является потенциальным маркером трижды негативного рака молочной железы [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные позволяют предположить, что основная функция LPAP сводится к модуляции уровня белка CD45. Это порождает ряд вопросов для дальнейших исследований. Каким образом взаимодействие этих двух белков поддерживает их стабильность и каков механизм деградации CD45 и LPAP в отсутствии белка-партнёра? Почему в миелоидных клетках, которые конститутивно не экспрессируют LPAP, белок CD45 стабилен? Существует ли особый механизм регуляции CD45 в лимфоидных клетках, связанный с LPAP? Ответы на эти вопросы помогут открыть новые детали активации лимфоцитов.

Вклад авторов. Н.А. Круглова, Д.В. Мазуров, А.В. Филатов – концепция работы; Н.А. Круглова – проведение экспериментов; Н.А. Круглова, Д.В. Мазуров, А.В. Филатов – обсуждение результатов исследования; Н.А. Круглова – написание текста;

Д.В. Мазуров, А.В. Филатов – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00289).

Благодарности. В работе использовали оборудование, предоставленное Центром высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины (Институт биологии

гена), развиваемым при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schraven, B., Schoenhaut, D., Bruyns, E., Koretzky, G., Eckerskorn, C., et al. (1994) LPAP, a novel 32-kDa phosphoprotein that interacts with CD45 in human lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, **269**, 29102-29111.
- Rheinländer, A., Schraven, B., and Bommhardt, U. (2018) CD45 in human physiology and clinical medicine, *Immunol. Lett.*, **196**, 22-32, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>.
- Kleiman, E., Salyakina, D., De Heusch, M., Hoek, K. L., Llanes, J. M., et al. (2015) Distinct transcriptomic features are associated with transitional and mature B-cell populations in the mouse spleen, *Front. Immunol.*, **6**, 30, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00030>.
- Kruglova, N. A., Meshkova, T. D., Kopylov, A. T., Mazurov, D. V., and Filatov, A. V. (2017) Constitutive and activation-dependent phosphorylation of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein (LPAP), *PLoS One*, **12**, e0182468, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182468>.
- Kruglova, N., Filatov, A. (2019) T cell receptor signaling results in ERK-dependent Ser163 phosphorylation of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **519**, 559-565, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.041>.
- Takeda, A., Matsuda, A., Paul, R. M. J., and Yaseen, N. R. (2004) CD45-associated protein inhibits CD45 dimerization and up-regulates its protein tyrosine phosphatase activity, *Blood*, **103**, 3440-3447, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2083>.
- Schraven, B., Kirchgessner, H., Gaber, B., Samstag, Y., and Meuer, S. (1991) A functional complex is formed in human T lymphocytes between the protein tyrosine phosphatase CD45, the protein tyrosine kinase p56lck and pp32, a possible common substrate, *Eur. J. Immunol.*, **21**, 2469-2477, <https://doi.org/10.1002/eji.1830211025>.
- Filatov, A., Kruglova, N., Meshkova, T., and Mazurov, D. (2015) Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein proteoforms analyzed using monoclonal antibodies, *Clin. Transl. Immunol.*, **4**, e44, <https://doi.org/10.1038/cti.2015.22>.
- Ding, I., Bruyns, E., Li, P., Magada, D., Paskind, M., et al. (1999) Biochemical and functional analysis of mice deficient in expression of the CD45-associated phosphoprotein LPAP, *Eur. J. Immunol.*, **29**, 3956-3961, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199912\)29:12<3956::AID-IMMU3956>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<3956::AID-IMMU3956>3.0.CO;2-G).
- Matsuda, A., Motoya, S., Kimura, S., McInnis, R., Maizel, A. L., et al. (1998) Disruption of lymphocyte function and signaling in CD45-associated protein-null mice, *J. Exp. Med.*, **187**, 1863-1870, <https://doi.org/10.1084/jem.187.11.1863>.
- Kung, C., Okumura, M., Seavitt, J. R., Noll, M. E., White, L. S., et al. (1999) CD45-associated protein is not essential for the regulation of antigen receptor-mediated signal transduction, *Eur. J. Immunol.*, **29**, 3951-3955, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199912\)29:12<3951::AID-IMMU3951>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<3951::AID-IMMU3951>3.0.CO;2-9).
- Bruyns, E., Kirchgessner, H., Meuer, S., Schraven, B. (1998) Biochemical analysis of the CD45-p56(Lck) complex in Jurkat T cells lacking expression of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein, *Int. Immunol.*, **10**, 185-194, <https://doi.org/10.1093/intimm/10.2.185>.
- Kitamura, K., Matsuda, A., Motoya, S., Takeda, A. (1997) CD45-associated protein is a lymphocyte-specific membrane protein expressed in two distinct forms, *Eur. J. Immunol.*, **27**, 383-388, <https://doi.org/10.1002/eji.1830270207>.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., et al. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 827-832, <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science*, **339**, 823-826, <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., et al. (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR-Cas9 for enhanced genome editing specificity, *Cell*, **154**, 1380-1389, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>.
- Zotova, A., Pichugin, A., Atemasova, A., Knyazhanskaya, E., Lopatukhina, E., et al. (2019) Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycoposphatidylinositol-anchored epitope tags, *Sci. Rep.*, **9**, 3132, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40219-z>.

18. Мазуров Д. В. (2020) В кн. *Методы редактирования генов и геномов* (под ред. Закияна С. М., Медведева С. П., Дементьевой Е. В., Власова В. В.) Издательство СО РАН, Новосибирск, с. 413-444.
19. Zotova, A., Lopatukhina, E., Filatov, A., Khaitov, M., and Mazurov, D. (2017) Gene editing in human lymphoid cells: role for donor DNA, type of genomic nuclease and cell selection method, *Viruses*, **9**, 325, <https://doi.org/10.3390/v9110325>.
20. Koretzky, G. A., Picus, J., Schultz, T., and Weiss, A. (1991) Tyrosine phosphatase CD45 is required for T-cell antigen receptor and CD2-mediated activation of a protein tyrosine kinase and interleukin 2 production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2037-2041, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2037>.
21. Leitenberg, D., Falahati, R., Lu, D. D., and Takeda, A. (2007) CD45-associated protein promotes the response of primary CD4 T cells to low-potency T-cell receptor (TCR) stimulation and facilitates CD45 association with CD3/TCR and lck, *Immunology*, **121**, 545-554, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02602.x>.
22. Gaud, G., Lesourne, R., and Love, P. E. (2018) Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling, *Nat. Rev. Immunol.*, **18**, 485-497, <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0020-8>.
23. Burr, M. L., Sparbier, C. E., Chan, Y.-C., Williamson, J. C., Woods, K., et al. (2017) CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity, *Nature*, **549**, 101-105, <https://doi.org/10.1038/nature23643>.
24. Oates, M. E., Romero, P., Ishida, T., Ghalwash, M., Mizianty, M. J., et al. (2012) D2P2: database of disordered protein predictions, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D508-D516, <https://doi.org/10.1093/nar/gks1226>.
25. Uversky, V. N. (2019) Intrinsically disordered proteins and their “mysterious” (meta)physics, *Front. Phys.*, **7**, <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00010>.
26. Wright, P. E., Dyson, H. J. (2015) Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 18-29, <https://doi.org/10.1038/nrm3920>.
27. Marchetti, P., Antonov, A., Anemona, L., Vangapandou, C., Montanaro, M., et al. (2021) New immunological potential markers for triple negative breast cancer: IL18R1, CD53, TRIM, Jaw1, LTB, PTPRCAP, *Discov. Oncol.*, **12**, 6, <https://doi.org/10.1007/s12672-021-00401-0>.

LYMPHOCYTE PHOSPHATASE-ASSOCIATED PHOSPHOPROTEIN (LPAP) AS CD45 PROTEIN STABILITY REGULATOR

N. A. Kruglova^{1*}, D. V. Mazurov², and A. V. Filatov^{2,3*}

¹ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; e-mail: natalya.a.kruglova@yandex.ru

² National Research Center Institute of Immunology, Federal Medical Biological Agency of Russia,
115522 Moscow, Russia; e-mail: avfilat@yandex.ru

³ Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia

Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein (LPAP) is a protein of unknown function. Its close interaction with CD45 phosphatase suggests that LPAP may potentially regulate CD45, but direct biochemical evidence for this has not yet been obtained. We found that on Jurkat lymphoid cells the levels of LPAP and CD45 proteins are interrelated and well correlated with each other. Knockout of LPAP leads to a decrease, and its overexpression, on the contrary, causes an increase in the surface expression of CD45. No such correlation is found in non-lymphoid K562 cells. In the absence of LPAP, upon activation of Jurkat cells, a decrease in the expression of the activation marker CD69 was observed. This may be due to both direct and indirect effects of LPAP. We have hypothesized that LPAP is a regulator of the expression level of CD45 phosphatase.

Keywords: LPAP, CD45, T-cell receptor, lymphocyte activation

УДК 576.3

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФАГОЦИТОЗА В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДВОЙНОГО ОКРАШИВАНИЯ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ

© 2024 Е.В. Лысакова¹, А.Н. Шумеев², С.А. Чувпило¹, В.С. Лактюшкин²,
Н.А. Арсентьева³, М.Ю. Бобров¹, С.А. Рыбцов^{2*}

¹ Научно-технологический университет «Сириус»,
Научный центр генетики и наук о жизни, направление «Иммунобиология и биомедицина»,
354340 Сириус, Краснодарский край, Россия

² Научно-технологический университет «Сириус»,
Ресурсный центр клеточных технологий и иммунологии, Лабораторный комплекс,
354340 Сириус, Краснодарский край, Россия; электронная почта: rybtsov.sa@talantiuspeh.ru

³ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера,
197101 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 03.11.2023

После доработки 09.01.2024

Принята к публикации 19.02.2024

Фагоцитоз – важнейшая функция врождённого иммунитета человека и животных. Снижение способности к фагоцитозу связано со многими заболеваниями и старением иммунной системы. Определение фагоцитарной динамики клеток требует количественной оценки бактерий внутри и снаружи фагоцита. Хотя проточная цитометрия является наиболее распространённым методом оценки фагоцитоза, её использование не предполагает визуализации и прямой количественной оценки пространственной локализации бактерий. В данном исследовании применяли методы проточной цитометрии (сортировки) и конфокальной микроскопии в сочетании с «двухцветной» маркировкой бактерий *Escherichia coli*, которые использовали как объект фагоцитоза. Для обеспечения высокой производительности количественного и пространственного распознавания двухцветных *E. coli*, ассоциированных с фагоцитами, также применяли проточную цитометрию с визуализацией в потоке. На основании полученных данных было сделано предположение о важной роли удержания патогенов на поверхности миелоидных и лимфоидных клеток без последующей интернализации. Разработанный метод бактериальной конъюгации существенно повысил точность количественной и пространственной оценки фагоцитоза и может быть рекомендован в качестве вспомогательного подхода при использовании проточных цитометров с визуализацией для анализа фагоцитоза в цельной крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фагоцитоз, *E. coli*, проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, Amnis, лейкоциты человека.

DOI: 10.31857/S0320972524050126 EDN: YNTLXM

ВВЕДЕНИЕ

Фагоцитоз широко представлен среди животных, начиная от простейших и заканчивая многоклеточными организмами. Фагоцитирующие клетки млекопитающих – моноциты и макро-

фаги, нейтрофилы, дендритные клетки – представители врождённого иммунитета, первая линия защиты против разнообразных патогенов, попадающих в организм из окружающей среды и способных вызвать инфекцию. Фагоцитоз также обеспечивает элиминацию апоптотических клеток.

Принятые сокращения: AF405 – флуорохром Alexa Fluor 405; Dim – клетки, интенсивность которых не более чем на декаду выше, чем у DN; DN – двойная негативная популяция: клетки, интенсивность флуоресценции которых находится на уровне автофлуоресценции неокрашенных клеток; DP – двойная позитивная популяция по FITC и AF405; FITC – флуорохром флуоресцеин-5-изотиоцианат; Mid – клетки с умеренной интенсивностью флуоресценции (в пределах декады выше, чем у Dim); PBS – фосфатный буферный солевой раствор.

* Адресат для корреспонденции.

Таким образом, фагоцитоз является необходимым процессом поддержания гомеостаза у многоклеточных животных [1]. Снижение способности клеток к фагоцитозу связано с рядом заболеваний, в том числе с иммунодефицитными состояниями при инфекционных заболеваниях. Например, снижение фагоцитарной активности обнаруживается при пародонтозе [2], синдроме бактериальной колонизации нижних дыхательных путей [3] и других состояниях, приводящих к опасным патологиям [4, 5].

При вторжении в организм чужеродного агента «профессиональные» фагоциты распознают его молекулярные паттерны разнообразными толл-подобными рецепторами (TLRs, toll-like receptors), находящимися на поверхности фагоцитов. TLRs распознают, например, компоненты клеточной стенки бактерий, а Fc-рецепторы распознают антигены, опсонизирующие патогены [6]. Инициация воспаления через альтернативные механизмы также в первую очередь активирует фагоцитоз. Фагоцитоз – незаменимый, базовый механизм, способствующий элиминации патогена или подавлению его распространения. Именно поэтому многие инфекции эволюционно отобрали пути блокировки фагоцитоза как основные механизмы защиты от иммунитета хозяина [7, 8]. Блокировка фагоцитоза является также одним из основных механизмов ухода опухолей от иммунного распознавания и удаления [9].

Фагоцитоз является важным звеном между врождённым и адаптивным иммунитетом: фагоцитоз патогенов может оканчиваться представлением коротких пептидных последовательностей чужеродного микроорганизма после процессинга антигенов на поверхности фагоцитов в контексте комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), что инициирует пролиферацию Т-лимфоцитов, запуская адаптивный иммунный ответ [10].

Оценка фагоцитарной активности – исключительно важная диагностическая методика, позволяющая предупреждать патологии иммунитета, исследовать механизмы развития опасных заболеваний, а также тестировать лекарственные препараты на модуляцию фагоцитоза. Оценка фагоцитарной активности лейкоцитов стандартно проводят с помощью специальных фагоцитарных тестов [11, 12]. Существует множество вариаций этого анализа с использованием различных объектов для фагоцитоза, одним из которых является кишечная палочка *Escherichia coli*. В состав клеточной стенки этих бактерий входит липополисахарид (ЛПС), который распознаётся TLR4 на поверхности фагоцита. Фагоцитарная активность может быть оценена как у суспензионной фракции клеток крови, так и у адгезивной (на пластике или клеточном матриксе), при этом адгезия не явля-

ется необходимым условием для осуществления фагоцитоза нейтрофилами [13].

Фагоцитарная активность лейкоцитов у людей с возрастом снижается [14]. Снижение фагоцитарной активности рассматривают вкуче с другими изменениями, такими как уменьшение количества наивных Т- и В-клеток, повышение продукции противовоспалительных цитокинов, снижение секреции специфических антител. Возрастное снижение фагоцитоза сопровождается смещением пропорции «миелоидные клетки : лимфоидные клетки» в сторону миелоидных клеток, к которым в том числе относятся и фагоциты. Все эти изменения связывают с так называемым «старением иммунной системы» [15]. Стимуляция миелопоэза с возрастом, по-видимому, является адаптацией организма к потере фагоцитарной функции, и поэтому для точной оценки возрастных изменений необходима разработка количественных методов анализа фагоцитоза на уровне отдельных клеток.

Важным количественным параметром фагоцитоза является фагоцитарное число – количество бактерий, интернализованных одним фагоцитом за время проведения эксперимента. Являясь интегральным показателем, он, однако, не учитывает пространственное положение бактерии относительно клеточной мембраны фагоцита, теряя таким образом сведения о кинетике интернализации и завышая показатели фагоцитоза. Для рутинной оценки фагоцитарного числа необходимы высокопроизводительные методы, обеспечивающие подсчёт адгезированных на поверхности и интернализованных, т.е. фагоцитированных бактерий, что позволит более точно оценивать фагоцитарную активность и учитывать кинетику процесса.

Применяемая для оценки фагоцитарного числа микроскопия времязатратна и значительно подвержена влиянию человеческого фактора, что накладывает ограничение как на производительность метода, воспроизводимость, так и статистическую достоверность результатов. Проточная цитометрия – высокопроизводительный и один из наиболее простых и доступных методов оценки данных фагоцитарного теста, однако его применение не подразумевает визуализацию данных, что затрудняет количественный анализ пространственного положения бактерий в клетке. В настоящей работе представлена разработанная методика, позволяющая оценить фагоцитарное число с одновременной количественной оценкой адгезированных на поверхности и интернализованных фагоцитами бактерий (на примере *E. coli*) с использованием проточной цитометрии.

Разработанный в этом исследовании метод подразумевает использование фиксированных (убитых) бактерий *E. coli*, конъюгированных с флуорохромом FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианат)

и биотином. После инкубации этих бактерий с образцом периферической крови человека оставшиеся снаружи (адгезированные) бактерии выявляются дополнительной окраской стрептавидином, конъюгированным с флуорохромом AF405 (Alexa Fluor 405). Стрептавидин специфично связывается с биотином на бактериях, не проникая внутрь фагоцитов благодаря целостности их мембраны. Интернализированные бактерии флуоресцируют в канале FITC, но не AF405, тогда как адгезированные на поверхности бактерии флуоресцируют в обоих каналах. Следовательно, сопоставление вариантов мечения позволяет определить местоположение каждой бактерии (внутри или на поверхности фагоцита). На проточном цитометре флуоресцентный сигнал оценивается интегрально для каждой клетки. По интенсивности флуоресценции можно выделить несколько субпопуляций фагоцитов, что на начальном этапе исследования позволило предположить наличие фагоцитов с разным числом бактерий в разных субпопуляциях.

Мы совместили данные, полученные с помощью проточной цитометрии и сортировки клеток, с данными конфокальной микроскопии для количественной оценки фагоцитированных бактерий, валидируя таким образом использование проточной цитометрии в рутинных исследованиях без визуализации.

Помимо количественного анализа с помощью трудоёмкого совмещения сортировки методом проточной цитометрии и количественной визуальной оценки конфокальной микроскопией, образцы были протестированы с помощью проточного цитометра с визуализацией Amnis Flowsight. Данный цитометр позволяет получать фотографии каждой частицы в потоке и с высокой скоростью анализировать пространственное расположение бактерий в клетке. Разработанный в данном исследовании метод фагоцитоза с двойным окрашиванием бактерий значительно повышает точность анализа на современных проточных цитометрах с визуализацией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление бактерий, конъюгированных с FITC и биотином. В 20 мл ночной культуры *E. coli* штамма *DH5a*, выращенной из отдельной колонии в среде LB, добавляли стерильный глицерин до концентрации 10% и замораживали при -20°C в аликвотах по 50 мкл. За день до эксперимента 50 мкл маточной суспензии *E. coli* в 10%-ном глицерине помещали в 10 мл среды LB и наращивали в течение ночи. Оптическую плотность суспензии определяли на спектрофотометре Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer («Thermo

Fisher Scientific», США) по абсорбции на 540 нм. Разводили средой LB до оптической плотности 0,6, что по заранее отработанной калибровочной кривой соответствовало концентрации $1,29 \times 10^{10}$ бактерий в миллилитре. Далее 500 мкл этой суспензии центрифугировали 1 мин при 2350 g. Осадок ресуспендировали в 250 мкл фиксатора (10%-ный нейтральный забуференный формалин, ООО «Компания Элемент», Россия, предварительно разбавленный в 2 раза фосфатным буферным солевым раствором (PBS)) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре на ротационном перемешивателе (10 об./мин). Отмывку от фиксатора проводили в трёх сменах по 500 мкл PBS, осаждая центрифугированием 2 мин при 2350 g. После последнего центрифугирования осадок ресуспендировали в 250 мкл PBS, добавляли 250 мкл боратного буфера (50 мМ, pH 9,0) и метили FAM изотиоцианатом (FITC) («Lumiprobe», Россия) согласно инструкции производителя. Для этого сухой FITC растворяли в концентрации 20 мг/мл в диметилсульфоксиде, аликвотировали по 10 мкл и хранили при -80°C . К 500 мкл суспензии бактерий добавляли 1 мкл приготовленного раствора FITC и немедленно интенсивно перемешивали на вортексе, далее инкубировали 16 часов в темноте при 37°C при постоянном перемешивании в термошейкере Biosan TS-100 («BioSan», Латвия) при 400 об./мин. По окончании инкубации бактерии отмывали в трёх сменах по 500 мкл PBS, осаждая центрифугированием 2 мин при 2350 g. После последнего центрифугирования осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS и хранили при 4°C не более 24 часов до использования. Эффективность конъюгации оценивали на проточном цитометре BD LSRFortessa («BD», США) по интенсивности флуоресценции в канале FITC (лазер 488 нм, фильтр 530/20 нм) в сравнении с контрольными неконъюгированными фиксированными образцами. Далее, бактерии конъюгировали биотином, используя коммерческий набор FluoReporter Mini-biotin-XX Protein Labeling Kit («Thermo Fisher Scientific», кат. № F6347) согласно инструкции производителя. Для этого к 200 мкл бактериальной суспензии добавляли 20 мкл свежеприготовленного 1 М раствора бикарбоната натрия в воде (pH 8,3–8,5) и затем добавляли 20 мкл раствора активного эфира биотина (Компонент А) в деионизированной воде (200 мкл воды на одну пробирку с сухим Компонентом А, раствор готовили непосредственно перед использованием, т.к. реактивная форма биотина быстро гидролизует в воде). Бактерии инкубировали с активным эфиром биотина 2 часа в темноте при комнатной температуре и постоянном перемешивании в термошейкере Biosan TS-100 (400 об./мин), после чего дважды отмывали в PBS центрифугированием 2 мин при 2350 g, ресуспендировали в 200 мкл PBS

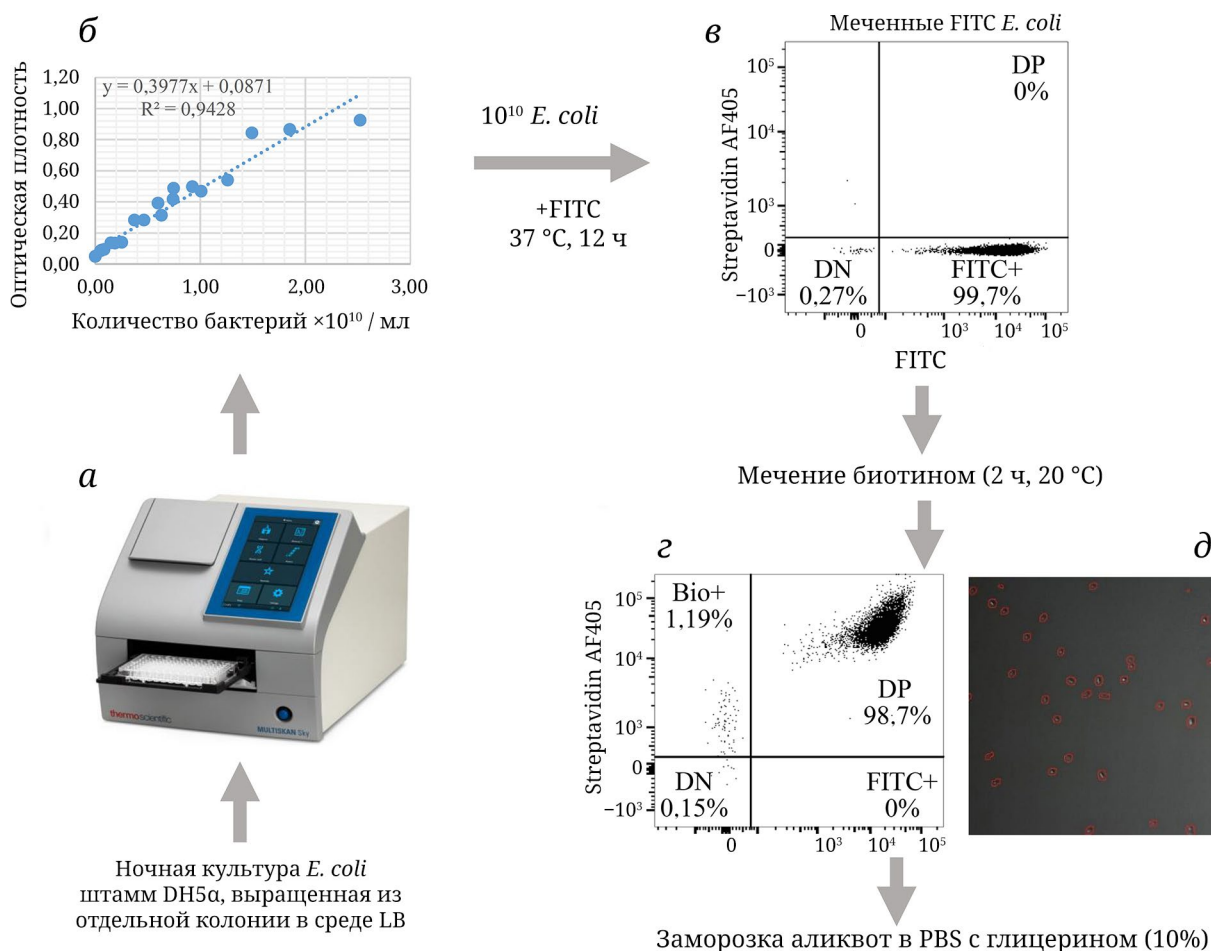


Рис. 1. Схема флуоресцентного мечения бактерий. *E. coli* конъюгировали FITC, а затем биотином для того, чтобы различать бактерии внутри и снаружи фагоцитирующих клеток. Показана последовательность проведения конъюгаций и контроль качества препарата *E. coli*. Рассчитывали концентрацию бактерий по оптической плотности (а) по заранее построенной калибровочной кривой (б). После конъюгации *E. coli* с FITC проводили контрольную проточную цитометрию (в) для проверки однородности конъюгации (FITC+ 99,7%). После дальнейшей конъюгации *E. coli* с биотином проверяли однородность мечения в каналах AF405 и FITC – гомогенность конъюгации составила 98,7% (DP) для двух меток (г). Перед замораживанием маточной суспензии готовых бактерий подсчитывали их концентрацию по DIC и флуоресценции в заданном объеме, рассчитанном на основе известных параметров глубины фокуса и размера поля зрения (д)

и добавляли стерильный глицерин до концентрации 10%. Определяли концентрацию подсчетом в камере Горяева, доводили PBS до концентрации 10^{10} бактерий на 1 мл, аликвотировали по 20 мкл, замораживали и хранили при -20 °C. Все работы проводили в стерильных условиях.

Для проверки эффективности конъюгации биотином к аликвоте *E. coli* (разбавленной в 300 мкл до концентрации 1×10^7 бактерий *E. coli*/мл) добавляли 1 мкл стрептавидина, конъюгированного с AF405 («Invitrogen», США, кат. № S32351), инкубировали 30 мин на льду, отмывали в 1,2 мл PBS, центрифугировали 2 мин при 2350 g, ресуспендировали в 200 мкл PBS и анализировали на проточном цитометре BD LSRFortessa, оценивая двойную позитивную популяцию в каналах FITC и AF405 (лазер 405 нм, фильтр 450/50 нм). Схема описанной методики представлена на рис. 1.

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду с проводимостью 18 МОм, полученную с помощью системы очистки воды Millipore Milli-Q IQ 7000 («Merck», Германия).

Фагоцитарный тест. Периферическую кровь отбирали с помощью системы для вакуумного взятия крови из вены условно здоровых добровольцев в пробирки с гепарином натрия («Химмедснаб», Россия) в Медпункте Университета «Сириус» квалифицированным персоналом.

Концентрацию лейкоцитов в образце определяли на гематологическом анализаторе MEK-7300K («Nihon Kohden», Япония). Эту информацию использовали далее для расчёта количества добавляемых бактерий, исходя из соотношения лейкоциты : бактерии = 1 : 20 в соответствии с опубликованными ранее исследованиями [16]. Для проведения теста отбирали 100 мкл цельной крови в полипропилен-

новую неадгезионную пробирку («Eppendorf», Германия, кат. № 0030125150), стабилизировали температуру в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5% CO₂) 5 мин. Фагоцитарный тест проводили в суспензионной фракции клеток цельной крови без применения специальных процедур для адгезии к поверхности [13]. К 100 мкл крови добавляли суспензии бактерий из расчёта 20 бактерий на один лейкоцит, инкубировали 1 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Для остановки фагоцитоза образцы помещали на лёд (см. Приложение, рис. П1) [17].

Проточная цитометрия и сортировка клеток.

К аликвоте крови на льду после проведения фагоцитоза добавляли антитела CD45 APC-eFluor 780 (клон HI30, «eBioscience», США, кат. № 47-0459-42; 1 : 100) для маркирования лейкоцитов, а также стрептавидин, конъюгированный с AF405 («Invitrogen», кат. № S32351; 1 : 100), для выявления бактерий на поверхности клеток. Образцы инкубировали 30 мин в темноте на льду, отмывали добавлением 1,4 мл PBS с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 330 g; супернатант удаляли и ресуспендировали осторожным пипетированием в 100 мкл PBS, после чего добавляли в образцы 900 мкл 1-кратного лизирующего буфера с фиксирующим агентом BD FACS Lysing Solution («BD», кат. № 349202) и инкубировали 10 мин в темноте при комнатной температуре. Далее, образцы центрифугировали 5 мин при 330 g, осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS и до анализа хранили при 4 °C. Схема описанной методики представлена на рис. П1 Приложения.

Настройка компенсации проводилась в автоматическом режиме в программном обеспечении соответствующего проточного цитометра или сортера по одноцветным контролям, приготовленным в соответствии с описанной выше методикой. Исключение составил контроль для AF405, который готовился путём окрашивания аликвоты крови антителами CD33 biotin (клон AC104.3E3, «Miltenyi», США, кат. № 130-113-347) в течение 30 мин на льду с последующим выявлением биотина стрептавидином, конъюгированным с AF405, и дальнейшей обработкой, как описано выше.

Предварительный анализ образцов проводили на проточном цитометре BD LSRFortessa. Для количественного анализа клеток *E. coli* и их пространственного расположения в лейкоцитах после проведения фагоцитоза клетки сортировали на клеточном сортере, а отсортированные фракции анализировали на конфокальном микроскопе. Сортировку проводили на сортере Sony SH800, оснащённом 4 лазерами (405, 488, 561 и 638 нм), со 100-мкм ноззлами у сортировочных чипов. Стратегия гейтирования подразумевала последовательное выделение единичных клеток по параметрам импульса Area и Height для прямого

светорассеяния (FSC), затем по тем же параметрам импульса для бокового светорассеяния (SSC), очистку от явного мусора по параметрам светорассеяния, выделение CD45⁺ популяции, определение субпопуляций фагоцитировавших лейкоцитов по интенсивности флуоресценции в каналах FITC и AF405 (Приложение, рис. П2). Клетки сортировали в 5-мл полистироловые пробирки с 1 мл PBS, отбирая не менее 10 000 клеток для каждой субпопуляции лейкоцитов.

Для высокопроизводительного анализа пространственного расположения и количества бактерий в фагоцитах методом визуализирующей проточной цитометрии применяли проточный цитометр Amnis FlowSight («Cytex», США), оснащённый 3 лазерами (405, 488 и 642 нм). Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП «Цитометрии и биомаркеры» ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера в Санкт-Петербурге.

Конфокальная микроскопия. После сортировки клетки концентрировали центрифугированием 5 мин при 330 g, ресуспендировали в 10 мкл PBS и помещали на заряженное предметное стекло (Polysine Adhesion Slides, «Thermo Fisher Scientific») во влажной камере на 30 мин при комнатной температуре, после чего накрывали покровным стеклом и анализировали на конфокальном микроскопе. Конфокальные флуоресцентные изображения были получены с помощью инвертированного лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ZEISS LSM 980 Airyscan, «Carl Zeiss AG», Германия) через объектив с 20-кратным увеличением (Plan-Apochromat 20×, числовая апертура 0,8). Изображения в 4 каналах были получены последовательным сканированием двух треков: канал APC-eFluor 780 в первом треке и каналы AF405, FITC и DIC – во втором. APC-eFluor 780 возбуждался 639 нм лазером (максимальная мощность – 20 мВт, пропускание акустооптического фильтра (AOTF) – 2,6%), детекция в диапазоне от 647 до 757 нм (тип детектора – GaAsP, усиление – 713 В). AF405 возбуждался 405 нм лазером (максимальная мощность – 20 мВт, пропускание AOTF – 0,2%), детекция в диапазоне от 410 до 484 нм (тип детектора – GaAsP, усиление – 650 В). FITC возбуждался 488 нм лазером (максимальная мощность – 13 мВт, пропускание AOTF – 0,04%), детекция осуществлялась в диапазоне от 519 до 628 нм (тип детектора – Multialkali-PMT, усиление – 845 В); DIC – дифференциально-интерференционный контраст в проходящем свете, полученный с помощью лазеров второго трека, т.е. 405 и 488 нм, и детектора в проходящем свете T-PMT, детекция осуществлялась в диапазоне от 300 до 900 нм (тип детектора – Multialkali-PMT, усиление – 368 В). Были установлены следующие параметры сканирования: увеличение сканирования – 8×,

размер изображения – 429 × 429 пикселей, время пикселя (время накопления сигнала) – 4,91 микросекунда; размер пикселя – $dx = dy = 0,124$ мкм. Изображения были получены с использованием программного обеспечения ZEN (версия ZEN Blue 3.2, «Carl Zeiss AG»).

Программное обеспечение. Обработку результатов проводили в Microsoft Excel 2019; анализ данных проточной цитометрии – в BD FlowJo v. 10.9.0; анализ данных Amnis FlowSight – в программе Amnis IDEAS 6.2; анализ данных конфокальной микроскопии – в ImageJ/Fiji v. 1.54f [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Количественный анализ фагоцитоза методом сортировки и микроскопии клеток. При анализе лейкоцитов ($CD45^+$) на проточном цитометре после проведённого фагоцитоза выделяли не-

сколько субпопуляций по гранулярности, размеру и флуоресценции *E. coli* (рис. 2). Для анализа распределения числа фагоцитированных или адгезированных на поверхности бактерий в популяциях гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов провели сортировку выделенных популяций на сортере Sony SH800 (стратегия гейтирования представлена на рис. 2 и рис. П2 Приложения). Отсортированные клетки анализировали на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 980 Airyscan. После отработки протокола сортировку клеток проводили 3 раза, используя образцы крови трёх доноров.

Результат сопоставления данных сортировки и микроскопии представлен на рис. 3. Наиболее многочисленной при сортировке оказалась двойная негативная (DN) субпопуляция – 71,2 % от всех $CD45^+$ клеток. Из 74 проанализированных конфокальной микроскопией сортированных клеток в DN-популяции от трёх доноров не найдено ни одной клетки, содержащей *E. coli* внутри

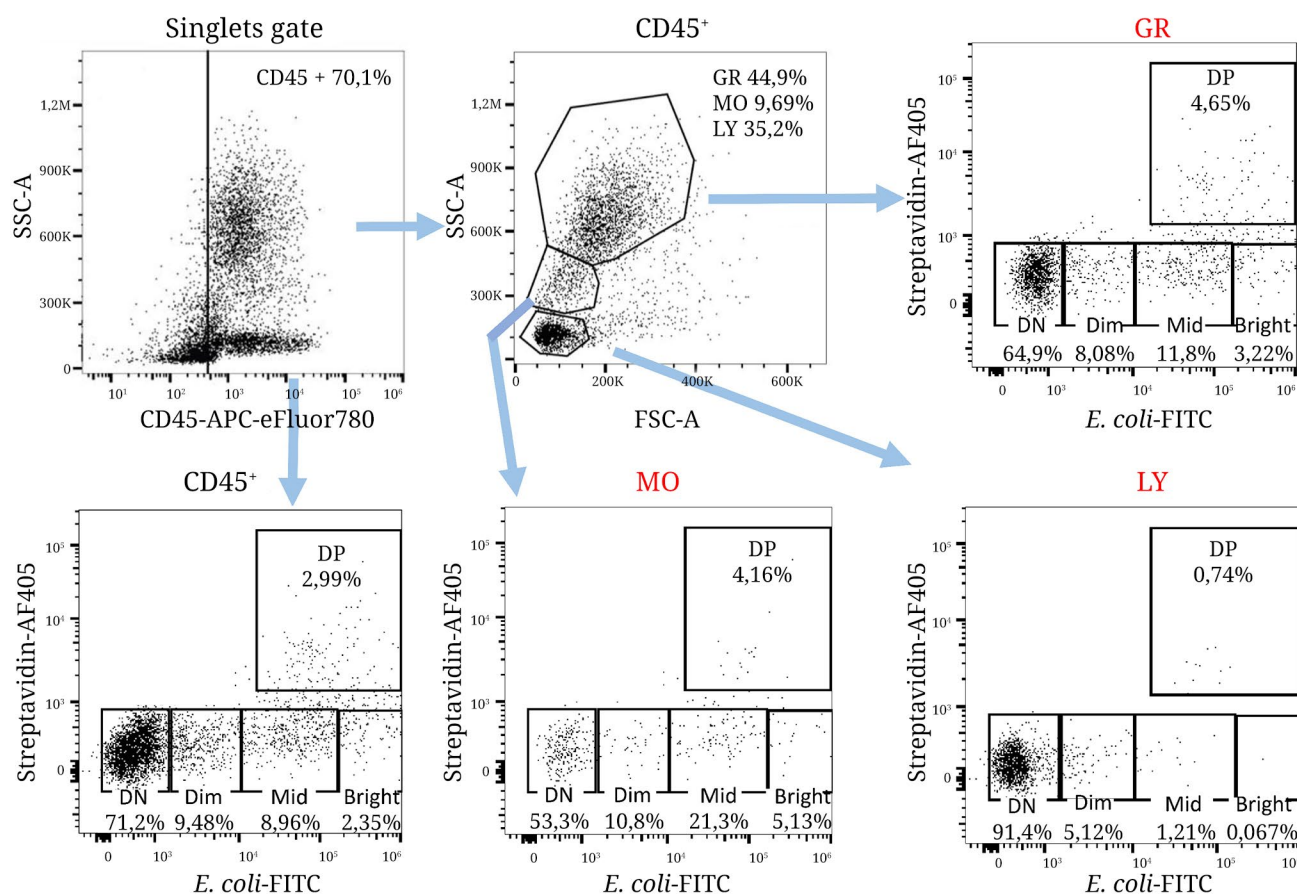


Рис. 2. Стратегия анализа и гейтирования для сортера Sony SH800: из единичных клеток (Singlets gate) выделяли лейкоциты ($CD45^+$), далее эту популяцию сортировали по интенсивности флуоресценции и локализации бактерий (*E. coli*) на следующие категории: DN – двойная негативная популяция (нефагоцитировавшие клетки); Dim – клетки, флуоресценция которых не более чем на декаду выше, чем DN; Mid – клетки с умеренной интенсивностью флуоресценции (больше на декаду, чем у Dim); Bright – клетки с самой высокой интенсивностью флуоресценции; DP – двойная по FITC и AF405 позитивная популяция бактерий на поверхности (нижняя панель слева). Для анализа по субпопуляциям клетки гейтировали по гранулярности (SSC) и размеру (FSC) на гранулоциты (GR) и моноциты (MO) и лимфоциты (LY). Расширенная информация по стратегии гейтирования приведена на рис. П2 Приложения

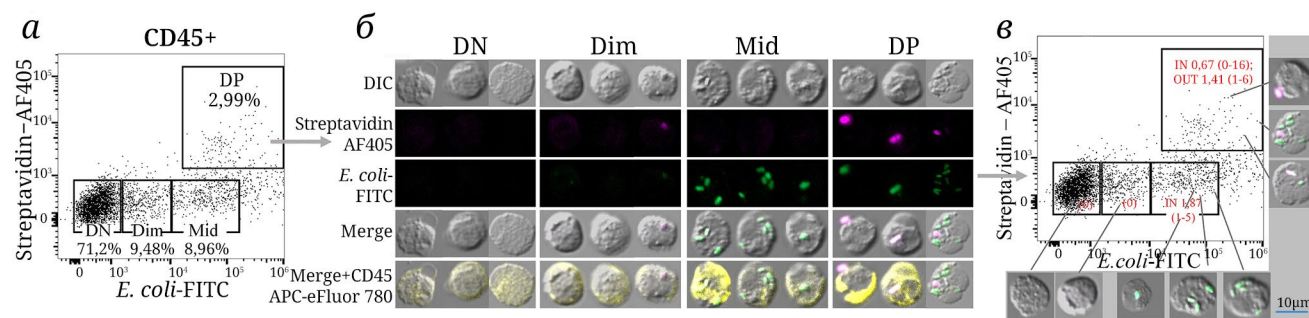


Рис. 3. Схема эксперимента по сортировке фагоцитирующих популяций лейкоцитов ($CD45^+$) и анализа отсортированных фракций на конфокальном микроскопе. Отсортированные популяции (а) были проанализированы с использованием конфокальной микроскопии (б), где DN – двойная негативная популяция (0 бактерий); Dim – клетки, интенсивность флуоресценции которых не более чем на декаду больше, чем у DN (автофлуоресценция – 0 бактерий); Mid – клетки с умеренной интенсивностью флуоресценции, в пределах декады выше, чем у Dim (1–5 бактерий внутри клетки); DP – популяция, двойная позитивная по FITC и AF405 (гетерогенная – бактерии внутри и/или на поверхности клетки). Наложение флуоресцентных изображений (FITC, AF405) и DIC обозначено как Merge (в). Красными цифрами на графике справа указаны средние значения количества *E. coli* внутри (IN) и снаружи (OUT) лейкоцитов, в скобках показан разброс данных. Индивидуальные изображения клеток – примеры клеток с различным количеством *E. coli* в популяциях (б, в). Число независимых экспериментов $n = 3$

или на поверхности. Популяция Dim демонстрировала тусклую флуоресценцию в канале FITC (в пределах 1 декады ярче клеток популяции DN). Из 33 проанализированных на микроскопе клеток Dim-популяции найдена только одна клетка с бактерией, в то время как в остальных наблюдали лишь повышенную флуоресценцию цитоплазмы. Вероятно, это фоновая автофлуоресценция, возникающая в результате поглощения бактериальных остатков, конъюгированных с FITC. Популяция Mid образует выраженный кластер по флуоресценции FITC при анализе методом проточной цитометрии, отстоящий примерно на одну декаду по яркости от Dim-популяции; по интенсивности флуоресценции в канале AF405 клетки Mid соответствуют автофлуоресценции клеток DN. Это свидетельствует о том, что данная популяция состоит из фагоцитировавших бактерии клеток, не содержащих *E. coli* на поверхности.

Визуальный анализ с помощью конфокальной микроскопии (проанализирована 151 клетка) подтверждает это предположение. Фагоцитарное число в популяции Mid варьируется от 1 до 5 (среднее значение – 1,87 бактерий на клетку, рис. 3). DP – двойная позитивная популяция по интенсивности флуоресценции в каналах AF405 и FITC – составляет 3% и представляет собой лейкоциты с бактериями либо только на поверхности, либо и на поверхности, и внутри клеток. Среднее число бактерий внутри клеток популяции DP (по данным микроскопического анализа 51 клетки) составляет 0,67 бактерий на клетку (от 0 до 16, рис. 3); среднее число бактерий снаружи клеток – 1,41 (от 1 до 6, рис. 3). Таким образом, данная популяция является крайне гетерогенной и может быть в дальнейшем разделена на несколько субпопуляций.

Визуализация фагоцитов в потоке с использованием двойного окрашивания выявила присутствие значительного количества *E. coli* на поверхности клеток. Хотя последовательное применение сортировки и конфокальной микроскопии позволяет оценить количество и пространственное расположение бактерий в фагоцитах, всё же такой анализ остаётся трудоёмким и затратным по времени. Применение только проточной цитометрии позволяет по флуоресценции различить количество *E. coli*, находящихся внутри фагоцитов, но не даёт возможности количественно оценить фагоцитоз, когда бактерии находятся одновременно и внутри, и снаружи.

Для увеличения производительности при количественном анализе фагоцитоза клеточных популяций, имеющих бактерии как внутри, так и на поверхности, а также для получения статистически более точных показателей фагоцитарного числа был использован визуализирующий проточный цитометр Amnis FlowSight. Этот прибор позволяет фотографировать клетки в потоке со скоростью до нескольких тысяч в секунду и анализировать пространственное положение микробных частиц в фагоцитах. На рис. 4 показаны стратегия гейтирования и суммарное представление данных с визуализацией (нижний ряд, левый рисунок), а также панель полученных на этом цитометре снимков клеток. Фотографии клеток разделены по каналам флуоресценции (каналы: FITC, которым окрашены все бактерии, BF и BF 2 – образы клеток в светлом поле, AF405 обозначает бактерии на поверхности клеток и наложение каналов (Merge)). Анализ изображений клеток позволяет заключить, что двойное окрашивание демонстрирует не интернализованные фагоцитом бактерии,

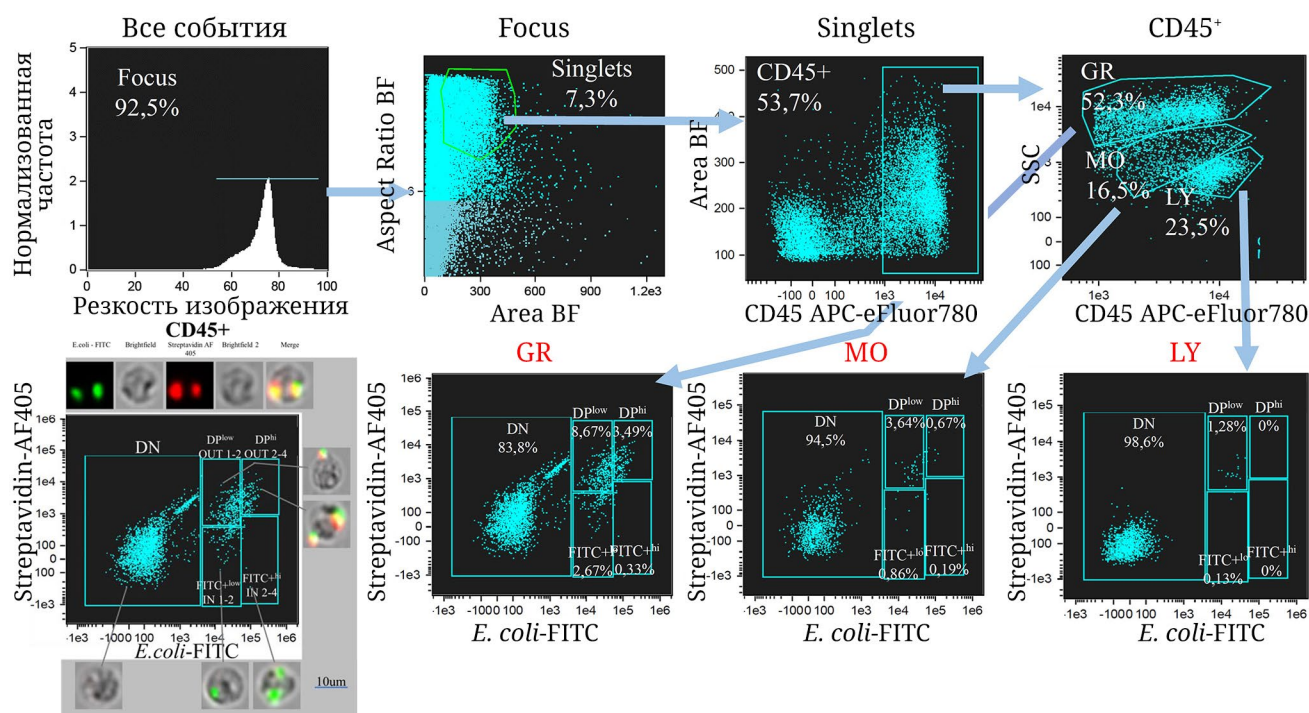


Рис. 4. Стратегия гейтирования для проточного цитометра с визуализацией Amnis FlowSight и обобщённое представление результатов визуализации. Цифрами обозначены процент клеток в популяции и количество бактерий внутри (IN) и снаружи (OUT) клеток. Для отдельных популяций было проанализировано до 352 клеток (рис. ПЗ Приложения). Число независимых экспериментов $n = 3$

а только находящиеся на его поверхности, в то время как интернализованные бактерии детектируются только в канале FITC. По интенсивности сигнала флуоресценции возможно разделить 4 популяции клеток, различающихся количеством *E. coli* внутри и снаружи клеток. Так, в популяции DP^{low} клетки содержат по 1–2 бактерии на своей поверхности, в популяции DP^{hi} – 2–4 бактерии на поверхности, в популяции $FITC^{low}$ внутри фагоцитировавших клеток содержится по 1–2 бактерии, в популяции $FITC^{hi}$ – по 2–4 бактерии внутри фагоцитов.

Наряду с двойным окрашиванием была проверена эффективность работы встроенной в приложение IDEAS 6.2 программы, определяющей на основе сделанных цитометром снимков местоположение бактерий внутри или снаружи клетки. В случае детектирования программой бактерий на поверхности клеток, а не внутри, данные программы и двойного окрашивания совпадают на 94,9% (рис. 5, а, гейт Outside stain). Это свидетельствует о том, что распознанные программой (камерой) бактерии на поверхности клеток действительно позитивны как по FITC, так и по стрептавидину. Поскольку программа производит оценку на основании параметров клетки по изображению в одной проекции, в 70% случаев те бактерии, которые, согласно данным программы, были распознаны как находящиеся внутри клеток, фактически, согласно данным по двойному окрашиванию, находились на их поверхности (рис. 5, б). Это связано с техни-

ческим ограничением визуализирующих возможностей Amnis FlowSight. На рис. 5, в представлены результаты фагоцитоза лимфоцитов. 98,6% клеток являются двойными негативными по FITC и AF405. По результатам двойного окрашивания показано, что 1,28% лимфоцитов способны удерживать *E. coli* на поверхности без дальнейшего фагоцитоза – по крайней мере в течение часа инкубации с цельной кровью.

Во многих исследованиях для анализа фагоцитоза используются различные объекты. В частности, широко распространено использование в исследованиях *E. coli*, меченных pH-зависимыми красителями. Однако использование этих реагентов требует замены плазмы крови на специальный буфер для контроля pH, что отрицательно влияет на жизнеспособность клеток и приводит к искажению результатов [19]. Более того, при изучении фагоцитоза *in vivo* в цельной крови сложно контролировать pH плазмы, в связи с чем использование бактерий, меченных pH-зависимыми красителями, ограничено и не позволяет различать локализацию кишечной палочки и внутри, и снаружи. Одноцветное мечение без возможности различить бактерии внутри и снаружи клеток приводит к неточным результатам [19, 20]. В то же время использование специфических к антигенам отдельных видов бактерий антител [21] не является универсальным и требует применения новых видоспецифичных антител при изучении

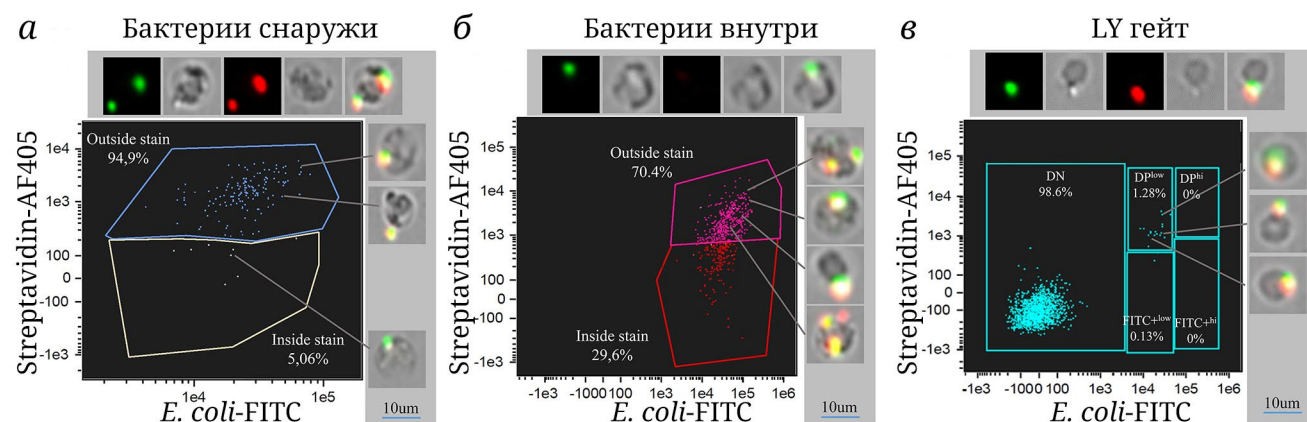


Рис. 5. Локализация бактерий относительно клеток по результатам анализа встроенной программы Amnis и двойного окрашивания. *а* – Бактерии, которые детектировались программой как находящиеся снаружи клеток. 94,9% этих клеток действительно были позитивны и по FITC, и по AF405, то есть бактерии адгезированы на поверхности фагоцитов. *б* – Бактерии, которые детектировались программой как находящиеся внутри клеток. Однако 70,4% из этих клеток были позитивны и по FITC, и по AF405, что, согласно двойному окрашиванию, указывает на локализацию бактерий на поверхности клеток. *в* – Лимфоцитарный (LY) гейт. Хотя программа детектирует некоторые клетки в популяции лимфоцитов как фагоцитирующие, все 1,28% клеток, согласно двойному окрашиванию, находились на поверхности. Верхние панели иллюстрируют (слева направо) каналы: FITC (*E. coli*), Brightfield 1, AF405 (biotin-streptavidin, *E. coli*), Brightfield 2 и наложение всех каналов. Правые панели визуализируют клетки, показанные в виде точек на графиках проточной цитометрии. Синей линией дана масштабная линейка для изображений клеток. Образцы поклеточного анализа изображений показаны на рис. ПЗ Приложения

фагоцитоза разных объектов. Использование меченных FITC и биотином бактерий любого вида позволяет легко идентифицировать нефагоцитированные бактерии путём поверхностного окрашивания конъюгированным с AF405 стрептавидином и облегчает их обнаружение с помощью конфокальной микроскопии. Однако, несмотря на высокую точность, использование конфокальной микроскопии не позволяет анализировать большое количество объектов с высокой производительностью. С появлением новых методов проточной цитометрии с визуализацией стала возможной обработка больших массивов изображений с высокой производительностью. В настоящем исследовании мы применили проточную цитометрию с визуализацией, а также разработали препарат *E. coli*, позволяющий проводить анализ быстро и с высокой точностью. Таким образом, с помощью дополнительного окрашивания возможно детектировать бактерии внутри и снаружи клеток в любой момент фагоцитоза в цельной крови, определяя кинетику данного процесса.

В ходе исследования выявлено, что программа определяет, какие бактерии находятся внутри, а какие на поверхности клеток (на основании полученных с помощью цитометра Amnis FlowSight снимков), с низкой точностью: некоторые лимфоциты детектировались программой как фагоцитировавшие, однако результаты двойного окрашивания опровергли эти данные (рис. 5, в). Таким образом, алгоритмы распознавания визуализирующих проточных цитометров при исполь-

зовании традиционных объектов для фагоцитоза потенциально приводят к переоценке фагоцитоза, в то время как разработанные в ходе исследования методы конъюгации *E. coli* и проведения фагоцитарного теста могут существенно увеличить точность результатов и быть использованы для оценки количественной и временной динамики поглощения патогенов.

Для описанного метода существуют ограничения, которые, однако, легко преодолимы. Известно, что некоторые виды бактерий содержат в своей клеточной стенке авидины, которые характеризуются высокой аффинностью к биотину [22]. В случае использования таких бактерий вместо конъюгирования с биотином возможна детекция биотином, конъюгированным с различными флуорохромами. В случае, если авидинов для детекции недостаточно, возможно конъюгирование бактерий с избытком реактивного эфира биотина и последующее окрашивание стрептавидином или предварительное блокирование эпитопов авидина биотином и дальнейшее мечение реактивным эфиром биотина по аминок группам белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты количественного анализа фагоцитоза с применением сортировки и последующей визуализацией анализируемых популяций. С применением методов сортировки клеток и конфокальной микро-

скопии данные по количеству и расположению *E. coli* относительно фагоцитирующих популяций клеток крови сопоставлены со значениями флуоресценции. Обнаружено, что за один час фагоцитоза большинство гранулоцитов и моноцитов завершает цикл интернализации внутрь клетки. Однако при избытке добавляемых бактерий они адгезируются без интернализации на поверхности около 20% из взаимодействующих с ними фагоцитов. Мы предполагаем, что удержание бактерий на поверхности лимфоцитами может являться важной составляющей противомикробной иммунной функции наряду с фагоцитозом.

Количественный анализ фагоцитарного числа минорных популяций клеток, имеющих бактерии как снаружи, так и внутри, обычно требует применения трудозатратной конфокальной микроскопии с 3D реконструкцией для определения местоположения бактерий относительно фагоцита. Использование цитометрии с визуализацией совместно с препаратом *E. coli* с двойным мечением позволяет с большой пропускной способностью и высокой точностью количественно определять наличие бактерий внутри и снаружи клеток. Двойное окрашивание *E. coli* позволило значительно улучшить точность результатов на проточных цитометрах с визуализацией клеток в потоке.

Кроме того, было показано, что некоторые субпопуляции лимфоцитов способны удерживать бактерии, однако, не интернализуя их за время эксперимента.

Дальнейший анализ быстро фагоцитирующих и удерживающих бактерии на поверхности субпопуляций с использованием цитометрии с визуализацией позволит более точно понимать функцию отдельных клеточных популяций в процессах врождённого иммунитета.

Вклад авторов. Е.В. Лысакова, А.Н. Шумеев, С.А. Чувпило, В.С. Лактюшкин, Н.А. Арсентьева – проведение экспериментов; Е.В. Лысакова, Н.А. Арсентьева, А.Н. Шумеев, С.А. Рыбцов – обсуждение результатов исследования; Е.В. Лысакова, Н.А. Арсентьева, А.Н. Шумеев, М.Ю. Бобров, В.С. Лактюшкин – обсчёт и анализ результатов исследований;

Е.В. Лысакова, С.А. Рыбцов – написание текста; Е.В. Лысакова, А.Н. Шумеев, С.А. Чувпило, В.С. Лактюшкин, Н.А. Арсентьева, М.Ю. Бобров, С.А. Рыбцов – редактирование текста статьи; С.А. Рыбцов – концепция и руководство работой.

Благодарности. Благодарим С.А. Недоспасова, О.К. Бацунова и В.В. Зарубаева за содействие в выполнении работы; Лабораторный комплекс Университета «Сириус» и Ресурсный центр клеточной технологии и иммунологии за предоставление оборудования для работы; ЦКП ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера «Цитометрии и биомаркеры» за помощь и предоставление проточного цитометра с визуализацией Amnis FlowSight («Cytex»).

Финансирование. Работа по анализу фагоцитоза с использованием проточной цитометрии и конфокальной микроскопии, а также анализ результатов и подготовка рукописи были выполнены Лысаковой Е.В., Шумеевым А.Н. и Рыбцовым С.А. при поддержке Российского научного фонда, проект № 23-15-00443 (<https://rscf.ru/project/23-15-00443/>). Приготовление бактерий, конъюгированных с двойной меткой, количественный анализ, а также валидация препарата на Amnis FlowSight были выполнены Лысаковой Е.В., Чувпило С.А., Бобровым М.Ю. при финансировании Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-093; проект НИР-ИМБ-2102).

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

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют национальным этическим стандартам, Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям и одобрены комитетом по биоэтике Университета «Сириус» (протокол от 06.03.2023 г.). Информированное добровольное согласие получено от всех индивидуальных участников исследования до отбора образцов крови.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lancaster, C. E., Ho, C. Y., Hipolito, V. E., Botelho, R. J., and Terebiznik, M. R. (2019) Phagocytosis: what's on the menu? *Biochem. Cell Biol.*, **97**, 21-29, <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0008>.
2. Carneiro, V. M. A., Bezerra, A. C. B., Guimarães, M. D. C. M., and Muniz-Junqueira, M. I. (2012) Decreased phagocytic function in neutrophils and monocytes from peripheral blood in periodontal disease, *J. Appl. Oral Sci.*, **20**, 503-509, <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000500002>.
3. Singh, R., Belchamber, K. B. R., Fenwick, P. S., Chana, K., Donaldson, G., Wedzicha, J. A., Barnes, P. J., Donnelly, L. E., and COPDMAP consortium (2021) Defective monocyte-derived macrophage phagocytosis is associated with exacerbation frequency in COPD, *Respirat. Res.*, **22**, 1-11, <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01718-8>.

4. Nakahashi-Oda, C., Fujiyama, S., Nakazawa, Y., Kanemaru, K., Wang, Y., Lyu, W., Shichita, T., Kitaura, J., and Shibuya, A. (2021) CD300a blockade enhances efferocytosis by infiltrating myeloid cells and ameliorates neuronal deficit after ischemic stroke, *Sci. Immunol.*, **6**, eabe7915, <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe7915>.
5. Kelley, S. M., and Ravichandran, K. S. (2021) Putting the brakes on phagocytosis: “don’t-eat-me” signaling in physiology and disease, *EMBO Rep.*, **22**, e52564, <https://doi.org/10.15252/embr.202152564>.
6. Tang, Z., Davidson, D., Li, R., Zhong, M. C., Qian, J., Chen, J., and Veillette, A. (2021) Inflammatory macrophages exploit unconventional pro-phagocytic integrins for phagocytosis and anti-tumor immunity, *Cell Rep.*, **37**, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110111>.
7. Uribe-Querol, E., Rosales, C. (2017) Control of phagocytosis by microbial pathogens, *Front. Immunol.*, **8**, 1368, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368>.
8. Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J. M., and Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages, *Cell*, **110**, 119-131, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00797-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00797-3).
9. Dempsey, L. A. (2019) Inhibiting phagocytosis, *Nat. Immunol.*, **20.9**, 1089-1089, <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0485-z>.
10. Cruz, F. M., Chan, A., and Rock, K. L. (2023) Pathways of MHC I cross-presentation of exogenous antigens, *Semin. Immunol.*, **66**, 101729, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101729>.
11. Porpodis, K., Domvri, K., Zarogoulidis, P., Petridis, D., Tsirgogianni, K., Papaioannou, A., Hatzizisi, O., Kioumis, I., Liaka, A., Kikidaki, V., Lampaki, S., Organtzis, J., and Zarogoulidis, K. (2015) Roflumilast, a phosphodiesterase-4 inhibitor, induces phagocytic activity in Greek COPD patients, *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, **10**, 1123-1128, <https://doi.org/10.2147/COPD.S83205>.
12. Morais, T. C., Honorio-França, A. C., Fujimori, M., de Quental, O. B., Pessoa, R. S., França, E. L., and de Abreu, L. C. (2019) Melatonin action on the activity of phagocytes from the colostrum of obese women, *Medicina*, **55**, 625, <https://doi.org/10.3390/medicina55100625>.
13. Garcia-Seyda, N., Seveau, V., Manca, F., Biarnes-Pelicot, M., Valignat, M. P., Bajenoff, M., and Theodoly, O. (2021) Human neutrophils swim and phagocytise bacteria, *Biol. Cell*, **113**, 28-38, <https://doi.org/10.1111/boc.202000084>.
14. Li, W. (2013) Phagocyte dysfunction, tissue aging and degeneration, *Ageing Res. Rev.*, **12**, 1005-1012, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.05.006>.
15. Ciabattini, A., Nardini, C., Santoro, F., Garagnani, P., Franceschi, C., and Medaglini, D. (2018) Vaccination in the elderly: the challenge of immune changes with aging, *Semin. Immunol.*, **40**, 83-94, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.10.010>.
16. Robinson, J. P., Carter, W. O., and Narayanan, P. (1997) Functional assays by flow cytometry, in *Manual of Clinical Laboratory Immunology. Volume Immune Cell Phenotyping and Flow Cytometric Analysis: Am. Soc. Microbiol.* (Rose, Ed., Folds, J. D., Lane, H. C., and Nakamura, R., eds) 5, pp. 245-254.
17. Serrander, L., Skarman, P., Rasmussen, B., Witke, W., Lew, D. P., Krause, K. H., Stendahl, O., and Nüße, O. (2000) Selective inhibition of IgG-mediated phagocytosis in gelsolin-deficient murine neutrophils, *J. Immunol.*, **165**, 2451-2457, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2451>.
18. Lindner, B., Burkard, T., and Schuler, M. (2020) Phagocytosis assays with different pH-sensitive fluorescent particles and various readouts, *Biotechniques*, **68**, 245-250, <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0003>.
19. Yang, F., Zhang, F., Yang, L., Li, H., and Zhou, Y. (2021) Establishment of the reference intervals of whole blood neutrophil phagocytosis by flow cytometry, *J. Clin. Lab. Analysis*, **35**, e23884, <https://doi.org/10.1002/jcla.23884>.
20. Jackaman, C., Tomay, F., Duong, L., Razak, N. B. A., Pixley, F. J., Metharom, P., and Nelson, D. J. (2017) Aging and cancer: the role of macrophages and neutrophils, *Ageing Res. Rev.*, **36**, 105-116, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.03.008>.
21. DeLoid, G. M., Sulahian, T. H., Imrich, A., and Kobzik, L. (2009) Heterogeneity in macrophage phagocytosis of *Staphylococcus aureus* strains: high-throughput scanning cytometry-based analysis, *PLoS One*, **4**, e6209, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006209>.
22. Laitinen, O. H., Kuusela, T. P., Kukkurainen, S., Nurminen, A., Sinkkonen, A., and Hytönen, V. P. (2021) Bacterial aviridins are a widely distributed protein family in Actinobacteria, Proteobacteria and Bacteroidetes, *BMC Ecol. Evol.*, **21**, 1-14, <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01784-y>.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHAGOCYTOSIS IN WHOLE BLOOD USING DOUBLE STAINING AND VISUALIZATION

E. V. Lysakova¹, A. N. Shumeev², S. A. Chuvpilo¹, V. S. Laktyushkin², N. A. Arsentieva³,
M. Yu. Bobrov¹, and S. A. Rybtsov^{2*}

¹ Division Immunobiology and Biomedicine, Center for Genetics and Life Sciences,
Sirius University of Science and Technology, 354340 Sirius, Krasnodar Region, Russia

² Resource Center for Cell Technologies and Immunology, Sirius University of Science and Technology,
354340 Sirius, Krasnodar Region, Russia

³ Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197101 St. Petersburg, Russia

Phagocytosis is an essential innate immunity function in humans and animals. A decrease in the ability to phagocytize is associated with many diseases and aging of the immune system. Assessment of phagocytosis dynamics requires quantification of bacteria inside and outside the phagocyte. Although flow cytometry is the most common method for assessing phagocytosis, it does not include visualization and direct quantification of location of bacteria. Here, we used double-labeled *Escherichia coli* cells to evaluate phagocytosis by flow cytometry (cell sorting) and confocal microscopy, as well as employed image cytometry to provide high-throughput quantitative and spatial recognition of the double-labeled *E. coli* associated with the phagocytes. Retention of pathogens on the surface of myeloid and lymphoid cells without their internalization was suggested to be an auxiliary function of innate immunity in the fight against infections. The developed method of bacterial labeling significantly increased the accuracy of spatial and quantitative measurement of phagocytosis in whole blood and can be recommended as a tool for phagocytosis assessment by imaging flow cytometry.

Keywords: phagocytosis, *E. coli*, flow cytometry, confocal microscopy, Amnis, human leukocytes

УДЛИНЕНИЕ ЛИНКЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МЕЖДУ АНТИГЕН-УЗНАЮЩИМИ МОДУЛЯМИ ОБЕСПЕЧИВАЕТ БОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНУЮ НАРАБОТКУ БИСПЕЦИФИЧНЫХ НАНОАНТИТЕЛ В ПЕРИПЛАЗМЕ *E. coli*

© 2024 С.В. Тиллиб^{1,2*}, О.С. Горяйнова^{1,2}

¹ Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: tillib@genebiology.ru

Поступила в редакцию 21.12.2023

После доработки 27.04.2024

Принята к публикации 27.04.2024

Использование технологии получения однодоменных антител (молекул NANOBODY®, также обозначаемых как наноантитела, нАТ, или молекул на основе других стабильных белковых структур) и их производных для решения актуальных задач биомедицины становится всё более популярным. Действительно, формат одного небольшого хорошо растворимого белка со стабильной структурой, полнофункционального в плане специфического узнавания, очень удобен как модуль для создания мультивалентных, би-/олигоспецифичных таргетных генно-инженерных молекул и структур. Нарботка нАТ в периплазме бактерии *E. coli* является очень удобным и достаточно универсальным способом получения аналитических количеств нАТ для первичного изучения свойств этих молекул и выбора наиболее перспективных вариантов. Сложнее пока обстоит дело с наработкой в таких же условиях би- и мультивалентных производных первично отбираемых нАТ. В данной работе разработаны и применены удлинённые линкерные последовательности (52 и 86 а.о.) между антиген-узнающими модулями в клонируемых экспрессионных конструкциях с целью повышения эффективности наработки биспецифичных наноантител (бсНТ) в периплазме бактерий *E. coli*. Три варианта модельных бсНТ, описанные в этом исследовании, были наработаны в периплазме бактерий и выделены в растворимом виде с сохранением функциональности всех белковых доменов. Если ранее наши попытки наработать в периплазме бсНТ с традиционными линкерами длиной не более 30 а.о. были безуспешными, то применённые здесь удлинённые линкеры обеспечили существенно более эффективную наработку бсНТ, сравнимую по эффективности с традиционной наработкой исходных мономерных нАТ. Использование сильно удлинённых линкеров, предположительно, может быть полезным для повышения эффективности наработки также и других бсНТ, и подобных им молекул в периплазме бактерий *E. coli*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: однодоменное антитело, наноантитело, биспецифичное антитело, много-модульное антитело.

DOI: 10.31857/S0320972524050136 EDN: YNRGGV

ВВЕДЕНИЕ

Новые лекарства и инструменты на основе моноклональных антител и их производных произвели революцию в биомедицине и иммунобиотехнологии. В последние годы, в дополнение к классическим моноклональным антителам, многими исследователями уделяется всё большее внимание инженерии рекомбинантных фрагмен-

тов антител, а также других антиген-связывающих молекул. Сегодня одной из самых перспективных технологий для создания таргетных генно-инженерных молекул, мультивалентных и би-/олигоспецифичных структур является технология получения рекомбинантных производных однодоменных антиген-связывающих фрагментов (VHH) особых антител (HCAb, Heavy-Chain only antibodies), представляющих собой гомодимер укороченной

Принятые сокращения: бсНТ – биспецифичное наноантитело; нАТ – наноантитело; ILZ – тримеризующийся домен, «изолейциновая молния»; PBS – стандартный фосфатно-солевой буферный раствор.

* Адресат для корреспонденции.

тяжёлой цепи при полном отсутствии лёгких цепей. Такие особые антитела присутствуют в норме в крови представителей семейства Camelidae и у некоторых видов хрящевых рыб в дополнение к классическим типам иммуноглобулинов [1, 2]. Верблюдовые естественным образом производят антитела, в которых модуль распознавания мишени состоит из одного вариабельного домена (VHH), рекомбинантную версию которого также обозначают как однодоменное антитело, наноантитело (нАТ) или молекула НАНОТЕЛО® (NANOBODY® и NANOBODIES® являются зарегистрированными товарными знаками «Ablynx NV», дочерней компании «Sanofi», поэтому далее в статье мы не будем использовать эти названия). Основными особенностями нАТ являются небольшие размеры (в 10 раз меньше классического антитела), высокая растворимость, стабильность (в широком диапазоне температур и pH), способность узнавать необычные, скрытые для классических антител эпитопы, возможность использования очень эффективного метода фагового дисплея для селекции оптимальных вариантов нАТ, а также простота осуществления всевозможных модификаций методами генной инженерии. нАТ могут быть соединены с Fc-доменами, другими нАТ, пептидными метками или токсинами и химически конъюгированы с лекарствами, радионуклидами, фотосенсибилизаторами и наночастицами [3–5]. Разработаны эффективные методы генно-инженерной модификации (форматирования) исходно отбираемых моновалентных нАТ с целью их адаптации для конкретного использования. Создаваемые на их основе более сложные производные молекулы, мультивалентные, биспецифичные и иные конструкции могут приобретать заметно более высокую специфичность и эффективность связывания, существенно более высокую биологическую активность. На основе форматированных нАТ могут быть разработаны новые биологические инструменты и материалы с улучшенными свойствами, например, для борьбы с вирусными или иными инфекциями [6–10]. Несмотря на уже многочисленные примеры создания и применения биспецифичных нАТ (бсНТ) [11–14], в том числе и в бактериальных системах экспрессии [15–17], в настоящее время пока не создано достаточно универсального способа их быстрого получения в растворимом и функциональном виде для предварительного тестирования и отбора наиболее перспективных вариантов. Исследователи уделяют внимание способам индукции синтеза белка, подходящим штаммам клеток, особым плазмидным векторам. В большинстве недавних работ [11, 13], в том числе рассмотренных в обзорах [15–17], бсНТ получали в клеточном лизате бактерий, однако при таких условиях бсНТ могут денатурировать и образовать

нежелательные связи с другими (загрязняющими) белками. При этом описано крайне мало подходов по получению бсНТ с достаточно хорошим выходом в условиях, приближённых к физиологическим. Одним из эффективных вариантов может быть выделение таких нАТ из периплазмы бактерий, где, в отличие от цитозоля, правильно формируются цистеиновые связи, стабилизирующие иммуноглобулиновую структуру [18].

Особое внимание при конструировании экспрессионных конструкций с двумя и более вариабельными антиген-узнающими доменами антител уделяется линкерным последовательностям (линкерам) между этими доменами. Показано, что как длина, так и состав линкеров могут влиять на эффективность наработки, стабильность и биологическую активность как генно-инженерного одноцепочечного антитела [19, 20], так и бсНТ [21]. Наиболее подробная информация о разработке линкеров между антиген-узнающими модулями при создании бсНТ приведена в обширном патенте на эту тему [22] от главного в мире разработчика технологии нАТ и биомедицинских продуктов на её основе – бельгийской компании «Ablynx NV», которая недавно стала частью глобальной фарм-компании «Sanofi». Авторы патента перечисляют с указанием ссылок большое число линкеров, которые были описаны и использовались до 2014 года включительно. В патенте длины рассматриваемых возможных линкеров варьируют от 1 до 50 аминокислотных остатков (а.о.).

Следует отметить, что наработка би- и мультивалентных производных нАТ в периплазме бактерий часто является сложной задачей. В частности, в нашей лаборатории накоплен значительный опыт по наработке в периплазме бактерий разнообразных моновалентных нАТ, однако наши первоначальные эксперименты по созданию и наработке в периплазме бактерий биспецифичных и мновалентных нАТ выявили ненадёжность (нестабильность конструкций, высокая мутабельность, очень низкая эффективность наработки и выделения растворимых нАТ) использования для этой цели наиболее популярного сегодня метода клонирования двух копий VHH, разделённых традиционной линкерной последовательностью, такой как (GGGGS)₃, или линкером длиной 28 а.о., созданным на базе шарнирного участка неканонического антитела Верблюдовых [8].

Целью данного исследования была проверка предположения о возможности повысить эффективность наработки бсНТ путём существенного удлинения линкера, создаваемого на основе комбинации более коротких линкерных последовательностей, использованных нами ранее. Основными задачами данной работы были: 1) создание новых конструкций для экспрессии бсНТ с двумя

Праймеры для ПЦР-клонирования

Название	Последовательность (5'–3')
NcoI-VNH-fd	CGAGCCGACCATGGCCCTGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
BamHI-rev (для линкера 1)	ACCTGGATCCCTCGAGCCGCTTTCTGGTTCAGG
BamHI-rev (для линкера 2)	ACCTGGATCCCTCGAGCCGCTACGTTACCCAC
BamHI-fd	CGAGGGATCCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCA
Sal-rev	ATGTCCGTCGACTCTAGACCGCCACCGCGCTGCCACCT
SalI-fd	GCGGTTCGACGGCTCAGGTGCAGCTGGTGGAGT
NotI-rev	GGACTAGTGC GGCCGCTTGAGGAGACGGTGACCTGGGT
NotI-fd	GCGAGCGGCCGCTACCCGTACGAC
EcoRI-rev	GCGGAATTCTATTAGCCGGAAGCGTAGTC

При достижении культурой бактерий оптической плотности 0,6 при длине волны 600 нм добавляли 0,5 мМ раствора изопропил-бета-D-галактопиранозид (ИПТГ), температуру инкубации понижали до 28–30 °C и инкубировали клетки в течение 5 часов. Клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 3000 g. Далее проводили процедуру осмотического шока для выделения периплазматического экстракта. Клеточный осадок суспендировали в буфере, содержащем сахарозу (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА, 20%-ная сахароза, 10 мМ имидазол, свежедобавленный 1 мМ PMSF), и оставляли в ледяной бане на 30 мин. Затем добавляли водный забуференный раствор (10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 мМ MgCl₂), тщательно и быстро перемешивали, после чего оставляли суспензию клеток в ледяной бане ещё на 30 мин, затем клетки центрифугировали 20 мин при 16 000 g. Отбирали супернатант, содержащий периплазматический экстракт, и добавляли NaCl до конечной концентрации 0,3 М. В случае выделения периплазматического экстракта, содержащего тримеризующееся бсНТ, принципиально было использовать дополнительные модификации процедуры, включающие разрушение клеточной стенки путём добавления 5 мг/мл лизоцима в раствор, содержащий сахарозу, и добавление 20 мМ имидазола в последующий водный раствор.

Очистку целевого белка проводили с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе, используя гель HIS-Select Nickel Affinity Gel («Sigma-Aldrich», США). Данная очистка возможна благодаря наличию на С-конце форматированного НАТ шести гистидиновых остатков (His-tag). Очистку проводили согласно протоколу производителя. Объём колонки подбирали в зависимости от объёма исходной культуры и получаемого периплазматического экстракта, в среднем колонку объёмом 0,5 мл использовали для очистки НАТ, выделяемого из 300 мл культуры. Колонку уравнивали «лизирующим» буфером (50 мМ

NaH₂PO₄, pH 8,0, 0,3 М NaCl, 10 мМ имидазол). При очистке предположительно тримеризующихся бсАТ количество имидазола в буфере увеличивали до 20 мМ. Периплазматический экстракт добавляли в колонку и проводили сорбцию белка «batch»-методом, перемешивая экстракт и агарозу на мини-ротаторе Bio RS-24 («Biosan», Латвия) в течение 30–40 мин. Затем колонку переводили в вертикальное положение, давали осесть Ni²⁺-NTA-агарозе и пропускали через неё экстракт. После этого колонку промывали в три этапа лизирующим буфером суммарным объёмом, равным 10 объёмам колонки. Элюцию белка проводили дробно, путём трёхкратного добавления одного объёма колонки элюирующего буфера (50 мМ NaH₂PO₄, pH 8,0, 0,3 М NaCl, 250 мМ имидазол). Таким образом, с одной колонки объёмом 0,5 мл получали элюат объёмом 1,5 мл.

Электрофорез белков. Качество и количество НАТ, содержащегося в полученном элюате, определяли при помощи анализа аликвот очищенных НАТ методом электрофореза в 5–19%-ном градиентном SDS-полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях по Лэммли [29]. Использовали прибор MiniProtein II («Bio-Rad», США), источник питания – Эльф-4 («ДНК-Технология», Россия). В качестве восстанавливающего агента использовали ДТТ (дитиотреитол). Перед нанесением к образцам добавляли буфер (31,25 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 12,5%-ный глицерин; 1%-ный SDS; 0,005%-ный бромфеноловый синий), пробы прогревали 10 мин при 97 °C. Электрофорез проводили в стандартном SDS-буфере (0,2 М глицин, 0,025 М Tris, 0,1%-ный SDS). Контроль разделения молекул проводили с использованием белкового маркера Precision Plus Protein Standards (161-0363, «Bio-Rad»). Примерное количество НАТ в соответствующей полосе на окрашенном геле оценивали относительно интенсивности полос маркера (так, в 5 мкл маркера интенсивность полосы 50 кДа соответствует примерно 375 нг, а полосы 20 кДа – 75 нг белка).

Иммуноферментный анализ для проверки функциональности обоих модулей НАТ в составе получаемого двухмодульного бсНТ. Использовали следующие антигены: рекомбинантный ICAM-1 человека («R&D Systems», США), рекомбинантный аллерген пыльцы берёзы Bet v 1 («Biomay AG», Австрия), рекомбинантный гемагглютинин (HA-H5) вируса гриппа H5N2 («Sino Biotechnological Inc.», Китай) и очищенный IgA человека («Имтек», Россия). Раствор антигена в концентрации 2 мкг/мл в стандартном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS: 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, pH 7,4) использовали для иммобилизации антигена в течение ночи при +4 °C в лунках 96-луночного планшета с плоским дном (MaxiSorp, «Nunc», Дания). Контрольные лунки не содержали антиген, а далее обрабатывались параллельно с остальными экспериментальными лунками. Лунки промывали PBS трижды, затем блокировали в 1%-ном БСА в PBS в течение часа, снова промывали дважды PBS. Проверяемые НАТ наносили в разных концентрациях, преимущественно в диапазоне 0,4–1 мкг/мл, в 0,1%-ном БСА в 1× PBS, и инкубировали в течение 1 часа при эпизодическом перемешивании. Лунки тщательно промывали (5 раз в PBS) и добавляли вторичные мышиные анти-НА-таг-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich»), разведённые 1 : 2000 в 0,1%-ном БСА/PBS. Через 1 час лунки снова тщательно промывали и затем добавляли индикаторную смесь 1-Step Ultra TMB («Thermo Fisher Scientific», США). Для остановки реакции использовали 2 М серную кислоту. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на планшетном фотометре. Данные получали в трёх повторях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей лаборатории уже много лет ведутся исследования, связанные с получением новых однодоменных антител (НАТ) для широкого спектра антигенов-мишеней, направленные на решение актуальных задач биомедицины. В настоящее время для ряда текущих проектов лаборатории очень актуальной задачей является создание бсНТ на базе получаемых или уже полученных ранее НАТ. Для этого предпочтительна бактериальная система экспрессии (*E. coli*), так как именно в периплазме бактерий мы рутинно нарабатываем НАТ и их производные. Ранее в нашей лаборатории уже проводили эксперименты по наработке в одной рамке считывания сразу двух НАТ, кодирующие последовательности которых разделены линкером. Однако при этом выявлялись проблемы нестабильности получаемых конструкций в бактериях (необычно высокий мутагенез выявляли

путём секвенирования и ПЦР-анализа разных получаемых клонов) и очень низкого выхода рекомбинантного белка с двумя модулями НАТ (ниже уровня фоновых бактериальных белков). Эти проблемы были как при использовании традиционного линкера (Gly₄-Ser)×3, так и линкера на основе длинного шарнирного участка особых антигенов верблюдов, состоящего из 28 аминокислотных остатков (а.о.). В данной работе был учтён прежний опыт и предпринята попытка использовать ещё более удлинённый комбинированный линкер между последовательностями, кодирующими НАТ. На рис. 1 приведена схема используемой в данной работе экспрессионной конструкции на основе плазмидного вектора pHEN6 [26] для индуцируемой экспрессии бсНТ в периплазме *E. coli*, а также представлены два варианта разработанных линкеров (мы не нашли в публикациях других авторов упоминания об использовании столь удлинённых линкеров).

Линкер 1 (длиной 52 а.о.) состоит из длинного шарнирного участка особых антител верблюда (28 а.о.), соединённого с традиционным линкером Gly₄-Ser-Gly₄-Ser-Gly₄ (как в фагмиде pIT2) с несколькими дополнительными а.о., а в линкере 2 (длиной 86 а.о.) между двумя указанными частями линкера 1 встроена дополнительная последовательность рекомбинантного домена ILZ [8]. Ранее было показано, что НАТ, к которым был добавлен ILZ-домен, действительно эффективно тримеризуются в периплазме бактерии сразу после их синтеза [8].

В данном коротком сообщении приведены примеры и первичные характеристики первых бсНТ, полученных с использованием двух указанных вариантов линкеров.

Получение и анализ бсНТ с линкером 1. В совместной работе с австрийскими партнёрами нам недавно удалось получить НАТ (aBet) к основному аллергену пыльцы берёзы (Bet v 1) [24], а также НАТ (aICAM1) к мажорному поверхностному рецепторному белку эпителия ICAM1 [23]. Одной из дальнейших целей этой работы было получение бсНТ, связывающихся с ICAM1 на поверхности клеток эпителия верхних дыхательных путей человека и способных после этого также связывать поступающий из внешней среды пыльцевой аллерген, блокируя его и тем самым препятствуя аллергической реакции. В данной работе мы получили два варианта бсНТ, содержащего оба этих НАТ, aBet-l1-aICAM1 и aICAM1-l1-aBet, но идущих в разной последовательности. Любопытно, что первый вариант бсНТ воспроизводимо (в трёх независимых повторях) заметно лучше нарабатывался параллельно в тех же условиях по сравнению со вторым вариантом (дорожки 3 и 4 соответственно на рис. 2, а). Уровень наработки для бсНТ aBet-l1-aICAM1 был вполне сравним со средним уровнем наработки

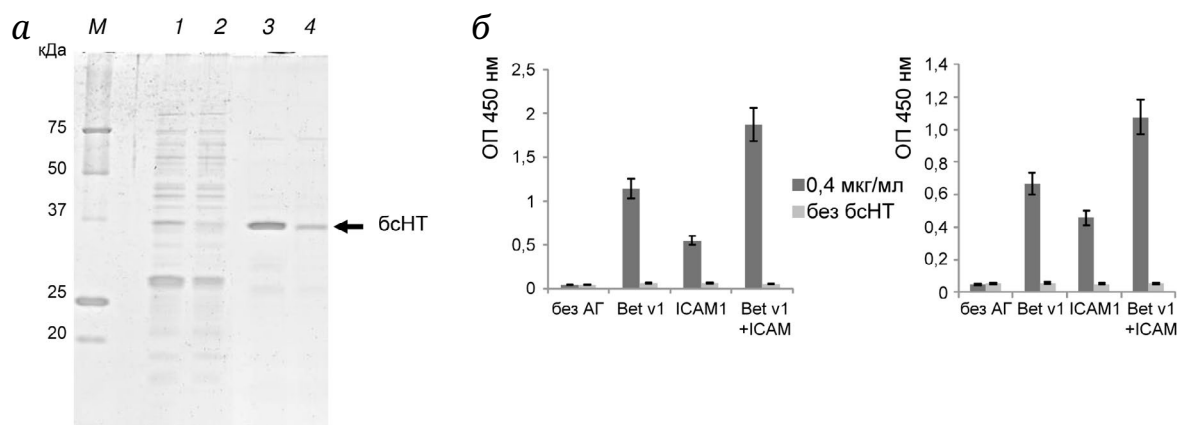


Рис. 2. SDS-PAGE и иммуноферментный анализ бсНТ аBet-l1-aICAM1 и aICAM1-l1-aBet. *а* – Электрофоретическое разделение в 5–19%-ном градиентном SDS-полиакриламидном геле белков периплазматических экстрактов (1, 2) и аффинно очищенных НАТ (3, 4). Стрелкой показано положение бсНТ. В крайней левой дорожке нанесён маркер (*М*) и указаны (в кДа) размеры маркерных полос. *б* – Иммуноанализ связывания полученных бсНТ в концентрации 0,4 мкг/мл с иммобилизованными рекомбинантными антигенами. Представлены усреднённые данные трёх измерений с указанием области разброса данных

исходных одномодульных НАТ (примерно 2 мг из 1 л культуры). Выявляемые бсНТ двигались при электрофорезе в полном соответствии с ожидаемым размером 36 кДа. В концентрации 0,4 мкг/мл оба бсНТ специфически узнавали каждый из иммобилизованных антигенов, как Bet v 1, так и ICAM1 (рис. 2, б). Таким образом, эти предварительные данные указывают на то, что в периплазме бактерии вполне возможно наработать в растворимом и активном виде заданные бсНТ. При этом порядок следования последовательностей НАТ в конструкции может иметь значение для уровня наработки.

Получение и анализ бсНТ с линкером 2. В другом нашем актуальном проекте поставлена задача разработки средства для блокировки/задержки патогенных респираторных вирусов в верхних дыхательных путях человека на основе бсНТ. Для этого мы получили и продолжаем получать как НАТ, специфически связывающие консервативные поверхностные эпитопы актуальных патогенных вирусов (в первую очередь вирусов гриппа и коронавирусов), так и НАТ к мажорным компонентам слизи или, в частности, к мажорному иммуноглобулину (IgA) слизистых тканей. Связываясь с вирусной частицей, молекулы IgA вызывают опсонизацию патогена и дают иммунной системе сигнал для его уничтожения. Ранее было показано, что для связывания и блокирования вируса предпочтительно использовать тримеризованное НАТ [8]. С целью исследования того, как влияет на наработку бсНТ добавление в состав линкера тримеризующегося домена (IL2), в данной работе был проверен второй вариант линкера (линкер 2, рис. 1). На этот раз использовались два других, полученных ранее НАТ. Одно, аНН13, связывает гемагглютинин (НА) вируса птичьего гриппа (H5N2) [8], а другое, Е7, связывает IgA человека [25]. Ожидаемый размер

мономерной версии данного бсНТ составляет примерно 39 кДа, что хорошо соответствует подвижности белка, выявляемого при электрофорезе в восстанавливающих условиях (рис. 3, а), при которых предполагаемый формирующийся тример распадается на мономеры.

В случае тримеризации размер НАТ должен увеличиться до примерно 117 кДа. В данном коротком сообщении мы пока не ставили задачу тщательно исследовать именно тримеризацию получаемого НАТ, но в качестве косвенного указания на тримеризацию нарабатываемого белка можно привести два факта. Первый: при ультрафильтрации, в процессе которой используется центрифужный концентратор с номинальным отсечением по молекулярной массе 100 кДа (Vivaspin Turbo 4, «Sartorius», Германия), данное НАТ ведёт себя как высокомолекулярный белок и практически полностью концентрируется над фильтром, тогда как другие белковые молекулы, загрязняющие исходный препарат НАТ и имеющие размер (на электрофореграмме) вплоть до 75 кДа, заметно уходят в проскок, в отличие от НАТ, движущегося при денатурирующем электрофорезе как мономерный белок размером 39 кДа. Другое указание – затруднённое выделение этого НАТ в составе периплазматического экстракта. Исходя из предположения о его трёхмерной структуре, были специально подобраны условия для более эффективного извлечения этого НАТ из периплазмы бактерий. Мы добавили процедуру разрушения клеточной стенки лизоцимом и повысили ионную силу элюирующего раствора (подробнее – в описании методов). Уровень наработки для НАТ аНА-л2-Е7 при использовании модифицированных условий выделения был также сравним со средним уровнем наработки исходных одномодульных

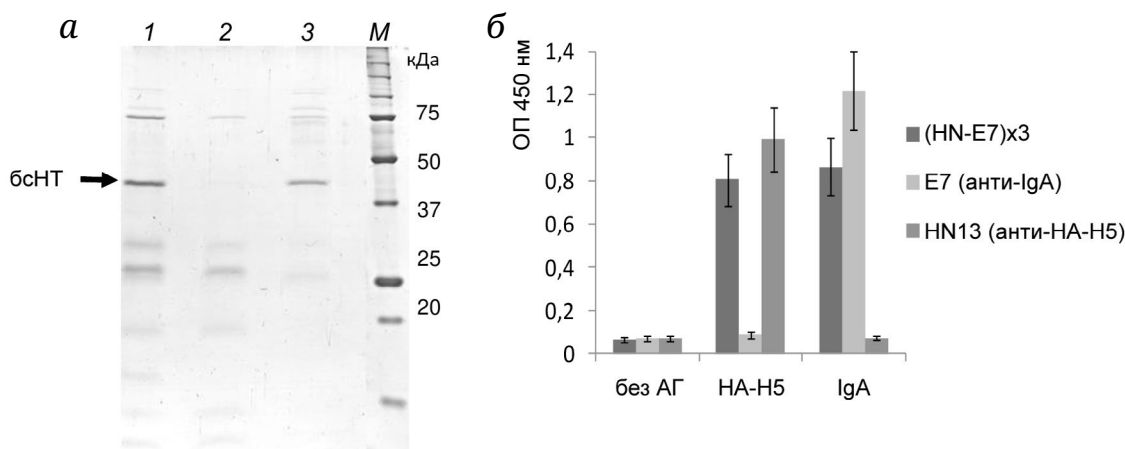


Рис. 3. SDS-PAGE и иммуноферментный анализ бсНТ аНА-л2-E7(aIgA), также обозначаемого (HN-E7)x3. *а* – Электрофоретическое разделение в 5–19%-ном градиентном SDS-полиакриламидном геле аффинно очищенного бсНТ, исходного (1), проскока на фильтре с номинальным отсечением по молекулярной массе 100 кДа (2), очищенного от мелких примесей и, предположительно, тримеризованного бсНТ (3), задержанного над фильтром с отсечением по молекулярной массе 100 кДа. Стрелкой показано положение мономерного бсНТ. В крайней правой дорожке нанесён маркер (М) и указаны (в кДа) размеры маркерных полос. *б* – Иммуноанализ связывания полученных бсНТ (HN-E7)x3, а также контрольных моновалентных НАТ (Е7 – против IgA и HN13 – против гемагглютинаина НА-Н5 вируса птичьего гриппа) в концентрации 1 мкг/мл с иммобилизованными рекомбинантными антигенами (IgA и НА-Н5). Контрольные лунки были без антигена (столбцы «без АГ»). Представлены усреднённые данные трёх измерений с указанием области разброса данных

НАТ (примерно 1 мг из 1 л культуры). Полученное НАТ обладало необходимой функциональностью и узнавало оба белка-мишени в иммуноферментном анализе (рис. 3, б). Взятые в качестве позитивных контролей мономерные НАТ, anti-IgA (Е7) [25] и НАТ против гемагглютинаина НА-Н5 вируса птичьего гриппа (HN13) [8] при связывании давали несколько более сильный сигнал. Это может отражать двукратный молярный избыток этих моноспецифических НАТ по сравнению с половинной долей Е7 и HN13 в бсНТ (при одинаковой концентрации всех трёх вариантов НАТ), а также может указывать на возможные стерические ограничения при использовании в этом анализе предположительно тримеризованного НАТ. Заметим, что для сравнения данное бсНТ также нарабатывали с линкером 1 (аНА-л1-E7), без тримеризующегося домена. Выход бсНТ был в этом случае в 2 раза выше. При использовании более коротких традиционных линкеров все три варианта описанных бсНТ вообще не удавалось наработать в детектируемых количествах.

Таким образом, мы продемонстрировали, что нарабатываемые бсНТ содержат все заданные домены в функциональном состоянии: они выделяются из периплазмы, при выделении с помощью аффинной металл-хелатной хроматографии работает His-таг, оба антиген-распознающих модуля НАТ и НА-таг функциональны в иммуноанализе. Удлиненные линкерные последовательности, по-видимому, способствуют ослаблению нежелательных взаимодействий (потенциальных рекомбинаций) между консервативными каркас-

ными GC-богатыми участками в следующих друг за другом VHH-последовательностях в случае гетерологичной бактериальной системы экспрессии, что выражается в стабильности конструкций (продуктов) и в повышении уровня наработки этих бсНТ. Мы полагаем, что в нашей работе впервые рассматриваются столь удлиненные линкеры для решения задачи повышения эффективности наработки бсНТ в периплазме. Полученные результаты определённо наполняют оптимизмом наши планы по дальнейшему использованию подобных форматов производных НАТ для самого широкого круга актуальных задач биомедицины.

Подана патентная заявка на изобретение для защиты приоритета описанных в данной статье разработок [27].

Вклад авторов. Тиллиб С.В. – концепция и руководство работой, проведение клонирования, а позже – функциональная проверка НАТ в иммуноферментном анализе; Горяйнова О.С., Тиллиб С.В. – эксперименты по наработке и выделению НАТ; Тиллиб С.В., Горяйнова О.С. – написание статьи.

Финансирование. Работа была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-15-2021-1086, контракт № RF-193021X0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature*, **363**, 446-448, <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
2. Flajnik, M. F., and Kasahara, M. (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 47-59, <https://doi.org/10.1038/nrg2703>.
3. Bannas, P., Hambach, J., and Koch-Nolte, F. (2017) Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics, *Front Immunol.*, **8**, 1603, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603>.
4. Jovčevska, I., and Muyldermans, S. (2020) The Therapeutic Potential of Nanobodies, *BioDrugs*, **34**, 11-26, <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>.
5. Тиллиб С. В. (2020) Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине, *Мол. Биол.*, **54**, 362-373, <https://doi.org/10.31857/S0026898420030167>.
6. Stone, E., Hiram, T., Tanha, J., Tong-Sevinc, H., Li, S., MacKenzie, C. R., and Zhang, J. (2007) The assembly of single domain antibodies into bispecific decavalent molecules, *J. Immunol Methods*, **318**, 88-94, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.006>.
7. Hultberg, A., Temperton, N. J., Rosseels, V., Koenders, M., Gonzalez-Pajuelo, M., Schepens, B., Ibañez, L. I., Vanland-schoot, P., Schillemans, J., Saunders, M., Weiss, R. A., Saelens, X., Melero, J. A., Verrips, C. T., Van Gucht, S., and de Haard, H. J. (2011) Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules, *PLoS One*, **6**, e17665, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017665>.
8. Tillib, S., Ivanova, T. I., Vasilev, L. A., Rutovskaya, M. V., Saakyan, S. A., Gribova, I. Y., Tutykhina, I. L., Sedova, E. S., Lysenko, A. A., Shmarov, M. M., Logunov, D. Y., Naroditsky, B. S., and Gintsburg, A. L. (2013) Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2), *Antiviral Res.*, **97**, 245-254, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.12.014>.
9. Huet, H. A., Gowney, J. D., Johnson, J. A., Li, J., Bilic, S., Ostrom, L., Zafari, M., Kowal, C., Yang, G., Royo, A., et al. (2014) Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction, *mAbs*, **6**, 1560-1570, <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.975099>.
10. Laursen, N. S., Friesen, R. H. E., Zhu, X., Jongeneelen, M., Blokland, S., Vermond, J., van Eijgen, A., Tang, C., et al. (2018) Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin, *Science*, **362**, 598-602, <https://doi.org/10.1126/science.aag0620>.
11. Efimov, G. A., Kruglov, A. A., Khlopchatnikova, Z. V., Rozov, F. N., Mokhonov, V. V., Rose-John, S., Scheller, J., Gordon, S., Stacey, M., Drutskaya, M. S., Tillib, S. V., and Nedospasov, S. A. (2016) Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3006-3011, <https://doi.org/10.1073/pnas.1520175113>.
12. Hanke, L., Das, H., Sheward, D. J., Perez Vidakovich, L., Urgard, E., Moliner-Morro, A., Kim, C., Karl, V., Pankow, A., Smith, N. L., Porebski, B., Fernandez-Capetillo, O., et al. (2022) A bispecific monomeric nanobody induces spike trimer dimers and neutralizes SARS-CoV-2 *in vivo*, *Nat. Commun.*, **13**, 155, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27610-z>.
13. Liu, Y., Ao, K., Bao, F., Cheng, Y., Hao, Y., Zhang, H., Fu, S., Xu, J., and Wu, Q. (2022) Development of a bispecific nanobody targeting CD20 on B-cell lymphoma cells and CD3 on T cells, *Vaccines (Basel)*, **10**, 1335, <https://doi.org/10.3390/vaccines10081335>.
14. Ma, H., Zhang, X., Zeng, W., Zhou, J., Chi, X., Chen, S., Zheng, P., Wang, M., Wu, Y., Zhao, D., et al. (2022) A bispecific nanobody dimer broadly neutralizes SARS-CoV-1 & 2 variants of concern and offers substantial protection against Omicron via low-dose intranasal administration, *Cell Discov.*, **8**, 132, <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00497-w>.
15. De Marco, A. (2015) Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs, *Microb. Cell Factories*, **14**, 125, <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0320-7>.
16. Sandomenico, A., Sivaccumar, J. P., and Ruvo, M. (2020) Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing antibody recombinant fragments, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6324, <https://doi.org/10.3390/ijms21176324>.
17. Huleani, S., Roberts, M. R., Beales, L., and Papaioannou, E. H. (2022) *Escherichia coli* as an antibody expression host for the production of diagnostic proteins: significance and expression, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **42**, 756-753, <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1967871>.
18. Skerra, A., and Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*, *Science*, **240**, 1038-1041, <https://doi.org/10.1126/science.3285470>.
19. Le Gall, F., Reusch, U., Little, M., and Kiprianov, S. M. (2004) Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody, *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 357-366, <https://doi.org/10.1093/protein/gzh039>.
20. Wang, Q., Chen, Y., Park, J., Liu, X., Hu, Y., Wang, T., McFarland, K., and Betenbaugh, M. J. (2019) Design and production of bispecific antibodies, *Antibodies (Basel)*, **8**, 43, <https://doi.org/10.3390/antib8030043>.

21. Huang, C., Huang, J., Zhu, S., Tang, T., Chen, Y., and Qian, F. (2023) *Chem. Eng. Sci.*, **270**, 118521, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2023.118521>.
22. Roobrouck, A., and Stortelers, C. (2015) Bispecific nanobodies. Applicant – ABLYNX NV (Belgium). WIPO/PCT patent publication number WO2015044386 A1. Publication date April 2, 2015.
23. Zettl, I., Ivanova, T., Zghaebi, M., Rutovskaya, M. V., Ellinger, I., Goryainova, O., Kollárová, J., Villazala-Merino, S., Lupinek, C., Weichwald, C., Drescher, A., Eckl-Dorna, J., Tillib, S. V., and Flicker, S. (2022) Generation of high affinity ICAM-1-specific nanobodies and evaluation of their suitability for allergy treatment, *Front. Immunol.*, **13**, 1022418, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1022418>.
24. Zettl, I., Ivanova, T., Strobl, M. R., Weichwald, C., Goryainova, O., Khan, E., Rutovskaya, M. V., Focke-Tejkl, M., Drescher, A., Bohle, B., Flicker, S., and Tillib, S. V. (2022) Isolation of nanobodies with potential to reduce patients' IgE binding to Bet v 1, *Allergy*, **77**, 1751-1760, <https://doi.org/10.1111/all.15191>.
25. Горяйнова О. С., Иванова Т. И., Рutowская М. В., Тиллиб С. В. (2017) Метод параллельного и последовательного генерирования однодоменных антител для протеомного анализа плазмы крови человека, *Мол. Биол.*, **51**, 985-996.
26. Conrath, K. E., Lauwereys, M., Galleni, M., Matagne, A., Frère, J. M., Kinne, J., Wyns, L., and Muyldermans, S. (2001) Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the Camelidae, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 2807-2812, <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2807-2812.2001>.
27. Тиллиб С. В., Горяйнова О. С. (2024) Биспецифичные нанотела с удлиненными линкерными последовательностями между антиген-узнающими модулями для наработки в периплазме *E. coli*. Заявка на патент РФ № 2024101830 (от 25.01.2024), ФИПС, Москва.
28. Baral, T. N., and Arbabi-Ghahroudi, M. (2012) Expression of single-domain antibodies in bacterial systems, *Methods Mol Biol.*, **911**, 257-275, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6_16.
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>.

EXTENDING LINKER SEQUENCES BETWEEN ANTIGEN-RECOGNITION MODULES PROVIDES MORE EFFECTIVE PRODUCTION OF BISPECIFIC NANOANTIBODIES IN THE PERIPLASMA OF *E. coli*

S. V. Tillib^{1,2*} and O. S. Goryainova^{1,2}

¹ *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: tillib@genebiology.ru*

The use of technology for the production of single-domain antibodies (NANOBODY® molecules, also referred to as nanoantibodies, nAb, or molecules based on other stable protein structures) and their derivatives to solve current problems in biomedicine is becoming increasingly popular. Indeed, the format of one small, highly soluble protein with a stable structure, fully functional in terms of specific recognition, is very convenient as a module for creating multivalent, bi-/oligo-specific genetically engineered targeting molecules and structures. The production of nAb in the periplasm of the *E. coli* bacterium is a very convenient and fairly universal way to obtain analytical quantities of nAb for the initial study of the properties of these molecules and the selection of the most promising nAb options. The situation is more complicated with the production of bi- and multivalent derivatives of initially selected nAbs under the same conditions. In this work, extended linker sequences (52 and 86 aa) between antigen-recognition modules in cloned expression constructs were developed and applied in order to increase the efficiency of production of bispecific nanoantibodies (bsNB) in the periplasm of *E. coli* bacteria. Three variants of model bsNBs described in this study were produced in the periplasm of bacteria and isolated in soluble form with preservation of the functionality of all protein domains. If earlier our attempts to produce bsNB in the periplasm with traditional linkers no longer than 30 aa were unsuccessful, the extended linkers used here provided a significantly more efficient production of bsNB, comparable in efficiency to the traditional production of the original monomeric nAbs. The use of highly elongated linkers can presumably be useful for increasing the efficiency of production of other bsNBs and similar molecules in the periplasm of *E. coli* bacteria.

Keywords: single domain antibody, nanoantibody, bispecific antibody, multimodule antibody

ОЦЕНКА АНТИФИБРОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЕРТЕПОРФИНА В СОСТАВЕ КОЛЛАГЕНОВОГО НОСИТЕЛЯ *in vitro* И *in vivo*

© 2024 О.С. Роговая*, Д.С. Аболин, О.Л. Черкашина,
А.Д. Смыслов, Е.А. Воротеляк, Е.П. Калабушева

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
119334 Москва, Россия; электронная почта: rogovaya26f@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.12.2023

После доработки 05.03.2024

Принята к публикации 31.03.2024

При обширных повреждениях кожи возникает необходимость в специализированной терапии, стимулирующей процессы регенерации, но предотвращающей формирование рубцовой ткани. Мы исследовали *in vivo* и *in vitro* возможность комбинирования коллагенового геля в качестве агента, закрывающего раневое ложе и привлекающего фибробласты в область повреждения, и вертепорфина (ВП) как антифибротического препарата. *In vitro* на фибробластах, изолированных из рубцовой ткани человека, проводили оценку влияния ВП на жизнеспособность и экспрессию маркеров миофибробластов. *In vivo* коллагеновый гель и ВП отдельно и совместно вносили в рану и характеризовали признаки рубцевания при регенерации кожи: отклонения в толщине слоев кожи, интенсивность синтеза коллагена и морфометрические характеристики сформированных волокон внеклеточного матрикса. Результаты показали, что ВП корректирует фибротический фенотип путем подавления экспрессии сократительного белка Sm22α и не вызывает клеточную гибель. Однако при внесении ВП в рану в составе коллагенового геля он теряет способность направлять ранозаживление по бесшрамному типу, что может быть связано с несовместимостью механизмов, за счет которых коллаген и ВП влияют на регенерацию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дермальные фибробласты, регенерация кожи, фиброз, вертепорфин, YAP/TAZ.

DOI: 10.31857/S0320972524050148 **EDN:** YNQEQQ

ВВЕДЕНИЕ

Заживление раны представляет собой сложный процесс, который в общих чертах подразделяется на последовательные, но отчасти перекрывающиеся четыре фазы: гемостаз, воспаление, пролиферация (клеточная инфильтрация, ангиогенез и реэпителизация) и созревание/ремоделирование [1]. На стадии воспаления активация иммунных клеток стимулирует секрецию цитокинов, которые, в свою очередь, активируют миграцию в область повреждения фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток. В ложе раны фибробласты приобретают активированный фенотип и преобразуются в миофибробласты, экспрессирующие Sm22α, – клетки, отвечающие за контракцию раны и производство основных компонентов внеклеточного матрикса, таких как фибронектин

с экстра-доменом A, CD26, коллаген I и III, необходимых для заполнения дефекта соединительной ткани и формирования рубца [2–4]. Финальной фазой раневого заживления является фаза ремоделирования, которая у человека может длиться годами. На этом этапе в норме архитектура восстановленной ткани приближается к архитектуре нормальной кожи [1].

При обширных повреждениях используют специализированные агенты для стимуляции процессов регенерации. В медицинскую практику успешно входят тканевые эквиваленты, создаваемые на основе коллагенового геля [5]. Биоразлагаемость коллагена и его низкая иммуногенность делают его оптимальной основой не только для создания тканеинженерных конструкций, содержащих живые клетки, но и для самостоятельного применения в качестве раневого покрытия [6–8]. Коллаген

Принятые сокращения: ВП – вертепорфин; BrdU – 5-бromo-2'-дезоксинуридин; BSA – бычий сывороточный альбумин; DPBS – фосфатный солевой буфер; PFA – параформальдегид.

* Адресат для корреспонденции.

как ключевой элемент внеклеточного матрикса влияет на все этапы раневого заживления [9–11]. Коллагеновые гидрогели частично воспроизводят свойства внеклеточного матрикса, имеют пористую структуру и сеть протофибрилл, облегчают миграцию и колонизацию клеток, способствуя ремоделированию новообразованной ткани, и способствуют заживлению ран [12]. В некоторых случаях в состав коллагеновых заменителей кожи вносят биологически-активные молекулы: факторы роста, цитокины или их аналоги, стимулирующие процесс интеграции эквивалента в поврежденный орган, процесс регенерации окружающих тканей и модулирующие иммунный ответ.

Одним из частых осложнений регенерации кожи, особенно при крупных повреждениях, требующих специализированной терапии, таких как ожоги, является формирование гипертрофических рубцов [13]. Помимо явных косметических недостатков, рубец нарушает механические взаимодействия в коже, делая ее более хрупкой и легкой на разрыв. Рубец не содержит волосных фолликулов и сопряженных с ними сальных желез, что приводит к высыханию эпидермиса. Одним из новейших перспективных терапевтических препаратов, рассматриваемых в контексте противорубцовой терапии, является вертепорфин (ВП) [14–17].

Однократное введение ВП на ранних этапах регенерации лабораторным мышам инициировало процесс регенерации по бесшрамному типу [18]. ВП также обладает бактерицидной активностью, что благотворно сказывается на ранозаживлении [16]. Доставка в область повреждения ВП для стимуляции процессов ранозаживления была успешной при использовании носителей из фиброина [15], поливинила [17] и полилактата [14]. Мы исследовали возможность использования коллагенового геля в качестве носителя ВП для внесения его в рану, как одного из возможных средств предотвращения формирования рубцов после полного ранозаживления.

Противорубцовые свойства ВП связывают с его способностью ингибировать взаимодействие транскрипционного кофактора YAP1 и его мишеней, белков семейства TEAD. Активация сигнального каскада YAP1 происходит при ранозаживлении как в эпидермисе, так и в дерме [19]. В эпидермисе он стимулирует миграцию и пролиферацию кератиноцитов в раневом ложе. Активный ядерный YAP1 ассоциирован с пролиферацией фибробластов и повышением их сократительной способности, что важно при закрытии раны. На стадии ремоделирования активность этого сигнального каскада снижается. Увеличение времени активности сигнального каскада YAP1 у мыши приводит к формированию обычных или гипертрофических рубцов, в то же время его ингибирование в фибробластах

на ранних этапах ранозаживления стимулирует восстановление полноценной кожи со всеми дериватами [20].

Влияние ВП на процессы рубцевания рассматривали *in vitro* и *in vivo*. В условиях культивирования мы использовали фибробласты человека, изолированные из гипертрофического кожного рубца, как аналог миофибробластов раневого ложа. Оценили влияние ВП на жизнеспособность, экспрессию сократительных маркеров и сократительные способности фибробластов. *In vivo* на лабораторных мышах исследовали эффективность внесения ВП в составе коллагенового геля для стимуляции регенерации кожи. В качестве анализируемых характеристик мы сравнили скорость закрытия раны, структуру внеклеточного матрикса и общую морфологию регенерирующей кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование фибробластов дермы. Использованные в работе клеточные линии были изолированы из биоптатов кожи человека, полученных в результате реконструктивных операций в ФГБУ «НМИЦ ВМТ им. А.А. Вишневского» с информированного согласия доноров. Работу с биоптатами кожи проводили в соответствии с протоколом, одобренным Комиссией по биоэтике института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР) (№ 51 от 09.09.2021). Биоптаты промывали раствором Хэнкса с добавлением 0,4 мг/мл гентамицина для дезинфицирования, затем механически удаляли подкожный жир и ретикулярный слой дермы таким образом, чтобы верхний слой кожи с эпидермисом был толщиной не более 2 мм. Дерму с эпидермисом нарезали полосками шириной 2–3 мм и инкубировали в 2%-ном растворе диспазы («Gibco», США) в течение 1 ч при температуре 37 °C; далее, эпидермис удаляли, дерму измельчали ножницами до гомогенной консистенции и инкубировали в 0,1%-ном растворе коллагеназы I типа («Gibco») в течение 24 ч при 37 °C. Полученную массу центрифугировали при 140 g в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в DPBS (фосфатный солевой буфер; «ПанЭко», Россия); процедуру повторяли 3 раза.

Для выделения фибробластов рубца биоптат очищали от прилегающих нормальных тканей, оставляя только участки с выраженной рубцовой деформацией, затем инкубировали в течение 1 ч в 2%-ном растворе диспазы при температуре 37 °C. После удаления эпидермиса дерму измельчали до гомогенной консистенции и инкубировали в 0,1%-ном растворе либеразы («Roche», США) в течение 24 ч при температуре 37 °C. Полученную массу центрифугировали при 140 g в течение 10 мин,

осадок ресуспендировали в DPBS; процедуру повторяли 3 раза.

Изолированные фибробласты культивировали в среде Amniomax-II («Gibco») в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °C. Смену культуральной среды проводили каждые 2–3 дня. При достижении конfluence клетки пассировали 0,05%-ным раствором трипсин-ЭДТА («Capricorn», Германия) и далее культивировали в среде DMEM («ПанЭко») с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Capricorn»), 1% Glutamax («Gibco»), 1% пеницилина/стрептомицина («Gibco»). В работе использовали клетки 2–3 пассажей.

В работе были использованы образцы, полученные от трех доноров здоровой кожи в возрасте 42–55 лет, и образцы, полученные от трех доноров с рубцовой тканью в возрасте 33–45 лет. Клеточные линии были депонированы в Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) ИБР РАН.

Выявление апоптоза. Для определения профиля гибели клеток фибробласты на 1, 3 и 5 сутки после обработки ВП диссоциировали, центрифугировали при 140 g в течение 5 мин, однократно промывали DPBS, после чего инкубировали в течение 15 мин в растворе аннексина V и пропидий йодида с использованием набора для обнаружения апоптоза PI-AV («BD Pharmingen™», США), согласно инструкции производителя. Для введения в анализ коэффициента компенсации использовали пробы, отдельно окрашенные аннексином V и пропидий йодидом. Проточную цитометрию проводили с использованием проточного цитометра Attune® NxT («Life Technologies», США).

Культивирование фибробластов в коллагеновом геле. Для приготовления геля на льду смешивали: 0,34 М р-р NaOH («Химмед», Россия) – 6,5%; 7,5% р-р Na₂CO₃ («ПанЭко») – 3,42%; 10× среда M199 («Gibco») – 9,77%; Glutamax («Gibco») – 0,39%; Hepes («ПанЭко») – 1,95% и раствор коллагена I типа – 77,97%. Раствор коллагена получали из сухожилий хвостов белых лабораторных крыс породы «стандарт» путем механического отсоединения отдельных волокон и растворения их в 0,1%-ной уксусной кислоте, конечная концентрация коллагена в растворе – 2 мкг/мл. По 400 мкл геля, содержащего клеточную суспензию в концентрации 150 × 10³ клеток на мл, вносили в лунки 24-луночного планшета («Corning», США) и инкубировали при температуре 37 °C для полимеризации. Сверху геля вносили 500 мкл культуральной среды. Гель отделяли от стенок культуральной посуды, что позволяло клеткам неограниченно его сжимать.

Через сутки после формирования геля в экспериментальные лунки вносили ВП («Sigma-Aldrich»), растворенный в питательной среде в concentra-

ции 0,1 мкг/мл, и инкубировали гель с клетками в присутствии ВП в течение 24 ч, после чего гель однократно промывали раствором Хэнкса и заливали гель обычной культуральной средой.

Количественный ПЦР-анализ. РНК выделяли с применением реактива RNeasy («Sigma-Aldrich», Германия), согласно инструкции производителя. Для удаления геномной ДНК и проведения реакции обратной транскрипции использовали набор QuantiTect Reverse Transcription Kit («Qiagen», США). На реакцию обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени проводили с использованием набора 5× qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Eurogen», Россия) и амплификатора LightCycler96 («Roche», США). Протокол реакции: 10 мин при 95 °C, 1 цикл; далее 45 циклов, включающих 20 с при 95 °C, 20 с при 60 °C, 30 с при 72 °C. Все эксперименты были проведены в трех биологических и технических повторях. Количество продукта в каждом образце рассчитывали по методу 2^{-ΔΔCq} и нормализовали на экспрессию GAPDH и HPRT. Данные на графиках представлены в виде среднего с разбросом в виде стандартного отклонения. Последовательности использованных в работе праймеров указаны в табл. 1.

Включение метки BrdU и определение стадий клеточного цикла. Фибробласты (500 × 10³ клеток) высевали в культуральные флаконы («Corning») с площадью 25 см². Через 1 день вносили ВП в концентрации 0,1 мкг/мл. Концентрация ВП была определена ранее (неопубликованные данные) с учетом литературных данных [18]. Через 24 ч ВП удаляли, вносили свежую культуральную среду. Далее, на 1, 3 и 5 сутки культивирования вносили метку BrdU (5-бromo-2'-дезоксифлуоридин; «Sigma-Aldrich») в конечной концентрации 30 мкМ и инкубировали еще 2 ч. Клетки диссоциировали, промывали DPBS и фиксировали 70%-ным раствором этанола в течение 1 ч при +4 °C. Затем центрифугировали 2 мин при 1000 g, к осадку добавляли 0,5 мл 2 М HCl («Химреактив», Россия), содержащей 0,5% Triton X-100 («MP Biomedicals», США), и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Далее, клетки осаждали, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в 0,5 мл 0,1 М тетрабората натрия («Химмед»). Инкубировали 2 мин, затем промывали однократно 150 мкл DPBS/1% BSA (бычий сывороточный альбумин; «PAA», Австрия). Далее, инкубировали с 50 мкл раствора первичных антител против BrdU, приготовленного на основе DPBS с добавлением 0,5% Tween 20 («MP Biomedicals») и 1% BSA, в течение 1 ч при комнатной температуре. Клетки промывали DPBS однократно и инкубировали в растворе вторичных антител в течение 30 мин при комнатной температуре (данные о производителях и разведении антител приведены в табл. 2).

Таблица 1. Используемые в работе праймеры

Название гена	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>GAPDH</i>	CCATGTCGTCATGGGTGTG	GGTGCTAAGCAGTTGGTGGTG
<i>HPRT</i>	ACCAGGTTATGACCTTGATT	AAGTTGGCCTAGTTTATGTT
<i>YAP</i>	AGAGAATCAGTCAGAGTGCTCCA	TTCAGCCGCAGCCTCTCC
<i>TAZ</i>	GGCAATGATTAAACTGGCAACA	AGTGAGCCCTTTCTAACCTGG
<i>CTGF</i>	TGTGCACCGCCAAAGATG	CAGACGAACGTCCATGCTG
<i>CYR61</i>	AAGGAGGCCGTCCTGGTC	GGGCTGCATTCCTCTGTGT
<i>EDA-FN</i>	CCCTAAAGGACTGGCATTCA	CATCCTCAGGGCTCGAGTAG
<i>CD26</i>	AGAAGGAGTATTCAATAAGTGGGAC	TACTCTGCTCTGTGGTGGTCT
<i>COL1</i>	AGAAAGGGGTCTCCATGGTG	AGGACCTCGGCTTCCAATAG
<i>COL3</i>	CCAGGAGCTAACGGTCTCAG	TGATCCAGGGTTTCCATCTC

Таблица 2. Используемые в работе антитела

Антитела	Производитель, кат. номер	Разведение	Флюорофор
Первичные IgG крысы к BrdU	Abcam, ab6326	1/100	–
Первичные IgG козы к Sm22α	Abcam, ab10135	1/100	–
Первичные IgG кролика к YAP1	Abcam, ab52771	1/100	–
Первичные IgG кролика к YAP1	Cell Signaling Technology, D8H1X	1/100	–
Первичные IgG кролика к коллагену I + III	Имтек, RAP c13	1/20	–
Первичные IgG козы к Р-кадгерину	R&D Systems, AF761	1/20	–
Первичные IgG крысы к E-кадгерину	Abcam, ab11512	1/20	–
Вторичные IgG осла против IgG кролика	Invitrogen, 32790	1/1000	Alexa 488
Вторичные IgG осла против IgG козы	Life Technologies, A11056	1/1000	Alexa 546
Вторичные IgG козы против IgG крысы	Life Technologies, A11081	1/1000	Alexa 546

Далее, клетки осаждали и ресуспендировали осадок в 0,5 мл DPBS, содержащем 10 мкг/мл РНКазы А («Fermentas», Канада) и 20 мкг/мл раствора пропидий йодида («Sigma-Aldrich»), и инкубировали в течение 30 мин в темноте. Окрашивание проводили с надлежащими контролями вторичных антител и неокрашенными клетками. Проточную цитометрию проводили с использованием проточного цитометра Attune® NxT.

Иммунофлуоресцентное окрашивание коллагеновых гелей. Препараты фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (PFA) («Sigma-Aldrich») в течение 40 мин, далее однократно промывали DPBS и пермеабелизовали в растворе

DPBS, содержащем 1% Tween 20, 1% Triton X-100, 5% BSA, в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее, вносили раствор первичных антител в соответствующих концентрациях (табл. 2) и инкубировали в течение 12 ч при температуре +4 °С. Далее, образцы промывали пермеабелизирующим раствором в течение 2 ч, после чего вносили соответствующие вторичные антитела, конъюгированные с флюорофорами (табл. 2), и инкубировали в течение 12 ч при температуре +4 °С. Ядра окрашивали DAPI («Biotium», США) в концентрации 1 мкг/мл. Фотосъемку и исследования препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus IX 73 («Olympus», Япония).

Хирургические операции. В работе использовали 24 самца мышей линии C57Bl6 в возрасте 8 недель. Все манипуляции с животными проводили под общей анестезией в соответствии с Международными руководящими принципами биомедицинских исследований с участием животных [21]; строго соблюдались этические принципы Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых в экспериментальных и других конкретных целях [22]. Животных содержали со свободным доступом к пище и воде.

Мыши были разделены на следующие группы: «Контроль» ($n = 6$), «ВП» ($n = 6$), «Гель» ($n = 6$) и «Гель + ВП» ($n = 6$). Животных наркотизировали изофлураном («ВетФарм», Россия). Между лопаток шерсть удаляли, операционное поле дезинфицировали 70%-ным спиртом. В область операции инъецировали раствор кетопрофена 50 мг/мл («Эллара», Россия). В коже вырезали круглое полнослойное отверстие диаметром 5 мм. Для предотвращения быстрой контракции ран выполняли наложение силиконовой шины в форме кольца, соответствующего размеру раны, подклеивали шину клеем БФ-6 («Тульская Фармацевтическая фабрика», Россия) и закрепляли по периметру, делая 8 хирургических швов нерассасывающейся нитью («Resolon», Германия). Рану промывали, в экспериментальных группах вносили в раны 250 мкл коллагенового геля (группа «Гель»), 100 мкл раствора ВП с концентрацией 1 мг/мл в PBS (группа «ВП») и 250 мкл коллагенового геля с ВП (группа «Гель + ВП» из расчета 100 мкг ВП на мыш). В группе «Контроль» в рану капали 100 мкл раствора PBS с добавлением DMSO (разведение 1/1). Сверху на рану накладывали пластырь Tagaderm film («3М», Германия) и закрепляли все лейкопластырем («Omniplast», Германия).

Коллагеновый гель для внесения в рану готовили, как и для культивирования фибробластов. Гель вносили в лунки 48-луночного планшета («Corning») по 250 мкл и инкубировали при температуре 37 °C для полимеризации.

Состояние ран у животных проверяли через день, при необходимости шинирующее кольцо дополнительно подшивали. Фотографирование ран проводили один раз в 7 дней.

Через 3 дня в раны мышей повторно вносили все вышеперечисленные агенты. На 21 день животные были выведены из эксперимента, у всех была взята некропсия на всю толщину кожи из области раны диаметром 7–8 мм.

Подготовка биопсий ран и гистологическое окрашивание. Биопсии ран заключали в среду Tissue-Tek («Sakura», Япония) и формировали криоблоки, инкубируя образцы сначала в парах азота, затем – погружая в жидкий азот несколько раз по 3–5 с до полной заморозки; хранили при –70 °C.

Криосрезы толщиной 8 мкм получали на криостате Leica CM1950 («Leica», Германия).

Срезы фиксировали в 4%-ном PFA, окрашивали гематоксилин-эозином («BioVitrum», Россия), согласно инструкции производителя, и заключали в среду Bio Mount («BioOptica», Италия). Съемку окрашенных препаратов проводили на микроскопе Keyence BZ-9000 («Keyence», Япония).

Для иммунофлуоресцентного анализа срезы фиксировали в 4%-ном PFA, инкубировали с раствором первичных антител с добавлением 5% BSA, 1% Triton X-100, 1% Tween 20 в течение 18 ч, промывали от первичных антител в DPBS и инкубировали с раствором вторичных антител в течение 1,5 ч. Съемку проводили на микроскопе Leica Thunder («Leica»). Список использованных антител и концентрации приведены в табл. 2.

Анализ архитектуры коллагеновых волокон. Архитектуру коллагеновых волокон анализировали на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином. Дерму в области раны фотографировали на увеличении 40×, полученные фотографии анализировали при помощи алгоритмов CurveAlign и CT-FIRE [23, 24].

Алгоритм CurveAlign анализирует степень выравнивания коллагеновых волокон на изображении и конструирует тепловую карту выравнивания волокон; CT-FIRE использует курвлет-преобразование для подавления шума в изображении и определения границ коллагеновых волокон, а затем извлекает и анализирует индивидуальные параметры каждого коллагенового волокна (длина, ширина, прямизна, угол) [23, 24]. Полученные данные статистически обрабатывали.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 9. Перед выбором статистического критерия выборку проверяли на нормальность (критерий Шапиро–Уилка, тест Колмогорова–Смирнова, обобщенный тест Д’Агостино–Пирсона, критерий Андерсона–Дарлинга). В случае соответствия распределения данных в выборке нормальному наличие отличий между группами выявляли при помощи однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Тьюки на множественные сравнения или, при необходимости, двухфакторным дисперсионным анализом, дополненным тестом Шидака для парных сравнений. При отклонении гипотезы о нормальности распределения наличие отличий между группами выявляли при помощи критерия Краскелла–Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения. При анализе данных определяли наличие выбросов при помощи Q-критерия Диксона.

Данные, полученные при помощи алгоритмов анализа архитектуры коллагеновых волокон, обрабатывали в программе OriginPro 2022. На основе

результатов, полученных с использованием этих алгоритмов, был выполнен анализ главных компонент. На графиках изображена 95%-ная доверительная область для каждой группы данных. Для определения наличия сходных групп данных проводили кластерный анализ методом k-средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ВП на жизнеспособность нормальных и рубцовых фибробластов. На первом этапе работы мы оценили влияние ВП на жизнеспособность нормальных и рубцовых фибробластов кожи человека. Для этого клеточную культуру обрабатывали раствором ВП в течение 24 ч, далее, оценивали количество живых и гибнущих клеток

при помощи окрашивания пропидий йодидом и аннексином V на 1, 3 и 5 сутки (рис. 1, а и б). Живые клетки определяли по отсутствию окрашивания пропидий йодидом и аннексином V. Уровень пролиферации оценивали путем подсчета количества клеток, включивших метку BrdU (рис. 1, в).

Мы не обнаружили статистически значимых изменений количества живых/гибнущих клеток после воздействия. Однако ВП значительно снижал пролиферацию как в нормальных, так и в рубцовых фибробластах через 1 день после обработки. Через 3 дня после обработки уровень пролиферации между контрольными (норма, рубец) и экспериментальными (норма + ВП, рубец + ВП) группами отличался не настолько значимо, хотя наблюдалась тенденция к снижению. На пятый

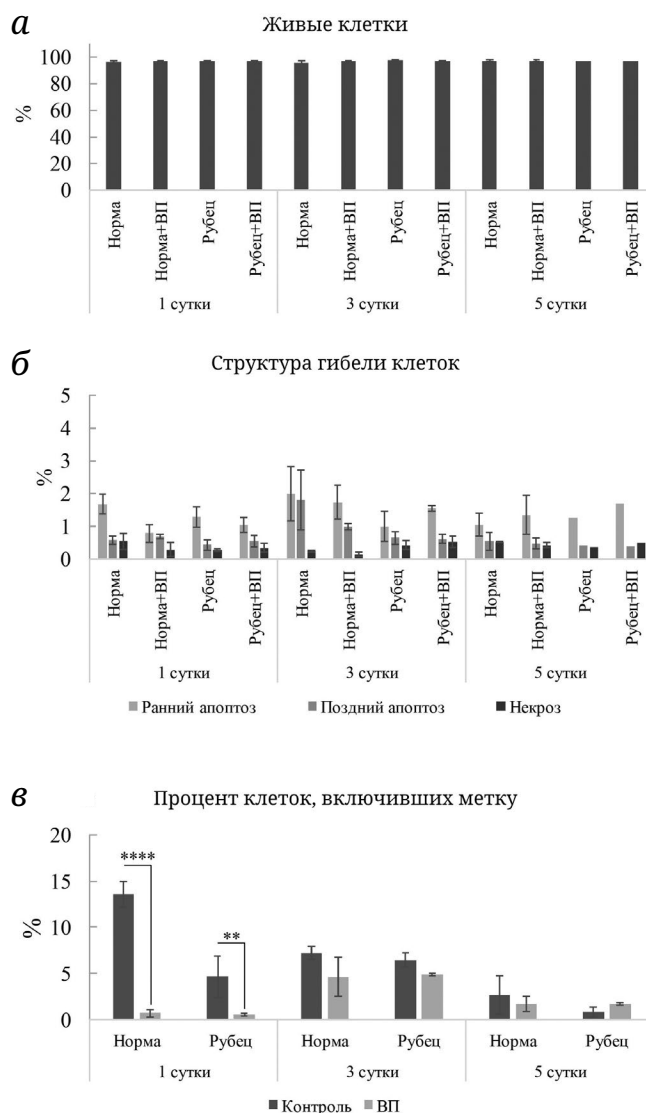


Рис. 1. Оценка гибели и пролиферации разных типов фибробластов (норма и рубец) под воздействием ВП. а – Доля живых клеток после обработки ВП. б – Доля гибнущих клеток после обработки ВП. в – Количество пролиферирующих клеток. Данные на графиках представлены в виде среднего с разбросом в виде стандартного отклонения. Статистически значимые отличия: ** $p \leq 0,01$ и **** $p \leq 0,0001$

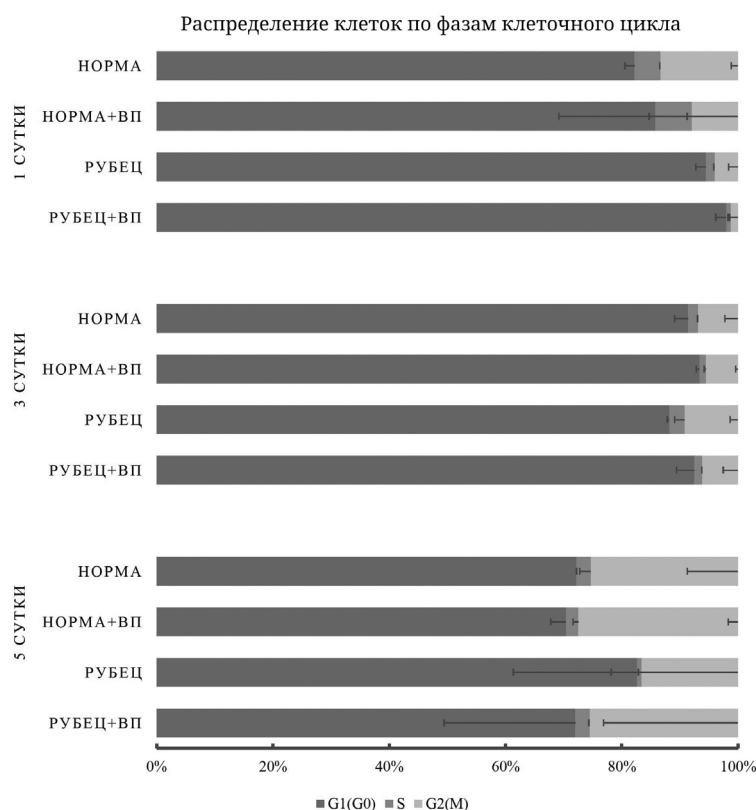


Рис. 2. Анализ клеточного цикла нормальных (норма) и рубцовых (рубец) фибробластов после воздействия ВП. Данные на графиках представлены в виде среднего с разбросом в виде стандартного отклонения

день у фибробластов рубца наблюдалась тенденция к повышению уровня пролиферации в группе «ВП» по сравнению с контрольной. Интересно отметить, что пролиферация снижается в группах без воздействия ВП от 1 до 5 дня. Это связано с контактным ингибированием по мере достижения клеточной культурой конфлуэнтного монослоя. Поскольку анализ не выявил отличий в гибели клеток, но определил изменения в пролиферации, мы провели анализ клеточного цикла (рис. 2).

Статистически значимых изменений в распределении клеток по стадиям цикла после воздействия ВП выявлено не было. Тем не менее данная диаграмма позволяет сделать предположение, что снижение пролиферации происходит из-за задержки в фазе G1.

Влияние ВП на поведение дермальных фибробластов в коллагеновом геле. Фибробласты, помещенные в коллагеновый гель, в течение суток вытягиваются в толще геля, образуя контакты с фибриллами коллагена, и уже через сутки культивирования приобретают вытянутый фенотип, характерный для этого типа клеток в норме в структуре соединительной ткани. В это же время фибробласты начинают активно сокращать гель. Инкубирование в присутствии 0,1 мкг/мл ВП проводили в течение 24 ч в половине приготовленных гелей, в качестве контроля использо-

вали культуральную среду с добавлением ДМСО. Оценку размера геля проводили на 3, 5 и 7 сутки после воздействия (рис. 3, а). Результаты анализа показали, что ВП значительно снижает степень сокращения коллагенового геля в обеих исследуемых типах фибробластов. Фибробласты рубца сохранили свои фибротические свойства при культивировании и сокращали гель в большей степени в сравнении с нормальными фибробластами. Анализируемые гели визуально содержали равное количество клеток, следовательно, интенсивность сокращения определялась характеристиками фибробластов.

Исследовали иммунофлуоресцентным методом экспрессию Sm22α, одного из характерных маркеров миофибробластов, обеспечивающего их сокращающие способности [25–27]. Также оценили экспрессию элементов сигнального пути YAP1, поскольку ВП является ингибитором этого каскада [28, 29] (рис. 3).

Рубцовые фибробласты содержали большую долю клеток, положительных по Sm22α, особенно это отличие становилось выраженным на 5 сутки. ВП значительно снижал экспрессию Sm22α в обеих исследуемых группах. Экспрессия YAP1 после воздействия ВП также снижалась на 3 и 5 сутки. На 3 сутки в культурах, обработанных ВП, были обнаружены клетки, не содержащие ядерной фор-

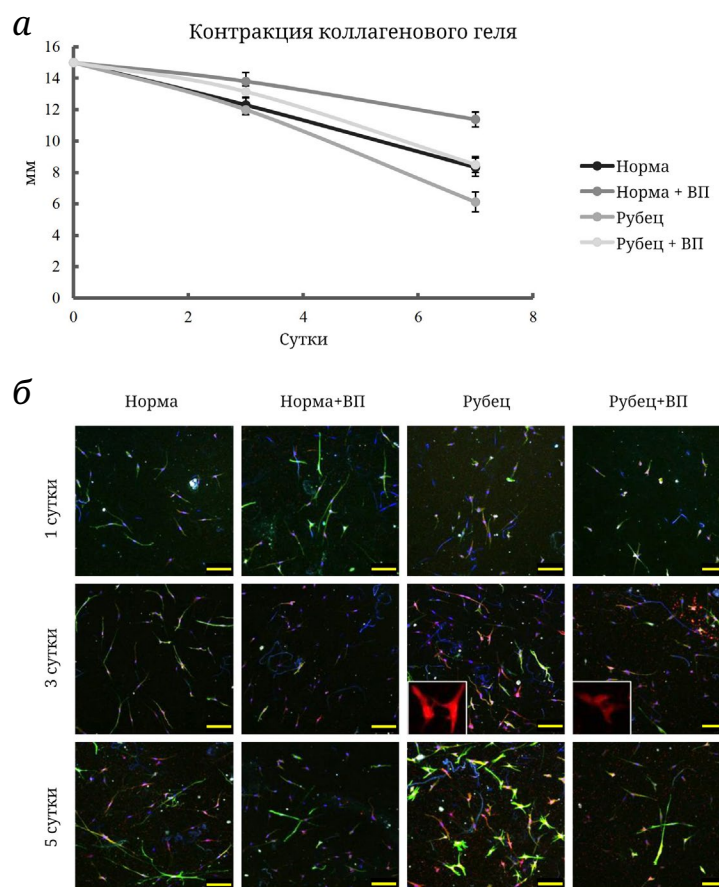


Рис. 3. Влияние воздействия ВП на сокращающиеся способности и фенотип разных типов фибробластов (норма и рубец) в коллагеновом геле. *а* – Динамика сокращения коллагеновых гелей. *б* – Иммунофлуоресцентное выявление Sm22α (зеленое окрашивание) и YAP1 (красное окрашивание). На вставках крупно показаны клетки с цитоплазматической локализацией YAP1. Ядра докрашены DAPI. Конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок – 100 мкм

мы YAP1. На 5 сутки все культуры снова содержали клетки с ядерной активной формой YAP1 (рис. 3, б).

Экспрессию маркеров миофибробластов, белков внеклеточного матрикса: коллагенов I и III типов (COL1, COL3) и фибронектина, содержащего экстра-домен A (EDA-FN), а также CD26, оценивали на 5 сутки после воздействия ВП на фибробласты в коллагеновом геле (рис. 4). На этом же сроке были исследованы YAP1 и его паралог TAZ, поскольку повышение их экспрессии происходит в ходе регенерации кожи и при формировании гипертрофических рубцов, и их типичные мишени CTGF и CYR61. Анализ данных, полученных методом ПЦР в реальном времени, не выявил статистически значимых отличий в группах фибробластов, подвергавшихся воздействию ВП. Однако разница между фибробластами нормальной кожи и фибробластами рубца была статистически значимой (рис. 4).

Влияние ВП на морфологию кожи в ходе посттравматической регенерации. ВП вносили мышам после создания шинированной раны в составе коллагенового геля или в растворе на ранних этапах ранозаживления. Протокол был осно-

ван на ранее опубликованных работах, в которых описано однократное внесение ВП в область раны [17, 18, 20]. Раны фотографировали один раз в 7 дней для оценки скорости их закрытия (рис. 5, а).

Большая часть ран полностью закрылась на 14 день. На 22 послеоперационный день зажившая область была уже визуально неотличима от нормальной кожи (рис. 5, а и б). Наиболее выраженные отличия в скорости закрытия ран наблюдали на седьмой день после операции. Раны, заживающие в присутствии коллагенового геля (группы «Гель» и «Гель + ВП»), в течение первой недели закрывались медленнее по сравнению с группами без геля («Контроль» и «ВП») (рис. 5, в). При этом не было выявлено отличий в скорости заживления раны в присутствии ВП («Гель + ВП» и «ВП») от соответствующей группы мышей без ВП («Гель» и «Контроль») (рис. 5, б и в).

При гистологическом исследовании криосрезов кожи обнаружили уменьшение толщины дермы (рис. 5, д) в группе «ВП». Толщина эпидермиса (рис. 5, г) в области раны при этом не различается между группами.

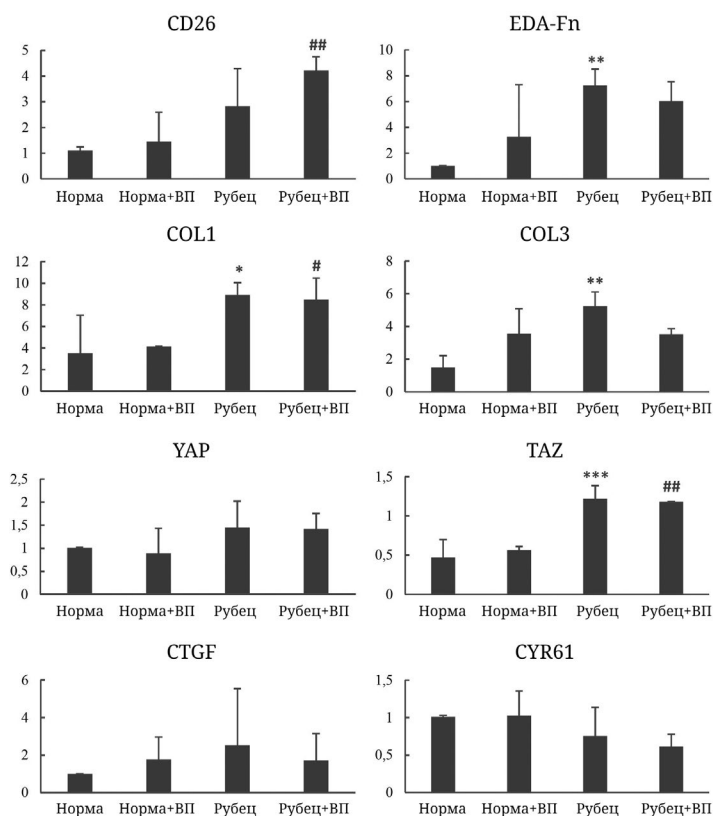


Рис. 4. Количественный ПЦР-анализ фибротических маркеров, экспрессируемых фибробластами разных типов (норма и рубец) в коллагеновом геле на 5 сутки после воздействия ВП. Графики представлены в виде среднего с разбросом в виде стандартного отклонения. Результаты нормировали на уровень экспрессии GAPDH. Статистически значимое отличие рубца от нормы: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Статистически значимое отличие от группы «Норма + ВП»: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$

Иммунофлуоресцентный анализ выявил уменьшение содержания коллагенов I + III в группе «ВП» (рис. 6). Несмотря на свойство ВП ингибировать сигнальный каскад YAP1 [28, 29], активная ядерная форма этого белка была выявлена в одинаковой степени во всех образцах в дерме, а также в части клеток базального слоя эпидермиса независимо от присутствия ВП.

Для анализа состояния регенерирующей дермы на 22 послеоперационный день проводили анализ коллагеновых волокон в гистологических препаратах кожных ран при помощи алгоритмов CT-FIRE и CurveAlign (рис. 7, а). Увеличение длины, ширины и выпрямленности индивидуальных волокон, а также степени выравнивания коллагеновых волокон друг относительно друга свойственно коже с выраженным фиброзом и говорит о замедлении процесса ремоделирования. Значительное отклонение от контрольной группы характеризует ход регенерации кожи как патологический.

Данные, полученные при помощи CurveAlign и CT-FIRE, обрабатывали с использованием анализа главных компонент для уменьшения размерности. Значительных различий в морфологии коллагена между группами «Контроль» и «ВП» после оценки всех параметров выявлено не было (рис. 7, б и в).

Как среди образцов группы «Контроль», так и среди образцов из группы «ВП» присутствовали более выпрямленные длинные волокна, которые могут быть характерны для фиброзной стадии нормального раневого заживления [30]. Такие образцы с более выраженным фибротическим фенотипом формировали отдельный кластер (рис. 7, б; Кластер 1).

При внесении ВП в составе коллагенового геля (группа «Гель + ВП») наблюдали увеличение ширины, длины, выпрямленности и степени выравнивания коллагеновых волокон по сравнению с ранами, куда вносили просто коллагеновый гель (группа «Гель»; рис. 7, г и д).

При совмещении четырех групп в общем пространстве главных компонент (рис. 7, е и ж) группы «Контроль», «ВП» и «Гель» практически не разделяются, при этом группа «Гель + ВП» наиболее отклоняется от остальных. Большая часть наблюдений из группы «Гель + ВП» попадает в отдельный кластер (рис. 7, е; Кластер 1). Коллагеновые волокна из этого кластера характеризуются большей длиной, шириной, выпрямленностью и степенью выравнивания, что может свидетельствовать о большей степени фибротических изменений в дерме.

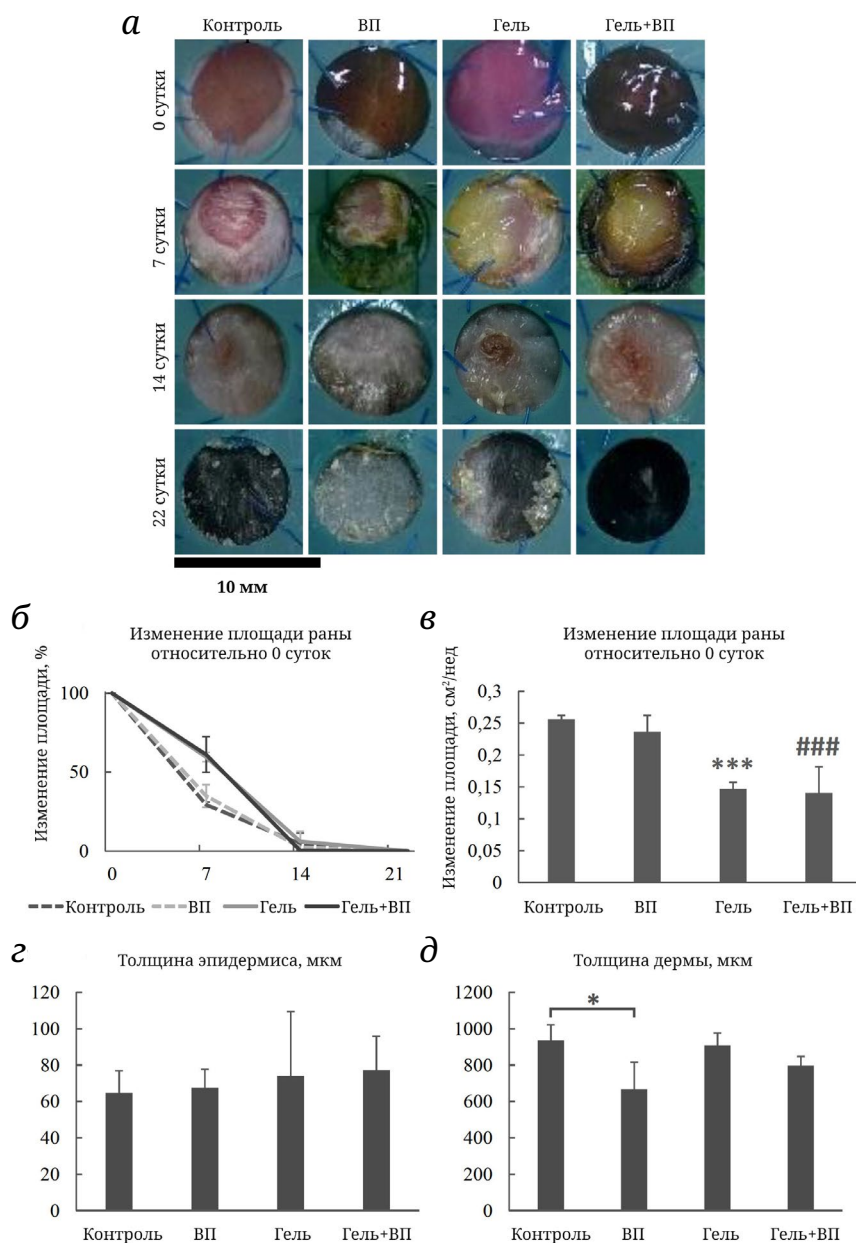


Рис. 5. Анализ динамики ранозаживления на основании морфометрических параметров. *а* – Внешний вид раны в разных группах на 0, 7, 14 и 22 послеоперационный день; *б* – динамика закрытия ран в течение 22 дней эксперимента; *в* – скорость закрытия раны за первую неделю. *** $p < 0,001$ относительно контрольной группы; ### $p < 0,001$ относительно группы «ВП». *г* – Измерение толщины эпидермиса в области раны. *д* – Измерение толщины дермы в области раны, * $p < 0,05$. Данные на графиках представлены в виде среднего с разбросом в виде стандартного отклонения

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе работы оценили потенциальное влияние ВП в составе коллагенового геля на механизмы посттравматической регенерации кожи.

Сохранение рубцовыми фибробластами фибротических свойств при культивировании подтверждается иммуногистохимическим окрашиванием (рис. 3, б) и количественным ПЦР-анализом (рис. 4), которые указывают на значительно более высокую экспрессию маркеров миофибробластов

в сравнении с контрольной группой. Механизм действия ВП в ране мыши связывают с элиминированием миофибробластов, положительных по Engrailed 1 и CD26, из области повреждения посредством ингибирования сигнального каскада YAP/TAZ [18, 20, 29]. *In vitro* мы показали, что ВП не вызывает гибель клеток, в том числе изолированных из рубца и имеющих выраженный фибротический фенотип. ВП снижает пролиферацию в первые сутки, после чего ее уровень восстанавливается до контрольных значений (рис. 1), следова-

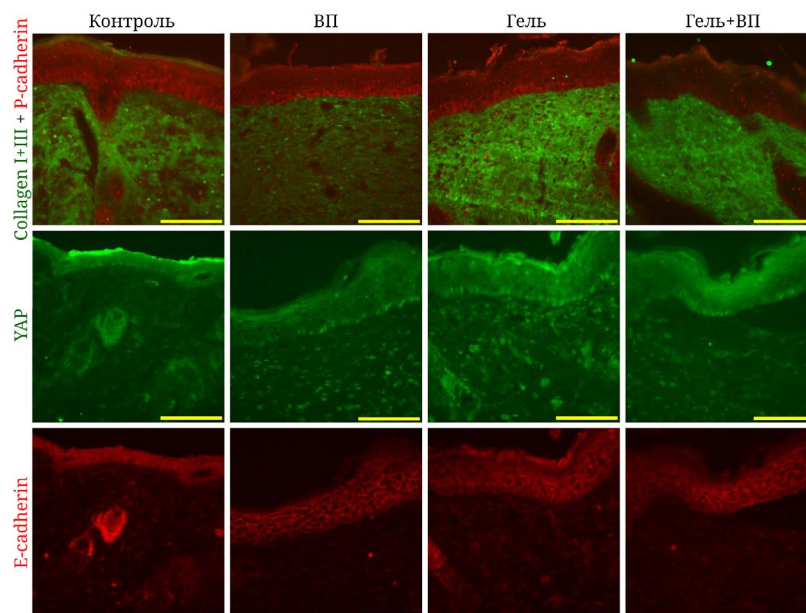


Рис. 6. Иммунофлуоресцентное выявление маркеров раневого заживления: коллагенов I + III, Р-кадгерина, Е-кадгерина, YAP на срезах кожных ран мышей на 22 послеоперационный день в разных группах. Флуоресцентная микроскопия. Масштабный отрезок – 100 мкм

тельно, воздействие ВП приводит к исчезновению миофибробластов не в результате их гибели, а путем смены профиля экспрессии фибротических маркеров на типичные для кожи в нормальном состоянии.

ВП значительно снижает сокращающиеся свойства фибробластов (рис. 3, а). Это сопряжено с уменьшением доли клеток, положительных по экспрессии сократительного белка Sm22 α , уже на 3 сутки после воздействия ВП (рис. 3, б).

Именно на этом сроке мы обнаружили клетки, не содержащие активной ядерной формы белка YAP1. На 5 день мы проанализировали профиль экспрессии специализированных маркеров миофибробластов методом количественного ПЦР-анализа (рис. 4). К данному сроку мы не наблюдали статистически значимых отличий между группами с воздействием и без воздействия ВП по экспрессии как белков внеклеточного матрикса, так и других фибротических маркеров, CD26 и белков YAP/TAZ. Восстанавливалась активность сигнального каскада YAP1, о чем свидетельствует отсутствие отличий в экспрессии его типичных мишеней CTGF и CYR61. Таким образом, ВП оказывал наиболее выраженное влияние на фибробласты дермы в культуре именно на ранних сроках, подавляя экспрессию сократительных белков, что приводило к снижению контракции до 7 суток, тем самым пролонгируя его антифибротическое действие.

Ранозаживление у мышей значительно отличается от процессов, протекающих у человека [31]. В коже мыши более выражена контракция, за счет

которой даже обширные раны смыкаются за считанные дни. Мы использовали модель шинированной раны для предотвращения контракции, что сближает процесс регенерации кожи мыши с аналогичным у человека [32]. ВП вносили в рану самостоятельно и в коллагеновом геле. Оценивали состояние регенерирующей кожи на 22 день на стадии ремоделирования для детальной характеристики процесса.

На ранних этапах коллагеновый гель замедлял процесс закрытия раны, однако с 14 суток область повреждения сокращалась с одинаковой интенсивностью независимо от принадлежности к определенной группе (рис. 5). В дерме и эпидермисе на 22 сутки был выявлен ядерный YAP1, что указывает на восстановление активности его сигнального каскада (рис. 6). Добавление ВП и коллагенового геля отдельно и совместно не приводило к изменению большинства морфологических параметров кожи, однако ВП, вносимый в рану отдельно, снижал толщину дермы регенерирующей кожи (рис. 5) и интенсивность экспрессии в ней коллагена I и III типов (рис. 6), что указывает на его противорубцовое воздействие [33]. Для оценки проявления фибротических признаков в ходе регенерации кожи мы использовали современные протоколы компьютерного анализа морфометрических параметров сформированных волокон внеклеточного матрикса [23, 24]. Внесение ВП в составе коллагенового геля (группа «Гель + ВП») приводило к формированию волокон с большей длиной, шириной, выпрямленностью (рис. 7, б и в). Формирование подобных волокон свидетельствует о приобретении

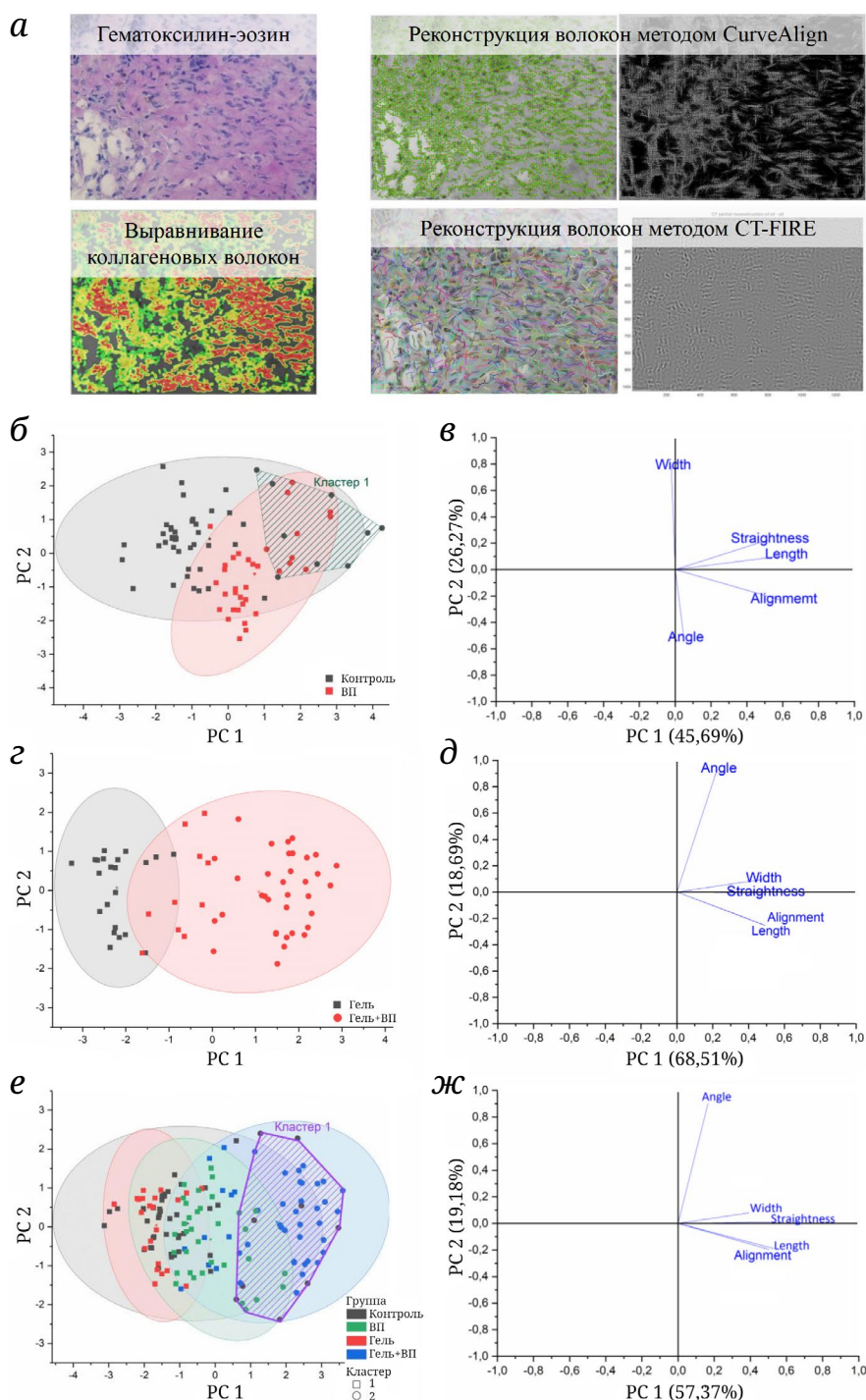


Рис. 7. Цифровой анализ коллагеновых волокон на гистологических препаратах кожных ран мышей на 22 послеоперационный день. *а* – Визуализация этапов анализа структуры коллагеновых волокон на гистологических препаратах с использованием тепловых карт, построенных при помощи алгоритмов CT-FIRE и CurveAlign. *б* – Анализ главных компонент на основе данных CT-FIRE и CurveAlign для групп «Контроль» и «ВП». *в* – Направления исходных осей координат в пространстве главных компонент. *г* – Анализ главных компонент на основе данных CT-FIRE и CurveAlign для групп «Гель» и «Гель + ВП». *д* – Направления исходных осей координат в пространстве главных компонент. *е* – Анализ главных компонент на основе данных CT-FIRE и CurveAlign для всех экспериментальных групп. *ж* – Направления исходных осей координат в пространстве главных компонент

фибротической направленности у процесса раназаживания [34]. При этом в группах «ВП» и «Гель» не наблюдалось статистически значимых

отличий от группы «Контроль» при рассмотрении комплекса признаков, характеризующих морфологию коллагеновых волокон. Хотя ВП и коллагене-

новый гель не меняют морфологию коллагеновых волокон, важно, что их применение не приводит к активации фиброза. Таким образом, несмотря на положительный эффект от добавления ВП, его сочетание с коллагеновым гелем патологически сказывалось на процессах регенерации. В отличие от проведенной нами работы, успешного внесения ВП в составе специализированных носителей добивались, только если носители представляли собой не единый пласт, закрывающий область раны, а микрочастицы, содержащие ВП [12, 14, 15]. Наш результат может быть обусловлен разными механизмами, за счет которых коллагеновый гель и ВП влияют на ранозаживление. ВП модулирует поведение фибробластов, препятствуя контракции коллагенового геля (рис. 3, а) и уменьшая экспрессию фибротических маркеров (рис. 4). Коллагеновый гель, в свою очередь, стимулирует более интенсивное формирование грануляционной ткани, за счет чего ускоряется процесс регенерации [35, 36]. Вероятно, ВП ингибировал формирование пула миофибробластов, что при добавлении коллагена замедлило стадию пролиферации и ремоделирования и стало причиной наблюдаемых фибротических проявлений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка тканеинженерных конструкций, стимулирующих процессы ранозаживления, но не приводящих к появлению рубцов, актуальна для пациентов с ожоговыми поражениями кожи, а также при других патологиях. ВП является одним из наиболее перспективных противофибротических препаратов, поэтому рассматривается возможность добавления его в состав терапевтических средств, стимулирующих процессы регенерации [18, 20, 29]. Коллагеновые гели также применяются для закрытия кожных ран [6–8]. В нашем исследовании при комбинировании коллагенового геля и ВП фибротические проявления в ране усиливались. Таким образом, исследованный нами вариант внесения ВП в область раны не позволяет ускорить регенерацию, а значит, возможные носители ВП для терапии ранозаживления требуют дальнейшего изучения. Применение конструкций, содержащих дермальные фибробласты и эпидермальные кератиноциты, стимулировало процессы регенерации кожи более эффективно в сравнении с применением только носителя [37], поэтому добавление клеточного компонента позволило бы оптимизировать свойства геля, сохранив регенеративный потенциал. Как показали проведенные нами исследования *in vitro*, ВП не вызывал клеточную гибель, но предотвращал фибротические

изменения в клеточном компоненте в составе коллагенового геля. Следовательно, дермальные фибробласты в составе носителей после воздействия ВП могут сохранять нормальный фенотип и после трансплантации в область повреждения. Эту возможность стоит проанализировать в будущих исследованиях, как и оптимизацию состава специализированного носителя.

Вклад авторов. О.С. Роговая, Д.С. Аболин, Е.П. Калабушева отвечали за проведение экспериментов *in vitro*; А.Д. Смыслов – постановка количественного ПЦР-анализа; О.С. Роговая, Д.С. Аболин, О.Л. Черкашина, Е.П. Калабушева – проведение экспериментов на лабораторных животных; О.Л. Черкашина – биоинформатический анализ распределения волокон внеклеточного матрикса в области повреждения; О.С. Роговая, Е.А. Воротеляк, Е.П. Калабушева – разработка дизайна исследования; О.С. Роговая, О.Л. Черкашина, Е.П. Калабушева – подготовка текста статьи; Е.А. Воротеляк – редактирование текста.

Финансирование Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30015). Ссылка на информацию о проекте: <https://rscf.ru/en/project/21-74-30015/>.

Благодарности. Использованные в работе клеточные линии были предоставлены УНУ «Коллекция клеточных культур» ЦКП ИБР РАН. Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья содержит описание исследований влияния ВП на процессы посттравматической регенерации кожи с использованием лабораторных мышей в качестве объектов. Все процедуры, выполненные в исследованиях с использованием животных, соответствовали этическим стандартам ИБР РАН (протокол № 74 от 14.09.23), в котором проводились исследования, и в соответствии с Международными руководящими принципами биомедицинских исследований с участием животных [21]; строго соблюдались этические принципы Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых в экспериментальных и других конкретных целях [22]. Настоящая статья содержит описание экспериментов, выполненных на первичных линиях фибробластов, полученных из биоптатов кожи, оставшихся в качестве биоотходов в результате реконструктивных операций и использованных для выделения клеток с информированного согласия доноров в соответствии с протоколом, одобренным Комиссией по биоэтике ИБР (протокол № 51 от 09.09.2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cañedo-Dorantes, L., and Cañedo-Ayala, M. (2019) Skin acute wound healing: a comprehensive review, *Int. J. Inflamm.*, 3706315, <https://doi.org/10.1155/2019/3706315>.
2. Xue, M., and Jackson, C. J. (2015) Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring, *Adv. Wound Care*, **4**, 119-136, <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>.
3. Karppinen, S.-M., Heljasvaara, R., Gullberg, D., Tasanen, K., and Pihlajaniemi, T. (2019) Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring, *F1000Res.*, **8**, 787, <https://doi.org/10.12688/f1000research.18293.1>.
4. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R. A. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 349-363, <https://doi.org/10.1038/nrm809>.
5. Eudy, M., Eudy, C. L., and Roy, S. (2021) Apligraf as an alternative to skin grafting in the pediatric population, *Cureus*, **13**, e16226, <https://doi.org/10.7759/cureus.16226>.
6. Dibbs, R. P., Depani, M., and Thornton, J. F. (2022) Technical refinements with the use of biologic healing agents, *Semin. Plast. Surg.*, **36**, 008-016, <https://doi.org/10.1055/s-0042-1742749>.
7. El Masry, M. S., Chaffee, S., Das Ghatak, P., Mathew-Steiner, S. S., Das, A., Higueta-Castro, N., Roy, S., Anani, R. A., and Sen, C. K. (2019) Stabilized collagen matrix dressing improves wound macrophage function and epithelialization, *FASEB J.*, **33**, 2144-2155, <https://doi.org/10.1096/fj.201800352R>.
8. Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., and Berthod, F. (2010) Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications, *Materials*, **3**, 1863-1887, <https://doi.org/10.3390/ma3031863>.
9. Mouw, J. K., Ou, G., and Weaver, V. M. (2014) Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 771-785, <https://doi.org/10.1038/nrm3902>.
10. Hynes, R. O. (2014) Stretching the boundaries of extracellular matrix research, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 761-763, <https://doi.org/10.1038/nrm3908>.
11. Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., and Sen, C. K. (2021) Collagen in wound healing, *Bioengineering*, **8**, 63, <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>.
12. Zhang, Y., Wang, Y., Li, Y., Yang, Y., Jin, M., Lin, X., Zhuang, Z., Guo, K., Zhang, T., and Tan, W. (2023) Application of collagen-based hydrogel in skin wound healing, *Gels*, **9**, 185, <https://doi.org/10.3390/gels9030185>.
13. Potter, D. A., Veitch, D., and Johnston, G. A. (2019) Scarring and wound healing, *Br. J. Hosp. Med. Lond. Engl.*, **80**, C166-C171, <https://doi.org/10.12968/hmed.2019.80.11.C166>.
14. Chen, K., Liu, Y., Liu, X., Guo, Y., Liu, J., Ding, J., Zhang, Z., Ni, X., and Chen, Y. (2023) Hyaluronic acid-modified and verteporfin-loaded polylactic acid nanogels promote scarless wound healing by accelerating wound re-epithelialization and controlling scar formation, *J. Nanobiotechnol.*, **21**, 241, <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02014-x>.
15. Wei, C., You, C., Zhou, L., Liu, H., Zhou, S., Wang, X., and Guo, R. (2023) Antimicrobial hydrogel microneedle loading verteporfin promotes skin regeneration by blocking mechanotransduction signaling, *Chem. Eng. J.*, **472**, 144866, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.144866>.
16. Zhang, C., Yang, D., Wang, T.-B., Nie, X., Chen, G., Wang, L.-H., You, Y.-Z., and Wang, Q. (2022) Biodegradable hydrogels with photodynamic antibacterial activity promote wound healing and mitigate scar formation, *Biomater. Sci.*, **11**, 288-297, <https://doi.org/10.1039/D2BM01493A>.
17. Zhang, Y., Wang, S., Yang, Y., Zhao, S., You, J., Wang, J., Cai, J., Wang, H., Wang, J., Zhang, W., Yu, J., Han, C., Zhang, Y., and Gu, Z. (2023) Scarless wound healing programmed by core-shell microneedles, *Nat. Commun.*, **14**, 3431, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39129-6>.
18. Mascharak, S., Talbott, H. E., Januszyk, M., Griffin, M., Chen, K., Davitt, M. F., Demeter, J., Henn, D., Bonham, C. A., Foster, D. S., Mooney, N., Cheng, R., Jackson, P. K., Wan, D. C., Gurtner, G. C., and Longaker, M. T. (2022) Multi-Omic analysis reveals divergent molecular events in scarring and regenerative wound healing, *Cell Stem Cell*, **29**, 315-327.e6, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.12.011>.
19. Lee, M.-J., Byun, M. R., Furutani-Seiki, M., Hong, J.-H., and Jung, H.-S. (2014) YAP and TAZ regulate skin wound healing, *J. Invest. Dermatol.*, **134**, 518-525, <https://doi.org/10.1038/jid.2013.339>.
20. Mascharak, S., desJardins-Park, H. E., Davitt, M. F., Griffin, M., Borrelli, M. R., Moore, A. L., Chen, K., Duoto, B., Chinta, M., Foster, D. S., Shen, A. H., Januszyk, M., Kwon, S. H., Wernig, G., Wan, D. C., Lorenz, H. P., Gurtner, G. C., and Longaker, M. T. (2021) Preventing engrailed-1 activation in fibroblasts yields wound regeneration without scarring, *Science*, **372**, eaba2374, <https://doi.org/10.1126/science.aba2374>.
21. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985) In *The Development of Science-based Guidelines for Laboratory Animal Care: Proceedings of the November 2003 International Workshop*; National Academies Press (US), 2004.
22. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, URL: <https://www.ecolex.org/details/treaty/european-convention-for-the-protection-of-vertebrate-animals-used-for-experimental-and-other-scientific-purposes-tre-001042/> (accessed on November 26, 2023).

23. Bredfeldt, J. S., Liu, Y., Pehlke, C. A., Conklin, M. W., Szulczewski, J. M., Inman, D. R., Keely, P. J., Nowak, R. D., Mackie, T. R., and Eliceiri, K. W. (2014) Computational segmentation of collagen fibers from second-harmonic generation images of breast cancer, *J. Biomed. Opt.*, **19**, 16007, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.1.016007>.
24. Liu, Y., Keikhosravi, A., Mehta, G. S., Drifka, C. R., and Eliceiri, K. W. (2017) Methods for quantifying fibrillar collagen alignment, *Methods Mol. Biol.*, **1627**, 429-451, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_28.
25. Mussbacher, M., Salzmann, M., Brostjan, C., Hoesel, B., Schoergenhofer, C., Datler, H., Hohensinner, P., Basilio, J., Petzelbauer, P., Assinger, A., and Schmid, J. A. (2019) Cell type-specific roles of NF- κ B linking inflammation and thrombosis, *Front. Immunol.*, **10**, 85, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00085>.
26. Wnuk, D., Lasota, S., Paw, M., Madeja, Z., and Michalik, M. (2020) Asthma-derived fibroblast to myofibroblast transition is enhanced in comparison to fibroblasts derived from non-asthmatic patients in 3D *in vitro* culture due to Smad2/3 signalling, *Acta Biochim. Pol.*, **67**, 441-448, https://doi.org/10.18388/abp.2020_5412.
27. Shin, D., and Minn, K. W. (2004) The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar, *Plast. Reconstr. Surg.*, **113**, 633-640, <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000101530.33096.5B>.
28. Wang, C., Zhu, X., Feng, W., Yu, Y., Jeong, K., Guo, W., Lu, Y., and Mills, G. B. (2016) Verteporfin inhibits YAP function through Up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm, *Am. J. Cancer Res.*, **6**, 27-37.
29. Shi-wen, X., Racanelli, M., Ali, A., Simon, A., Quesnel, K., Stratton, R. J., and Leask, A. (2021) Verteporfin inhibits the persistent fibrotic phenotype of lesional scleroderma dermal fibroblasts, *J. Cell Commun. Signal.*, **15**, 71-80, <https://doi.org/10.1007/s12079-020-00596-x>.
30. El Ayadi, A., and Jay, J. W., Prasai, A. (2020) Current approaches targeting the wound healing phases to attenuate fibrosis and scarring, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1105, <https://doi.org/10.3390/ijms21031105>.
31. Zlobina, K., Malekos, E., Chen, H., and Gomez, M. (2023) Robust classification of wound healing stages in both mice and humans for acute and burn wounds based on transcriptomic data, *BMC Bioinformatics*, **24**, 166, <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05295-z>.
32. Galiano, R. D., Michaels, J., Dobryansky, M., Levine, J. P., and Gurtner, G. C. (2004) Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing, *Wound Repair Regen.*, **12**, 485-492, <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x>.
33. Ud-Din, S., Foden, P., Stocking, K., Mazhari, M., Al-Habba, S., Baguneid, M., McGeorge, D., and Bayat, A. (2019) Objective assessment of dermal fibrosis in cutaneous scarring, using optical coherence tomography, high-frequency ultrasound and immunohistomorphometry of human skin, *Br. J. Dermatol.*, **181**, 722-732, <https://doi.org/10.1111/bjd.17739>.
34. Henn, D., Chen, K., Fehlmann, T., Trotsyuk, A. A., Sivaraj, D., Maan, Z. N., Bonham, C. A., Barrera, J. A., Mays, C. J., Greco, A. H., Moortgat Illouz, S. E., Lin, J. Q., Steele, S. R., Foster, D. S., Padmanabhan, J., Momeni, A., Nguyen, D., Wan, D. C., Kneser, U., Januszyk, M., Keller, A., Longaker, M. T., and Gurtner, G. C. (2021) Xenogeneic skin transplantation promotes angiogenesis and tissue regeneration through activated Trem²⁺ macrophages, *Sci. Adv.*, **7**, eabi4528, <https://doi.org/10.1126/sciadv.abi4528>.
35. Brett, D. A (2008) Review of collagen and collagen-based wound dressings, *Wounds Compend. Clin. Res. Pract.*, **20**, 347-356.
36. Ge, B., Wang, H., Li, J., Liu, H., Yin, Y., Zhang, N., and Qin, S. (2020) Comprehensive assessment of Nile tilapia skin (*Oreochromis Niloticus*) collagen hydrogels for wound dressings, *Mar. Drugs*, **18**, 178, <https://doi.org/10.3390/md18040178>.
37. Chermnykh, E. S., Kiseleva, E. V., Rogovaya, O. S., Rippa, A. L., Vasiliev, A. V., and Vorotelyak, E. A. (2018) Tissue-engineered biological dressing accelerates skin wound healing in mice via formation of provisional connective tissue, *Histol. Histopathol.*, **33**, 1189-1199, <https://doi.org/10.14670/HH-18-006>.

***In vitro* AND *in vivo* EVALUATION
OF ANTIFIBROTIC PROPERTIES OF VERTEPORFIN
AS A COMPOSITION OF A COLLAGEN SCAFFOLD**

**O. S. Rogovaya*, D. S. Abolin, O. L. Cherkashina, A. D. Smyslov,
E. A. Vorotelyak, and E. P. Kalabusheva**

*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; e-mail: rogovaya26f@yandex.ru*

Extensive skin damage requires specialized therapy that stimulates regeneration processes without scarring. *In vivo* and *in vitro* we examined the possibility of collagen gel application as a wound dressing and fibroblast attractant in combination with verteporfin as an antifibrotic agent. *In vitro* the effects of verteporfin on viability and myofibroblast markers expression were evaluated using fibroblasts isolated from human scar tissue. *In vivo* collagen gel and verteporfin (individually and in combination) were loaded into the wound to investigate the scarring signature during skin regeneration: deviations in skin layer thickness, collagen synthesis, and extracellular matrix fiber characteristics. The results indicate that verteporfin reduces the fibrotic phenotype by suppressing the expression of the contractile protein Sm22 α without inducing cell death. However, the administration of verteporfin inside collagen gel interrupts its ability to direct wound healing in a scarless manner, which may be related to the incompatibility of the mechanisms by which collagen and verteporfin control regeneration.

Keywords: dermal fibroblasts, fibrosis, skin regeneration, verteporfin, YAP/TAZ

РАЦИОНАЛЬНАЯ РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С G-БЕЛКОМ: ПОИСК И СКРИНИНГ ЛИГАНДОВ

Обзор

© 2024 А.П. Лугинина¹, А.Н. Хныкин¹, П.А. Хорн¹, О.В. Моисеева^{1,2},
Н.А. Сафронова¹, В.А. Поспелов¹, Д.Е. Дашевский¹, А.С. Белоусов¹,
В.И. Борщевский^{1,3*}, А.В. Мишин^{1*}

¹ Московский физико-технический институт (НИУ),

141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия;

электронная почта: borshchevskiy.vi@phystech.edu; mishinalexey@phystech.edu

² ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия

³ Объединенный институт ядерных исследований, лаборатория нейтронной физики им. Франка,
141980 Дубна, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 10.01.2024

После доработки 22.02.2024

Принята к публикации 23.02.2024

Рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein-coupled Receptors, GPCR) – трансмембранные белки, участвующие в большинстве физиологических процессов и являющиеся ключевыми фармакологическими мишенями. Недавние успехи структурной биологии GPCR сделали возможной разработку лекарств на основе структуры (Structure-Based Drug Design, SBDD). SBDD использует информацию о комплексе рецептор–лиганд для поиска подходящих соединений, что позволяет расширить химическое пространство поиска без необходимости проведения экспериментального скрининга. В обзор мы включили описание виртуального скрининга лигандов, основанного на структуре мишени и описание методов функционального тестирования потенциальных лекарственных соединений. Мы также обсуждаем последние достижения в развитии подходов SBDD, применимые к GPCR, и выделяем успешные примеры их использования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: разработка лекарств, GPCR, SBVS, функциональные тесты.

DOI: 10.31857/S0320972524050158 EDN: YNNKGL

ВВЕДЕНИЕ

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), занимают отдельное место в структурной биологии. Это гептаспиральные трансмембранные белки, широко представленные в организме человека и составляющие один из крупнейших классов мембранных белков [1]. Они участвуют в передаче внеклеточного сигнала за счет связы-

вания эндогенного агониста (или при фотоактивации), а также выполняют регуляторную функцию по изменению активности других белков при взаимодействии. Природные лиганды для GPCR представляют собой широкий спектр типов химических веществ: аминокислоты и ионы, белки и пептиды, нуклеотиды и биогенные амины, биоэффektorные липиды. GPCR играют первостепенную роль в таких важных физиологических функциях

Принятые сокращения: BRET – резонансный перенос энергии биолюминесценции; FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии; GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein-coupled receptor); GRK – киназы рецепторов, сопряженных с G-белком (G protein-coupled Receptor Kinases); IP₁; IP₂; IP₃ – моно-, ди- и трифосфаты инозитола; SBDD – разработка лекарств на основе структуры (Structure-Based Drug Design); SBVS – виртуальный скрининг, основанный на структуре мишени (Structural-based Virtual Screening).

* Адресат для корреспонденции.

организма человека, как зрение, восприятие вкуса, запаха, регуляция деятельности нервной, иммунной и сердечно-сосудистой систем, поддержание гомеостаза и необходимой плотности клеток в ткани. Дисфункции рецепторов класса GPCR приводят к серьезным заболеваниям, что определяет GPCR в качестве важнейших биологических мишеней как в фундаментальных, так и в прикладных медицинских и фармацевтических исследованиях. Примерно 700 лекарственных препаратов (35% всех лекарств, одобренных Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (Food and Drug Administration, FDA)) обладают направленным действием на 108 уникальных GPCR; примерно 321 химическое соединение в настоящее время находится на стадии клинических испытаний, из них ~20% нацелены на 66 потенциально новых GPCR-мишеней, не имеющих одобренного препарата [2]. Основными болезнями, на лечение которых нацелены препараты, воздействующие на GPCR, являются: диабет, ожирение, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Альцгеймера и другие расстройства центральной нервной системы [3]. Нет никаких сомнений в том, что GPCR еще долго будут оставаться на передовой линии проектов по разработке лекарств.

Передача сигнала извне клетки рецепторами класса GPCR осуществляется в ответ на его активацию лигандом за счет изменения конформации рецептора (рис. 1). Ортостерические лиганды присоединяются в основном кармане связывания рецептора (там, где присоединяется природный лиганд), аллостерические – в дополнительных карманах и влияют на функцию рецептора независимо от основного лиганда, что увеличивает число способов фармакологического воздействия на рецептор [4]. В классическом случае активации смена конформации рецептора активирует гетеротримерные G-белки, сигнальные молекулы, получившие свое название благодаря способности присоединять и преобразовывать молекулы GTP и GDP, которые классифицируют на четыре основных семейства, согласно классу их α -субъединиц, выделенных на основе структурной гомологии, функции и типу запускаемых сигнальных путей: $G_{i/o}$, G_q , G_s и $G_{12/13}$ [5].

Помимо G-белков, существует ряд других белков-трансдюсеров, которые непосредственно взаимодействуют с GPCR, таких как β -аррестины, киназы рецепторов, сопряженных с G-белком (G protein-coupled Receptor Kinases, GRK) [6]; а также в передаче сигнала принимают участие модулирующие белки JAK (Janus Kinase) [7], RAMP (Receptor Activity Modifying Protein) [8], RGS (Regulator of G protein signaling) [9] и другие. Активированные GPCR могут подвергаться фосфорилированию GRK и другими эффекторными киназами. Паттерны

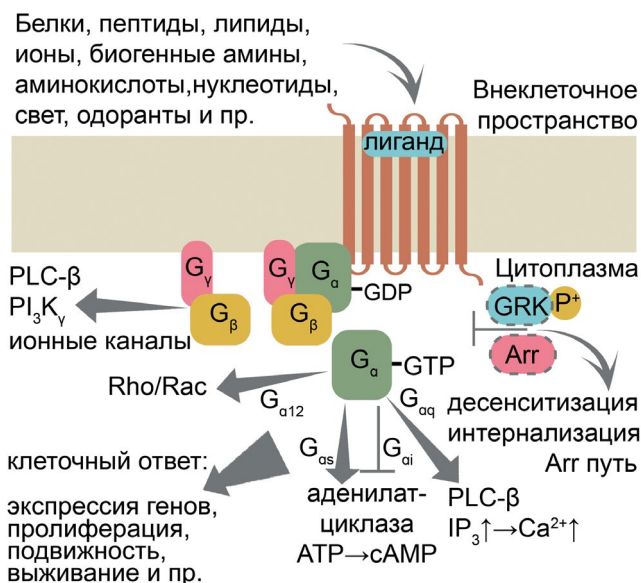


Рис. 1. Общий принцип передачи сигнала GPCR: селективный лиганд, подходя с внеклеточной стороны, активирует рецептор, который, претерпевая конформационные изменения, активирует G-белок – гетеротример, состоящий из α -, β - и γ -субъединиц. Активированный рецептор, который взаимодействует с гетеротримером как с целым, инициирует его диссоциацию, катализируя обмен GDP на GTP в нуклеотидном центре G_α -субъединицы, которая определяет дальнейший каскад реакций. Например, $G_{\alpha 12/13}$ запускает путь Rac/Rho малых GTPаз; $G_{\alpha s}$ стимулируют, а $G_{\alpha i/o}$ ингибируют аденилатциклазу, катализирующую превращение аденозинтрифосфата (ATP) в циклический аденозинмонофосфат (cAMP); $G_{\alpha q}$ стимулирует фосфолипазу C- β (PLC- β), отщепляющую от фосфатидилинозитолбифосфата (его изоформы PI-3,5-P2) инозитол трифосфат (IP₃), повышение концентрации которого приводит к высвобождению внутриклеточного кальция. Вторичные мессенджеры включают соответствующий клеточный ответ. $G_{\beta\gamma}$ -Субъединицы также запускают ряд сигнальных путей, например, взаимодействуя с ионными каналами, липидными киназами (фосфоинозитид-3-киназа- γ , PI3K γ) и фосфолипазами (PLC- β). При длительной активации рецептор может фосфорилироваться, например, GPCR-киназой (GRK), что приводит к связыванию с белком-аррестином (Arr), прекращающим G-белок-ассоциированный сигнальный путь [5]

фосфорилирования (часто в литературе называемые «баркодами») определяют передачу сигналов через аррестины того или иного типа и ее кинетических параметров [10].

Одним из важнейших явлений в функционировании GPCR является эффект функциональной селективности лигандов (или смещенного агонизма, biased signalling), который заключается в том, что конкретные лиганды (в том числе аллостерические модуляторы [11]) могут вызывать активацию или ингибирование конкретных сигнальных путей, ассоциированных с разными G-белками или аррестинами, направляя сигнальный каскад в определенное русло. Такие различия в сигнальных

путях одного и того же GPCR могут иметь важные фармакологические последствия, поскольку один сигнальный путь может быть связан с терапией заболевания, а другой – с побочными эффектами. Понимание механизмов смещенной сигнализации может помочь в разработке лигандов, которые специфически модулируют конкретные сигнальные пути, не затрагивая остальные, тем самым минимизируя побочные эффекты [12].

Общепризнано, что структурная информация о GPCR в разных конформационных состояниях необходима для понимания их функционирования [2]. Структурно-функциональные исследования различных представителей суперсемейства GPCR в настоящее время продвигаются относительно быстро, на сегодняшний день получены структуры для 165 уникальных GPCR из 876, закодированных в геноме человека (согласно данным ресурса <https://gpcrdb.org/> от 19.06.23 г.). Однако каждый новый рецептор по-прежнему представляет собой трудный объект для исследований главным образом из-за низкой стабильности, амфифильной природы и высокой конформационной подвижности. Методы экспрессии GPCR, их кристаллизации, сбора кристаллографических и крио-ЭМ-данных, равно как и биоинформатические методы поиска лигандов GPCR, а также функциональные тесты, позволяющие отобрать из предсказанных соединений потенциально лекарственные, оптимизируют и модернизируют по сей день. Так, увеличение числа структур GPCR высокого разрешения в совокупности с увеличением размера библиотек виртуальных соединений, синтез которых осуществляется «по запросу» (on-demand), приводят к нарастающему успеху кампаний по получению новых лигандов GPCR. А появление все новых способов анализа связывания этих лигандов дополняет инструментарий многоэтапной разработки лекарственных средств, направленных на GPCR, делая процесс рациональным.

Наш обзор посвящен описанию основных этапов разработки лекарств на основе их структуры (SBDD) с точки зрения структурной биологии GPCR, раскрывает особенности таких этапов, как виртуальный скрининг лигандов, основанный на структуре мишени, и определение функциональной активности GPCR *in vitro*.

ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ, ОСНОВАННЫЙ НА СТРУКТУРЕ МИШЕНИ

Виртуальный скрининг, основанный на структуре мишени (SBVS), является методом компьютерного поиска потенциально активных молекул в виртуальных библиотеках соединений, который опирается на анализ трехмерной структуры бел-

ковой мишени и особенностей ее взаимодействия с потенциальными лигандами, преимущественно на ранних этапах разработки лекарств.

Процесс SBVS обычно начинают с подготовки трехмерной структуры целевого белка, которая включает в себя добавление необходимых атомов водорода, проверку валентности атомов и кратности связей, удаление молекул воды (в случае, если эти молекулы не участвуют во взаимодействии с лигандом или используемое программное обеспечение не предусматривает их явный учет), восстановление замененных аминокислот, удаление лиганда при его наличии в исходной структуре (стоит отметить, что обычно именно холо-форма белка лучше подходит для молекулярного докинга [13]) и выделение области белка, в которой будет проводиться докинг. Также полезной может быть информация об известных лигандах, которые вместе со специально составленными неактивными соединениями (decoys) [14, 15] позволяют провести ретроспективный анализ для валидации подготовленной структуры и подбора оптимальных параметров докинга [16].

Далее выбирается виртуальная библиотека, содержащая потенциальные лиганды, которые при необходимости преобразуются в подходящий для выбранного программного пакета формат, и выполняется молекулярный докинг. В процессе молекулярного докинга лиганды из виртуальной библиотеки позиционируются в лиганд-связывающем кармане рецептора в различных конформациях. Алгоритмы докинга учитывают структуру мишени, взаимодействия между атомами и энергетические параметры системы, чтобы оценить силу связывания и предсказать аффинность лигандов. После проведения докинга лиганды ранжируют на основе показателей оценочных функций и отбирают наиболее перспективные кандидаты для дальнейших экспериментальных исследований, которые обычно включают в себя синтез и биологическую оценку активности выбранных соединений [16].

Виртуальные библиотеки соединений. Пространство лекарственно-подобных органических соединений огромно, по разным оценкам оно насчитывает от 10^{20} до более 10^{60} молекул [17]. Анализ и даже хранение такого количества виртуальных веществ в настоящее время невозможны. Например, только недавно современные вычислительные мощности и различные методы, направленные на оптимизацию вычислений, позволили преодолеть значение в 1 млрд исследуемых молекул [18].

Один из подходов к созданию баз данных с большим количеством соединений заключается в генерации теоретически синтезируемых молекул на основе определенных правил химической

стабильности. Такие базы данных содержат молекулы с ограниченным числом характерных для органических соединений не водородных атомов, таких как C, N, O, S и галогены [19, 20]. Несмотря на большое химическое разнообразие полученных соединений, пути их синтеза обычно заранее неизвестны, и, более того, некоторые молекулы оказываются слишком сложными, чтобы их можно было рассматривать для дальнейших исследований. Из-за этого применяют различные алгоритмы фильтрации и накладывают дополнительные ограничения при использовании таких виртуальных библиотек [21].

Альтернативный подход использует принцип строительных блоков (building blocks) и задает виртуальные библиотеки соединений, которые можно получить из определенных структурных единиц с использованием уже известных, проверенных реакций (combinatorial fragment spaces) [22, 23]. Такой подход обладает рядом преимуществ, включая быстрый химический синтез молекул «по запросу» (make-on-demand compounds) и выявление лигандов с «химической новизной» (т.к. метод не использует информацию об уже известных активных молекулах) [24]. Однако главным недостатком комбинаторных виртуальных библиотек является ограниченность разнообразия соединений, обусловленная использованием определенного набора реакций и конечным набором блоков [21].

Большой интерес также вызывает применение генеративных моделей глубокого обучения для расширения разнообразия виртуальных библиотек. Эти модели обучают на небольшой выборке известных молекул, представленных в виде своих молекулярных дескрипторов, включая молекулярные графы, SMILES [25] и другие [26]. На основе этих данных нейронная сеть может создать новое химическое пространство, которое будет содержать соединения, объединяющие и варьирующие особенности исходной выборки. Такой подход требует тщательного контроля как на этапе обучения модели, так и при валидации и оценке разнообразия полученных молекул [27–29]. Зато модель, обученная с использованием дополнительных входных данных об известных лигандах, затем позволяет работать с рационально составленной виртуальной библиотекой, нацеленной на белок-мишень (focused library) [30, 31].

Из-за вычислительных трудностей хранения и обработки информации крупные виртуальные библиотеки (химические пространства) иногда не имеют явного перечисления всех содержащихся в них молекул, а вместо этого задаются правилами, необходимыми для виртуального построения соединений «на лету» (on-the-fly) [16, 32, 33]. Алгоритмы поиска, сравнения и отбора молекул в та-

ких пространствах имеют особую практическую ценность. Они включают в себя: сравнительный фармакофорный анализ (например, метод FTrees (<https://www.biosolveit.de/infiniSee>)), сходство молекулярных отпечатков (например, коэффициент подобия Танимото [34]), сравнение трехмерной структуры соединений (например, алгоритм ROCS (<https://www.eyesopen.com/rocs>)) и многие другие. Такие методы в том числе позволяют создавать коллекции разнообразных химических соединений (diversity library) – небольшие виртуальные библиотеки органических молекул, представляющие разнообразие полного химического пространства или базы данных [35]. Коллекции разнообразных химических соединений широко используют для первичного виртуального скрининга и позволяют эффективно отбирать потенциальные соединения-хиты для дальнейшей оптимизации с существенной экономией вычислительных ресурсов.

Кроме перечисленных подходов для создания химических пространств существует большое количество баз данных, которые содержат информацию о различных уже исследованных и охарактеризованных молекулах. Некоторые из баз данных и химических пространств, которые могут быть полезны для проведения SBVS [36], представлены в таблице.

Молекулярный докинг, который впервые был описан в 1980-х гг. [37, 38], на данный момент является одним из наиболее распространенных подходов SBDD. Его используют для моделирования взаимодействий между малой молекулой и белком-мишенью на атомарном уровне, что позволяет предсказать наиболее устойчивое положение и энергетически выгодную конформацию лиганда в сайте связывания. При этом следует отметить, что предсказанная высокая аффинность лиганда не гарантирует его эффективность и не определяет характер воздействия на рецептор. Чтобы предсказать биологическую активность потенциальных лигандов применяют вспомогательные подходы, например, для докинга используют структуру рецептора в определенной конформации (в связанном с агонистом, антагонистом или обратным агонистом состоянии), анализируют молекулярные дескрипторы лигандов, проводят молекулярную динамику комплекса рецептора с лигандом и некоторые другие [39]. Тем не менее проблема определения типа биологической активности лиганда по его структуре является актуальной для компьютерного моделирования и на данный момент не имеет универсального решения.

Процесс молекулярного докинга можно разделить на два основных этапа. Первым шагом является поиск наилучшего положения лиганда в сайте связывания (Search Algorithm). В простейшем случае лиганд и белок-мишень можно рассматри-

Общедоступные коммерческие базы данных и химические пространства, используемые для SBVS

Название	Количество малых молекул*
ZINC (https://zinc20.docking.org)	$>2,3 \times 10^8$
ChEMBL (https://www.ebi.ac.uk/chembl/)	$2,6 \times 10^6$
PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)	$1,2 \times 10^8$
REAL Space (Enamine) (https://enamine.net/compound-collections/real-compounds/real-space-navigator)	$3,6 \times 10^{10}$
GalaXi (WuXi LabNetwork) (https://www.biosolveit.de/infiniSee)	$1,2 \times 10^{10}$
eXplore (eMolecules) (https://emolecules.com/explore)	7×10^{12}
Freedom Space (Chemspace) (http://chem-space.com/compounds/freedom-space)	$1,8 \times 10^8$
CHEMriya (OTAVA's Chemicals) (https://otavachemicals.com/products/chemriya)	$1,2 \times 10^{10}$

Примечание. * – Данные на 2023 г. [36].

вать как два твердых тела, система которых имеет 6 степеней свободы (поступательные и вращательные). Такой подход обычно используется как самый быстрый способ выполнить первоначальный скрининг баз данных малых молекул. Однако часто такая оценка является недопустимо грубой, и для более точного докинга учитывают конформационные степени свободы лиганда, белка (обычно лишь его небольшой части, непосредственно участвующей в образовании комплекса), либо их обоих [40, 41]. Вычисление всех возможных конформаций для большого количества молекул в таком случае времязатратно, в связи с чем было разработано и протестировано большое количество алгоритмов, которые позволяют оптимизировать процесс поиска энергетического минимума системы. Такие, учитывающие гибкость лиганда, алгоритмы можно разделить на 3 типа: систематические, стохастические и детерминированные, а также гибридные подходы. Особенности каждого из видов и их применение в различных программных пакетах исчерпывающе описаны в обзорах [42, 43].

После того как перспективные конформации лиганда выбраны, к ним необходимо применить оценочную функцию, которая ранжирует и отбирает наилучшие соединения. При этом чаще всего оценивают изменение энергии системы, вызванное формированием структуры лиганд-рецептор. Для этого оценочные функции делают ряд упрощений и приближенно учитывают вклад физических явлений, определяющих молекулярное взаимодействие комплекса. Оценочные функции принято разделять на 4 основных вида: физически обоснованные (physics-based), эмпирические (empirical), статистические (knowledge-based), основанные на

машинном обучении (machine learning-based), аналогично существуют и комбинированные подходы. Подробнее об оценочных функциях можно прочитать в опубликованных ранее материалах [44, 45].

Среди большого множества программ для SBVS (наиболее популярные из которых указаны в сводной таблице обзора Maia et al. [46]) нельзя выделить одну, которая всегда бы позволяла получить наилучшие результаты. В каждом конкретном случае то или иное программное обеспечение может найти больше соединений-хитов и лучше исключить неактивные молекулы. Поэтому иногда применяют подход, который называется «консенсус докинг» (consensus docking) и который заключается в использовании нескольких различных программ для молекулярного докинга. Результаты консенсус докинга могут помочь выявить наиболее аффинные лиганды и повысить точность финальной выборки соединений [47, 48].

После завершения виртуального скрининга полученные соединения при необходимости дополнительно отсеивают, например, на основе молекулярных свойств, важных для биодоступности лекарственного средства (как одно из наиболее известных выделяют правило Lipinski et al. [49]), а также на основе критериев, предсказывающих ложноположительные и проявляющие аномальную активность лиганды (критерии PAINS [50]), схожести молекулярных отпечатков соединений и других их молекулярных дескрипторов для поиска уникальных хемотипов. Затем из оставшихся молекул выбирают от нескольких десятков до нескольких сотен соединений с наивысшими показателями оценочной функции и проводят функциональные тесты *in vitro*, по которым отделяют соединения-хиты от неактивных веществ.

Известны как минимум несколько примеров, где использование методов SBVS для GPCR позволило получить ряд соединений, проявивших суб-микромольную активность [24, 51, 52].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *in vitro*

Полученные методами виртуального скрининга и теоретической оптимизации соединения-хиты и далее соединения-лидеры должны проходить через процедуру экспериментального тестирования. Основные подходы к такому тестированию заключаются в измерении или относительном сравнении кинетических и термодинамических констант связывания (в первую очередь константы диссоциации K_d), а также в количественной характеристике клеточного ответа при помощи детекции разрушающихся и возникающих белок-белковых взаимодействий, изменения концентрации вторичных мессенджеров и профиля экспрессии белков-репортеров. В результате характеристики происходит измерение таких констант, как молярная активность лиганда (potency) или полумаксимальная эффективная концентрация (EC50) – это значение концентрации агониста, которая вызывает биологический ответ, равный половине максимально возможного для данного лиганда после достижения насыщения кривой, а также характерной константы ингибирования (IC50) для антагонистов и обратных агонистов. При сравнительном анализе эффективности лигандов также используют производные относительные константы конкурентного замещения, отражающие эффективность замены одних лигандов другими в сайте связывания.

***In vitro* функциональные тесты для характеристики взаимодействия рецептор–лиганд.** Среди наиболее используемых *in vitro* методов для широкомасштабного скрининга GPCR стоит отметить подходы с использованием флуоресцентной поляризации лигандов [53], масс-спектрометрию с отбором высокоаффинных веществ (Affinity Selection Mass-spectrometry, AS-MS) [54, 55]. Также для анализов в масштабах лабораторных исследований (десятки лигандов) применяются радиолигандный анализ, основанный на связывании радиоактивно меченного лиганда с рецептором [56], сцинтилляционный анализ сближения (Scintillation Proximity Assay, SPA), биосенсорные технологии на основе поверхностного плазмонного резонанса [57, 58]. Перспективами для применений в области скрининга GPCR-лигандов обладают такие методы, как микромасштабный термофорез (Microscale thermophoresis, MST) [59, 60], дифференциальная сканирующая флуориметрия (Nano differential scanning fluorimetry, NanoDSF), скрининг на ос-

нове методик спектроскопии ЯМР [61], изотермическая калориметрия титрования (ИКТ) [62] и интерферометрия «биологических слоев» (Bio-layer interferometry, BLI), которую используют для исследования взаимодействия с макромолекулярными лигандами [63]. Измерение констант связывания, выполняемое при помощи вышеописанных подходов, как правило, не позволяет достоверно определить фармакологический тип лиганда (ортостерический агонист/антагонист/обратный агонист или аллостерический модулятор) и не позволяет оценить реальную эффективность воздействия на внутриклеточный ответ после взаимодействия с лигандом. Также стоит отметить, что, как и в структурных исследованиях, низкая стабильность очищенных GPCR делает их скрининг вне клеток или нативных мембранных систем сложной задачей, поэтому в анализах *in vitro* используют стабилизированные конструкции рецепторов.

Функциональные тесты *in vitro* на основе клеточных культур. В случае, когда *in vitro* данных о связывании недостаточно и требуется анализ уровня активации рецептора и его фармакологический профиль, используют клеточные функциональные тесты. При связывании лиганда с GPCR активируются каскады внутриклеточных сигнальных путей, при этом происходят биохимические реакции, белок-белковые взаимодействия, изменение внутриклеточной концентрации вторичных мессенджеров – события, которые можно количественно детектировать и анализировать. При этом часть из этих событий происходят непосредственно после активации рецептора (реакции гетеротримерного G-белка или аррестина), другие – в диапазоне от цитоплазматических реакций до активации факторов транскрипции контролируемых генов. На рис. 2 обозначена принципиальная классическая схема активации GPCR с указанием основных мест количественной детекции клеточного ответа при помощи люминесцентных или флуоресцентных сенсоров.

Связывание агониста приводит к конформационным изменениям рецептора, в результате которых происходит активация G-белка, одним из событий которого является замещение GDP на GTP у α -субъединицы гетеротримерного G-белка. При детектировании накопления устойчивого к гидролизу радиоактивного аналога GTP (GTP γ S) возможно специфически детектировать замену GDP на GTP при активации G-белка. Дальнейшее усовершенствование технологии детекции замены GDP на GTP привело к разработке нерадиоактивного теста с использованием флуоресцирующих хелатированных лантаноидных элементов DELFIA (Dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay) на основе метода TRF (Time-resolved fluorescence) [64].

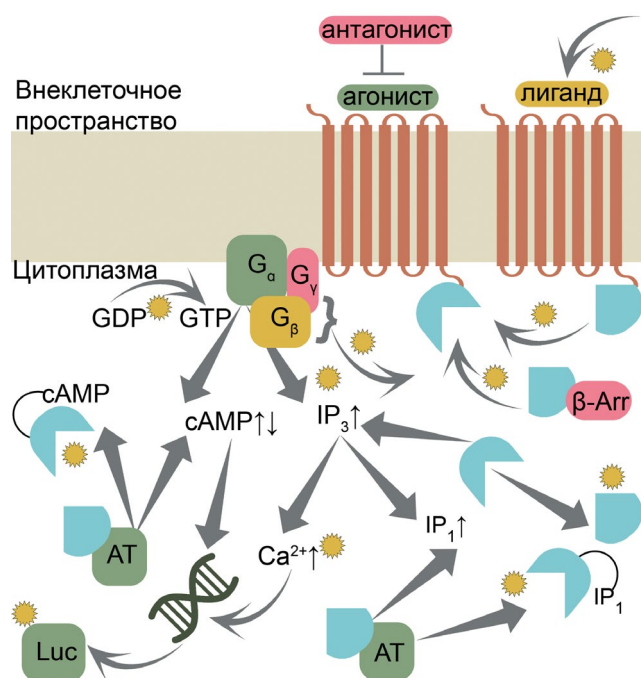


Рис. 2. Методы анализа внутриклеточной сигнализации GPCR, применяемые для скринирования библиотек соединений. Солнцем обозначен детектируемый сигнал хемилюминесценции, флуоресценции, вызванный взаимодействием молекул с сенсорами, сборкой флуоресцентного белка или резонансным переносом энергии, происходящими при сближении макромолекул

Структурные изменения в гетеротримерном G-белке, происходящие при активации GPCR, также можно детектировать при помощи подхода с использованием расщепленных «сплит» люцифераз. Наиболее популярной в настоящее время системой является технология NanoBiT от компании «Promega», в которой взаимодействие между G_{α} -субъединицей и $G_{\beta\gamma}$ -субъединицей G-белка контролируется с помощью системы комплементации ферментов на основе люциферазы NanoLuc, при этом ее фрагменты SmBiT и LgBiT пришиваются к разным субъединицам и, если они находятся в соединенном состоянии, то возникает свечение при наличии субстрата, если же субъединицы расходятся, то свечение пропадает [65, 66]. Данный подход может распространяться на множество исследований белок-белковых взаимодействий.

При скрининге часто применяют тесты, направленные на детекцию дальнейшего ответа рецептора на уровне вторичных мессенджеров, таких как cAMP, кальций, IP_1 , IP_3 и другие, концентрация которых меняется при активации α -субъединиц G-белков различного типа: G_{as} , G_{ai} и G_{aq} . В зависимости от того, какую α -субъединицу содержит G-белок, происходит активация различных сигнальных путей, при этом происходит высвобождение или образование различных вто-

ричных мессенджеров. Изменение концентрации cAMP в клетке происходит в результате активации или ингибирования аденилатциклазы G-белками с G_{as} или G_{ai} соответственно. G_{as} активирует аденилатциклазу, что приводит к увеличению концентрации внутриклеточного cAMP, в то время как при активации G_{ai} аденилатциклаза ингибируется, и уменьшается уровень cAMP в клетке. Многочисленные методы скрининга основаны на изменении концентрации внутриклеточного cAMP при модуляции активности группы рецепторов. В то же время G-белок с субъединицей G_{aq} активирует фосфолипазу C, которая катализирует образование диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3). IP_3 , в свою очередь, стимулирует открытие кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума и выброс кальция в цитоплазму, после чего ферментативно конвертируется в IP_1 и IP_2 .

Другим важнейшим путем активации GPCR является β -аррестинный сигнальный путь. β -Аррестин-1 и β -аррестин-2 – повсеместно экспрессирующиеся цитозольные адапторные белки, которые первоначально были открыты в связи с их ингибирующей ролью в передаче сигнала GPCR. В некоторых случаях β -аррестины регулируют только десенситизацию и интернализацию рецепторов по аналогии с действием зрительного арестина в отношении десенситизации родопсина [67]. Однако зачастую β -аррестины не просто блокируют активированные GPCR, а запускают эндоцитоз и активацию киназ, приводящих к запуску специфических сигнальных путей, которые могут быть локализованы в эндосомах. Было также установлено, что сигнальные пути, инициируемые β -аррестинами, не зависят от активации G-белков. Открытие лигандов, блокирующих активацию G-белков, но способствующих связыванию β -аррестинов или наоборот, позволило открыть избирательную смещенную активацию внутриклеточных сигнальных путей («biased signaling»). Затем было показано, что β -аррестинная сигнализация активирует митоген-активируемую протеинкиназу независимым от G-белков образом и в конечном итоге инициирует экспрессию контролируемых генов [68].

Подходы для детекции cAMP в G_{as} - и G_{ai} -ассоциированных путях. Существует несколько подходов к измерению изменения концентрации cAMP при активации рецептора. Так, технология HitHunter от «DiscoverX» базируется на анализе комплементации фрагментов расщепленного белка β -галактозидазы [69]. В нем используют cAMP, конъюгированный с малым фрагментом β -галактозидазы, также отдельно присутствует комплементарный крупный фрагмент этого белка. При добавлении антител и субстрата фермента конъюгированный cAMP связывается с антителами и комплементации β -галактозидазы не происходит,

субстрат не утилизируется, и, соответственно, сигнала нет. Если при активации GPCR начинает работать аденилатциклаза, что приводит к накоплению cAMP в цитоплазме клетки, этот эндогенный cAMP начинает конкурировать с конъюгированным за связывание с антителами, и происходит сборка активной β -галактозидазы. При наличии в среде субстрата фермента происходит реакция хемилюминесценции, сигнал от которой детектируют люминометром.

Другой пример хемилюминесцентного анализа – технология AlphaScreen от «PerkinElmer» [70]. В нем используют донорные и акцепторные микрочастицы, при сближении которых происходит передача синглетного кислорода, возникшего при фотоактивации донорной частицы, к акцептору. В данном тесте донором являются фотоактивируемые микрочастицы на основе фталоцианина, покрытые стрептавидином. Биотинилированный синтетический cAMP связывается с донором и с анти-cAMP-антителами, конъюгированными с акцепторной частицей, содержащей хемилюминесцентную в присутствии синглетного кислорода теоксеновую группу. В результате сближения донора и акцептора усиливается хемилюминесцентный сигнал акцептора. Эндогенный cAMP конкурирует с синтетическим за связывание с антителами и нарушает комплекс донор (биотинилированный cAMP)–акцептор, в результате чего хемилюминесцентный сигнал снижается.

Для определения концентрации cAMP в клетке используют также метод флуоресцентной поляризации [71]. Синтетический cAMP, конъюгированный с флуоресцентной меткой, излучающей поляризованный свет, связывается с анти-cAMP-антителами и в поляризованном свете демонстрирует поляризованную эмиссию вследствие уменьшения степени свободы вращения в связанном виде. При увеличении концентрации эндогенного cAMP происходит конкурентное вытеснение меченого cAMP из комплекса с антителами, что приводит к увеличению его хаотичной подвижности и, как следствие, к снижению детектируемой поляризации флуоресценции.

Еще один подход к измерению концентрации cAMP – это использование зависимых от этого кофактора ферментов. К примеру, технология GloSensor [72] представляет собой модифицированную cAMP-зависимую люциферазу. При связывании cAMP происходят конформационные изменения люциферазы и концентрационно-зависимая активация ее свечения. По сходному принципу работают cAMP-зависимые сенсоры EPAC – химерные белки, состоящие из домена, в котором происходят структурные перестройки, изменяющие расстояния между пришитыми к нему люциферазами, составляющими BRET-пару, и/или флуоресцент-

ными белками, составляющими FRET-пару [73]. Примеры применения данных подходов для GPCR содержатся в недавних исследованиях [74, 75].

Также распространенным подходом является использование репортерных систем, в которых ген люциферазы находится под контролем мультимеризованного ответного элемента cAMP (CRE), регулирующего активность промотора данного гена, тем самым позволяя детектировать изменение концентрации cAMP благодаря люминесцентному сигналу [76, 77].

Детекция инозитолфосфатов и кальция при активации G_{aq} -пути. На сегодняшний день доступно несколько платформ для определения концентрации IP_1 , IP_3 или кальция. Подходы AlphaScreen и использование поляризованных флуоресцентных меток, которые описаны ранее, также применимы для детекции вторичного мессенджера IP_3 [78].

Помимо измерения IP_3 , подобные подходы используют для измерения концентрации другого вторичного мессенджера, промежуточного продукта распада IP_3 – IP_1 . Было показано, что добавление хлорида лития к клеткам приводит к ингибированию дефосфорилирования и накоплению IP_1 в клетке, что делает возможным измерение его концентрации, как следствие активации целевых GPCR [78]. Это конкурентный анализ, основанный на принципе гомогенного время-разрешенного FRET (homogeneous time-resolved FRET, HTRF) [79], в котором помещенный в клетки меченный d2 меткой IP_1 выступает в качестве акцептора флуоресценции, а меченное криптом тербия анти- IP_1 -моноклональное антитело (mAb) – в качестве донора флуоресценции. Наряду с этим при увеличении концентрации эндогенного IP_1 меченый аналог замещается в сайте связывания антитела и, как следствие, происходит снижение сигнала FRET. Данный подход реализован в IP-One assay от компании «Cisbio» и был применен ранее нами при исследовании цистеинил лейкотриеновых рецепторов [52, 80, 81].

Часто при проведении скрининга выбирают тест, основанный на измерении концентрации внутриклеточного кальция при помощи проникающих в клетки кальций-чувствительных флуорофоров Fluo-3, Fluo-4 и их оптимизированных аналогов с использованием флуоресцентных ридеров на основе технологии флуоресцентного считывания с планшетов (fluorescent imaging plate reader, FLIPR), проводящих относительно быстрые (3–5 секунд) измерения флуоресценции в реальном времени [82].

Дополнительно, как и в случае с cAMP, кальций можно детектировать при активации экспрессии генов репортерных люцифераз, находящихся под контролем кальций-зависимых промоторов (система NFAT от «Promega») [83].

β-Аррестинный путь. Ключевым событием при активации данного сигнального пути в большинстве случаев является фосфорилирование GRK. Первоначальные исследования фосфорилирования GPCR основывались на радиоактивных анализах в целых клетках, которые требуют высокого уровня радиоактивности и не могут быть использованы для идентификации отдельных фосфорилированных сериновых и треониновых остатков. Позже исследования были направлены на анализ фосфопротеомики, с помощью которого была получена ограниченная количественная информация. В настоящее время преобладает подход, основанный на использовании антител, специфически распознающих фосфорилированное состояние GPCR [84].

Другие подходы к исследованию активации β-аррестинных сигнальных путей [85] основаны на анализе множественных изменений в клетке при помощи флуоресцентного и люминесцентного анализа. Одним из подходов является наблюдение за миграцией рецептора в клетке после его интернализации за счет использования меченых лигандов, антител против различных эпитопов на рецепторе или же конъюгированных флуоресцентных меток, как реализовано в технологии Transfluor Assay (Molecular Devices) [86].

Еще одним подходом является непосредственная детекция связывания β-аррестина с рецептором. Необходимо отметить методы на основе BRET [87]. При проведении BRET используют рецептор, конъюгированный с флуоресцентным красителем, и β-аррестин, конъюгированный с люциферазой, или наоборот. При связывании рецептора с β-аррестином происходит сближение двух меток и наблюдается перенос энергии биолюминесценции на флуорофор.

Tango assay [88] представляет собой репортерную систему, которая активируется протеазой TEV, конъюгированной с β-аррестином. При сближении β-аррестина с рецептором, имеющим таг в виде транскрипционного фактора с сайтом узнавания протеазы TEV, происходит отщепление фактора от рецептора под воздействием протеазы, и транслокация транскрипционного фактора в ядро, где он активирует транскрипцию β-лактамазы. β-Лактамаза катализирует расщепление субстрата с двумя флуоресцентными тагами, в результате чего резонансный перенос энергии флуоресценции между тагом-донором и тагом-акцептором нарушается. Таким образом, флуоресцентный сигнал от интактного субстрата исчезает и появляется сигнал от расщепленного субстрата.

Альтернативой является технология PathHunter от «DiscoverX» [89], которая представляет собой тест, основанный на принципе комплементации фрагментов белка, в данном случае – β-галактози-

дазы. Если β-аррестин конъюгировать с большим неактивным фрагментом β-галактозидазы, а рецептор – с малым, то при связывании рецептора и β-аррестина эти фрагменты β-галактозидазы сближаются и фермент начнет проявлять активность по отношению к своему субстрату, генерируя хемилюминесцентный сигнал.

Детекция димеризации GPCR. Многие GPCR образуют гомо-, гетеродимеры или олигомеры на плазматической мембране [90]. Димеризация может значительно изменять спектр активации различных сигнальных путей [91]. Существуют несколько распространенных подходов к детекции димеризации: одни основаны на детекции FRET или BRET, при этом таги донора и акцептора конъюгированы с C-концами рецепторов [92, 93], другие основаны на методе комплементации фрагментов β-галактозидазы (PathHunter) [94]. При коэкспрессии рецепторов, один из которых конъюгирован с большим, а другой с малым фрагментами расщепленной β-галактозидазы, добавление агониста приводит к димеризации и сборке фермента с генерированием хемилюминесценции в присутствии субстрата.

Практические аспекты выбора клеточных функциональных тестов для исследований. В настоящее время все более популярными становятся подходы на основе одновременной детекции активации нескольких сигнальных путей рецептора и детектирования активации разных субъединиц G-белков с помощью BRET, такие как Truepath assay [90], позволяющие исследовать фармакологический профиль активации рецептора и прямо исследовать смещенную сигнализацию (biased signalling).

На практике при выборе того или иного функционального теста исходят из соображений научной постановки задачи, детекции результатов активации рецептора по выбранному биохимическому пути на том или ином уровне (исследования событий, происходящих непосредственно после активации вблизи рецептора, и «downstream» – детекция вторичных мессенджеров и изменения экспрессии репортерных генов), учитывая возможность возникновения ошибочных данных из-за пересечения с независимыми клеточными сигнальными путями (так называемый «crosstalk») [95, 96].

Необходимо также принимать в расчет технические и экономические соображения, такие как доступность реагентов и систем детекции сигнала, динамический диапазон применения метода, масштабируемость для задач скрининга и возможность валидации в целях соответствия критериям доклинических испытаний.

После проведения *in vitro* функциональных тестов на дальнейших этапах разработки лекарств переходят к тестированию успешных соединений

в более комплексных *in vivo* системах, например, на функционально дифференцированных клетках и тканях [97, 98], органоидах [99, 100], и переходят к тестам ADME-Tox [101] и к дальнейшим доклиническим испытаниям на животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день благодаря появлению современных экспериментальных функциональных тестов для GPCR и развитию биоинформатики, гармонично дополненному успехами структурной биологии, исследователи обеспечены полным набором инструментов для разработки и верификации новых лигандов методом SBDD.

После определения большинства структур прошло менее 10 лет, и поэтому судить об успехах или неудачах SBDD GPCR еще слишком рано. К тому же фармкомпании обычно не публикуют ранние результаты исследований в целях снижения конкуренции. Тем не менее здесь приведены несколько примеров препаратов, разработанных посредством SBDD и находящихся сейчас на стадии клинических испытаний.

В 2012 г. кристаллическая структура $A_{2A}AR$ (опубликованная в 2011 г. [102]) была использована при поиске антагонистов для применения в области иммунной онкологии. Скрининг *in silico* идентифицировал ряд потенциально подходящих химических соединений. Кроме того, в ходе анализа ортостерического сайта связывания лиганда у нескольких кристаллических структур «рецептор–лиганд» в ортостерическом «кармане» был выявлен ранее неизвестный участок. Этот участок использовали для связывания агонистов, а в случае известных ранее антагонистов оставляли незанятым. Искусственные антагонисты, имеющие химическую группу для связывания в этом новом участке «кармана», отличались высокой специфичностью. Так, посредством SBDD был разработан AZD4635 – антагонист, селективность которого была оптимизирована к $A_{2A}AR$ относительно гомологичного рецептора A_1AR . В ходе доклинических испытаний AZD4635 показал эффективность как при монотерапии, так и в сочетании с анти-PD1-антителом в качестве противоопухолевого иммуномодулятора [103, 104]. В настоящее время препарат находится на II стадии клинических испытаний на пациентах с опухолями простаты (<https://clinicaltrials.gov/study/NCT04089553>).

Другой пример успешного использования SBDD – поиск селективных агонистов для мускариновых рецепторов M_1R и M_4R . Активация этих рецепторов предположительно поможет в лечении когнитивных и психических расстройств, болезни Альцгеймера, а также в лечении шизо-

френии. При этом лекарственный препарат – агонист M_1R и M_4R – не должен активировать гомологичные рецепторы M_2R и M_3R , чтобы избежать побочных эффектов со стороны пищеварительной и сердечно-сосудистой систем. Традиционные подходы к подбору агонистов не смогли обеспечить нужную степень селективности, так как сайты связывания лигандов у филогенетически близких M_1R , M_2R , M_3R и M_4R очень похожи. И только использование структур рецепторов в комплексе с различными лигандами позволило разработать подходящие высокоспецифичные агонисты. В 2016 г. были опубликованы данные о трех из них: HTL9936 – агонист M_1R , HTL18318 – агонист M_1R и HTL0016878 – агонист M_4R ; в настоящее время они находятся на разных этапах клинических испытаний (<https://soseiheptares.com/news>) [103, 105].

В 2017 г. методом крио-ЭМ была получена структура рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (GLP_1R), являющегося представителем класса В GPCR. Связывание пептида GLP_1 с рецептором способствует пролиферации β -клеток поджелудочной железы и повышает уровень инсулина. GLP_1R является одной из наиболее эффективных мишеней для лечения диабета II типа. Кристаллическая структура с аллостерическим антагонистом дала первоначальную структурную информацию для рациональной разработки лекарственного средства. В 2020 г. были проведены высокопроизводительный *in silico* скрининг низкомолекулярных агонистов GLP_1R и серия оптимизаций для получения первоначальных соединений, что привело к получению низкомолекулярного агониста PF-06882961, имеющего, в отличие от аналогов (самый известный аналог – семаглутид), высокую пероральную доступность. Затем была проанализирована электронно-микроскопическая структура комплекса PF-06883365, аналога PF-06882961, с GLP_1R , выявлен механизм взаимодействия низкомолекулярных агонистов с рецептором и определены ключевые факторы активации белка. Это исследование легло в основу дальнейшей рациональной разработки. На момент написания данного обзора PF-06882961 (Дануглипрон) уже прошел I и II фазы клинических испытаний [106, 107].

В 2023 г. была опубликована статья [108], где авторы разработали прототип нового антидепрессанта BMK-C205, который является антагонистом рецептора кортикотропин-рилизинг-фактора 1 (CRF_1R). Данный рецептор относится к классу В семейства GPCR, экспрессируется в центральной и периферической нервной системе, регулирует поведенческие, эндокринные, иммунные и вегетативные реакции на стресс, что делает его мишенью для лечения связанных со стрессом расстройств. Сначала методом серийной белковой кристаллографии была определена

структура CRF₁R в комплексе с аллостерическим антагонистом ВМК-I-152, что позволило идентифицировать ряд структурных особенностей, в частности, две важные водородные связи. Недостаток ВМК-I-152 как лекарственного препарата – слишком быстрый метаболизм в печени и, как следствие, низкая эффективность даже в случае внутривенного введения. На основе полученной структуры CRF₁R с ВМК-I-152 авторы разработали два новых антагониста – ВМК-C203 и ВМК-C205, которые показали существенно лучшие результаты в фармакокинетических тестах. Методом серийной кристаллографии были определены структуры CRF₁R с этими новыми антагонистами. В конечном итоге ВМК-C205 показал хороший эффект на мышах как антидепрессант и, очень вероятно, будет использован в дальнейшем для разработки человеческих антидепрессантов методом SBDD.

Приведенные примеры иллюстрируют лишь малую часть той работы, которая ведется сейчас в области SBDD GPCR. Учитывая фармакологическую значимость этого класса рецепторов, все полученные структуры, несомненно, уже исполь-

зуются или в скором времени будут использованы для поиска новых лекарств. Вероятно, некоторые из этих препаратов выйдут на фармацевтический рынок в ближайшее десятилетие.

Вклад авторов. А.М., А.Л., Н.С. подготовили текст введения; А.Х., П.Х. подготовили раздел по виртуальному скринингу; А.М., А.Л., О.М. подготовили раздел про определение функциональной активности; А.Л., Н.С. подготовили текст заключения; А.Л., П.Х. работали над рисунками; В.П., Д.Д., А.Б. принимали участие в редактировании текста рукописи; А.Л., П.Х., В.Б., А.М. предложили концепцию, план обзора, редактировали текст рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00454, <https://rscf.ru/project/22-24-00454/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schöneberg, T., and Liebscher, I. (2021) Mutations in G protein-coupled receptors: mechanisms, pathophysiology and potential therapeutic approaches, *Pharmacol. Rev.*, **73**, 89-119, <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000011>.
2. Sriram, K., and Insel, P. A. (2018) G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Mol. Pharmacol.*, **93**, 251-258, <https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>.
3. Kooistra, A. J., Mordalski, S., Pándy-Szekeres, G., Esguerra, M., Mamyrbekov, A., Munk, C., Keserű, G. M., and Gloriam, D. E. (2021) GPCRdb in 2021: integrating GPCR sequence, structure and function, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D335-D343, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1080>.
4. Hauser, A. S., Kooistra, A. J., Munk, C., Heydenreich, F. M., Veprintsev, D. B., Bouvier, M., Babu, M. M., and Gloriam, D. E. (2021) GPCR activation mechanisms across classes and macro/microscales, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **28**, 879-888, <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00674-7>.
5. Dorsam, R. T., and Gutkind, J. S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 79-94, <https://doi.org/10.1038/nrc2069>.
6. Gurevich, V. V., and Gurevich, E. V. (2019) GPCR signaling regulation: the role of GRKs and ARRESTINS, *Front. Pharmacol.*, **10**, 125, <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00125>.
7. Bousoik, E., and Montazeri Aliabadi, H. (2018) “Do we know jack” about JAK? A closer look at JAK/STAT signaling pathway, *Front. Oncol.*, **8**, 287, <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00287>.
8. Hay, D. L., and Pioszak, A. A. (2016) Receptor activity-modifying proteins (RAMPs): new insights and roles, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **56**, 469-487, <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103120>.
9. Masuho, I., Balaji, S., Muntean, B. S., Skamangas, N. K., Chavali, S., Tesmer, J. J. G., Babu, M. M., and Martemyanov, K. A. (2020) A global Map of G protein signaling regulation by RGS proteins, *Cell*, **183**, 503-521.e19, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.052>.
10. Wess, J., Oteng, A.-B., Rivera-Gonzalez, O., Gurevich, E. V., and Gurevich, V. V. (2023) β -arrestins: structure, function, physiology, and pharmacological perspectives, *Pharmacol. Rev.*, **75**, 854-884, <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000302>.
11. Smith, J. S., Lefkowitz, R. J., and Rajagopal, S. (2018) Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **17**, 243-260, <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.229>.
12. Kolb, P., Kenakin, T., Alexander, S. P. H., Bermudez, M., Bohn, L. M., Breinholt, C. S., Bouvier, M., Hill, S. J., Kostenis, E., Martemyanov, K. A., et al. (2022) Community guidelines for GPCR ligand bias: IUPHAR review 32, *Br. J. Pharmacol.*, **179**, 3651-3674, <https://doi.org/10.1111/bph.15811>.

13. McGovern, S. L., and Shoichet, B. K. (2003) Information decay in molecular docking screens against holo, apo, and modeled conformations of enzymes, *J. Med. Chem.*, **46**, 2895-2907, <https://doi.org/10.1021/jm0300330>.
14. Mysinger, M. M., Carchia, M., Irwin, J. J., and Shoichet, B. K. (2012) Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): better ligands and decoys for better benchmarking, *J. Med. Chem.*, **55**, 6582-6594, <https://doi.org/10.1021/jm300687e>.
15. Weiss, D. R., Bortolato, A., Tehan, B., and Mason, J. S. (2016) GPCR-bench: a benchmarking set and practitioners' guide for G protein-coupled receptor docking, *J. Chem. Inf. Model.*, **56**, 642-651, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00660>.
16. Bender, B. J., Gahbauer, S., Luttens, A., Lyu, J., Webb, C. M., Stein, R. M., Fink, E. A., Balius, T. E., Carlsson, J., Irwin, J. J., and Shoichet, B. K. (2021) A practical guide to large-scale docking, *Nat. Protoc.*, **16**, 4799-4832, <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00597-z>.
17. Walters, W. P. (2019) Virtual chemical libraries, *J. Med. Chem.*, **62**, 1116-1124, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01048>.
18. Gentile, F., Yaacoub, J. C., Gleave, J., Fernandez, M., Ton, A.-T., Ban, F., Stern, A., and Cherkasov, A. (2022) Artificial intelligence-enabled virtual screening of ultra-large chemical libraries with deep docking, *Nat. Protoc.*, **17**, 672-697, <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00659-2>.
19. Fink, T., Bruggesser, H., and Reymond, J.-L. (2005) Virtual exploration of the small-molecule chemical universe below 160 Daltons, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **44**, 1504-1508, <https://doi.org/10.1002/anie.200462457>.
20. Ruddigkeit, L., van Deursen, R., Blum, L. C., and Reymond, J.-L. (2012) Enumeration of 166 billion organic small molecules in the chemical universe database GDB-17, *J. Chem. Inf. Model.*, **52**, 2864-2875, <https://doi.org/10.1021/ci300415d>.
21. Bühlmann, S., and Reymond, J.-L. (2020) ChEMBL-likeness score and database GDBChEMBL, *Front Chem.*, **8**, 46, <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00046>.
22. Leach, A. R., and Hann, M. M. (2000) The *in silico* world of virtual libraries, *Drug Discov. Today*, **5**, 326-336, [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(00\)01516-6](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(00)01516-6).
23. Hartenfeller, M., Eberle, M., Meier, P., Nieto-Oberhuber, C., Altmann, K.-H., Schneider, G., Jacoby, E., and Renner, S. (2011) A collection of robust organic synthesis reactions for *in silico* molecule design, *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 3093-3098, <https://doi.org/10.1021/ci200379p>.
24. Lyu, J., Wang, S., Balius, T. E., Singh, I., Levit, A., Moroz, Y. S., O'Meara, M. J., Che, T., Algaa, E., Tolmachova, K., Tolmachev, A. A., Shoichet, B. K., Roth, B. L., and Irwin, J. J. (2019) Ultra-large library docking for discovering new chemotypes, *Nature*, **566**, 224-229, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0917-9>.
25. Weininger, D. (1988) SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **28**, 31-36, <https://doi.org/10.1021/ci00057a005>.
26. Polykovskiy, D., Zhebrak, A., Sanchez-Lengeling, B., Golovanov, S., Tatanov, O., Belyaev, S., Kurbanov, R., Artamonov, A., Aladinskiy, V., Veselov, M., Kadurin, A., Johansson, S., Chen, H., Nikolenko, S., Aspuru-Guzik, A., and Zhavoronkov, A. (2020) Molecular Sets (MOSES): A Benchmarking platform for molecular generation models, *Front. Pharmacol.*, **11**, 565644, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.565644>.
27. Arús-Pous, J., Blaschke, T., Ulander, S., Reymond, J.-L., Chen, H., and Engkvist, O. (2019) Exploring the GDB-13 chemical space using deep generative models, *J. Cheminform.*, **11**, 20, <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0341-z>.
28. Li, Y., Vinyals, O., Dyer, C., Pascanu, R., and Battaglia, P. (2018) Learning deep generative models of graphs, *arXiv*, <https://doi.org/10.48550/arXiv.1803.03324>.
29. Zhou, Z., Kearnes, S., Li, L., Zare, R. N., and Riley, P. (2019) Optimization of molecules via deep reinforcement learning, *Sci. Rep.*, **9**, 10752, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66840-x>.
30. Segler, M. H. S., Kogej, T., Tyrchan, C., and Waller, M. P. (2018) Generating focused molecule libraries for drug discovery with recurrent neural networks, *ACS Cent Sci.*, **4**, 120-131, <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00512>.
31. Sousa, T., Correia, J., Pereira, V., and Rocha, M. (2021) Generative deep learning for targeted compound design, *J. Chem. Inf. Model.*, **61**, 5343-5361, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01496>.
32. Warr, W. A., Nicklaus, M. C., Nicolaou, C. A., and Rarey, M. (2022) Exploration of ultralarge compound collections for drug discovery, *J. Chem. Inf. Model.*, **62**, 2021-2034, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00224>.
33. Sadybekov, A. V., and Katritch, V. (2023) Computational approaches streamlining drug discovery, *Nature*, **616**, 673-685, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05905-z>.
34. Bajusz, D., Rácz, A., and Héberger, K. (2015) Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J. Cheminform.*, **7**, 20, <https://doi.org/10.1186/s13321-015-0069-3>.
35. Koutsoukas, A., Paricharak, S., Galloway, W. R. J. D., Spring, D. R., Ijzerman, A. P., Glen, R. C., Marcus, D., and Bender, A. (2014) How diverse are diversity assessment methods? A comparative analysis and benchmarking of molecular descriptor space, *J. Chem. Inf. Model.*, **54**, 230-242, <https://doi.org/10.1021/ci400469u>.
36. Korn, M., Ehrt, C., Ruggiu, F., Gastreich, M., and Rarey, M. (2023) Navigating large chemical spaces in early-phase drug discovery, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **80**, 102578, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102578>.

37. Janin, J., and Wodak, S. (1978) Conformation of amino acid side-chains in proteins, *J. Mol. Biol.*, **125**, 357-386, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90408-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90408-4).
38. Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., and Ferrin, T. E. (1982) A geometric approach to macromolecule-ligand interactions, *J. Mol. Biol.*, **161**, 269-288, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90153-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90153-x).
39. Misztal, P., Jakowiecki, J., Rutkowska, E., Turant, M., Latek, D., and Filipek, S. (2018) Approaches for differentiation and interconverting GPCR agonists and antagonists, *Methods Mol. Biol.*, **1705**, 265-296, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7465-8_12.
40. Lorber, D. M., and Shoichet, B. K. (1998) Flexible ligand docking using conformational ensembles, *Protein Sci.*, **7**, 938-950, <https://doi.org/10.1002/pro.5560070411>.
41. Yunta, M. J. R. (2016) Docking and ligand binding affinity: uses and pitfalls, *Am. J. Model. Optimization*, **4**, 74-114, <https://doi.org/10.12691/ajmo-4-3-2>.
42. Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., and Nussinov, R. (2002) Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions, *Proteins*, **47**, 409-443, <https://doi.org/10.1002/prot.10115>.
43. Yadava, U. (2018) Search algorithms and scoring methods in protein-ligand docking, *Int. J. Endocrinol. Metab.*, **6**, <https://doi.org/10.15406/emij.2018.06.00212>.
44. Liu, J., and Wang, R. (2015) Classification of current scoring functions, *J. Chem. Inf. Model.*, **55**, 475-482, <https://doi.org/10.1021/ci500731a>.
45. Li, J., Fu, A., and Zhang, L. (2019) An overview of scoring functions used for protein-ligand interactions in molecular docking, *Interdiscip. Sci.*, **11**, 320-328, <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>.
46. Maia, E. H. B., Assis, L. C., de Oliveira, T. A., da Silva, A. M., and Taranto, A. G. (2020) Structure-based virtual screening: from classical to artificial intelligence, *Front. Chem.*, **8**, 343, <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00343>.
47. Houston, D. R., and Walkinshaw, M. D. (2013) Consensus docking: improving the reliability of docking in a virtual screening context, *J. Chem. Inf. Model.*, **53**, 384-390, <https://doi.org/10.1021/ci300399w>.
48. Aliebrahimi, S., Montasser Kouhsari, S., Ostad, S. N., Arab, S. S., and Karami, L. (2018) Identification of phytochemicals targeting c-Met kinase domain using consensus docking and molecular dynamics simulation studies, *Cell Biochem. Biophys.*, **76**, 135-145, <https://doi.org/10.1007/s12013-017-0821-6>.
49. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **23**, 3-25, [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
50. Baell, J. B., and Nissink, J. W. M. (2018) Seven year itch: pan-assay interference compounds (PAINS) in 2017-utility and limitations, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 36-44, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00903>.
51. Männel, B., Jaiteh, M., Zeifman, A., Randakova, A., Möller, D., Hübner, H., Gmeiner, P., and Carlsson, J. (2017) Structure-guided screening for functionally selective D2 dopamine receptor ligands from a virtual chemical library, *ACS Chem. Biol.*, **12**, 2652-2661, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00493>.
52. Sadybekov, A. A., Brouillette, R. L., Marin, E., Sadybekov, A. V., Luginina, A., Gusach, A., Mishin, A., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.-M., Borshchevskiy, V., et al. (2020) Structure-based virtual screening of ultra-large library yields potent antagonists for a lipid GPCR, *Biomolecules*, **10**, <https://doi.org/10.3390/biom10121634>.
53. Heine, P., Witt, G., Gilardi, A., Gribbon, P., Kummer, L., and Plückthun, A. (2019) High-throughput fluorescence polarization assay to identify ligands using purified G protein-coupled receptor, *SLAS Discov.*, **24**, 915-927, <https://doi.org/10.1177/2472555219837344>.
54. Qin, S., Meng, M., Yang, D., Bai, W., Lu, Y., Peng, Y., Song, G., Wu, Y., Zhou, Q., Zhao, S., et al. (2018) High-throughput identification of G protein-coupled receptor modulators through affinity mass spectrometry screening, *Chem. Sci.*, **9**, 3192-3199, <https://doi.org/10.1039/c7sc04698g>.
55. Prudent, R., Annis, D. A., Dandliker, P. J., Ortholand, J.-Y., and Roche, D. (2021) Exploring new targets and chemical space with affinity selection-mass spectrometry, *Nat Rev Chem.*, **5**, 62-71, <https://doi.org/10.1038/s41570-020-00229-2>.
56. Flanagan, C. A. (2016) GPCR-radioligand binding assays, *Methods Cell Biol.*, **132**, 191-215, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.11.004>.
57. Capelli, D., Parravicini, C., Pochetti, G., Montanari, R., Temporini, C., Rabuffetti, M., Trincavelli, M. L., Daniele, S., Fumagalli, M., Saporiti, S., et al. (2019) Surface plasmon resonance as a tool for ligand binding investigation of engineered GPR17 receptor, a G protein coupled receptor involved in myelination, *Front. Chem.*, **7**, 910, <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00910>.
58. Locatelli-Hoops, S., Yeliseev, A. A., Gawrisch, K., and Gorshkova, I. (2013) Surface plasmon resonance applied to G protein-coupled receptors, *Biomed. Spectrosc. Imaging*, **2**, 155-181, <https://doi.org/10.3233/BSI-130045>.
59. Seidel, S. A. I., Dijkman, P. M., Lea, W. A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazic, A., Joseph, J. S., Srinivasan, P., Baaske, P., Simeonov, A., Katritch, I., Melo, F. A., Ladbury, J. E., Schreiber, G., Watts, A., Braun, D., and Duhr, S. (2013) Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions, *Methods*, **59**, 301-315, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.12.005>.

60. Rascol, E., Dufourquet, A., Baccouch, R., Soule, P., and Alves, I. (2022) An original approach to measure ligand/receptor binding affinity in non-purified samples, *Sci. Rep.*, **12**, 5400, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09217-6>.
61. Shimada, I., Ueda, T., Kofuku, Y., Eddy, M. T., and Wüthrich, K. (2019) GPCR drug discovery: integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 59-82, <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.180>.
62. Banères, J.-L., Botzanowski, T., Boutin, J. A., Calamini, B., Castel, J., Catoire, L. J., Cianférani, S., Demesmay, C., Ferguson, G., Ferry, G., Kniazeff, J., Krimm, I., Langer, T., Lebon, G., Ley, M., Nyerges, M., Schwob, M., Venien-Bryan, C., Wagner, R., Zeder-Lutz, G., and Zilian-Stohrer, C. (2023) Biophysical dissection of isolated GPCRs: the adenosine A2A receptor under the bistabilities, *Receptors*, **2**, 47-92, <https://doi.org/10.3390/receptors2010004>.
63. Takahashi, M. (2022) Nucleic acid aptamers emerging as modulators of G-protein-coupled receptors: challenge to difficult cell surface proteins, *Cells*, **11**, <https://doi.org/10.3390/cells11111825>.
64. Singh, J. K., Maniyar, R. C., and Shirsath, V. S. (2012) Development of time-resolved fluorescent based [EU]-GTP binding assay for selection of human Histamine 3 receptor antagonists/inverse agonist: a potential target for Alzheimer's treatment, *Ann. Neurosci.*, **19**, 71-75, <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.12190205>.
65. Hilger, D., Kumar, K. K., Hu, H., Pedersen, M. F., O'Brien, E. S., Giehm, L., Jennings, C., Eskici, G., Inoue, A., Lerch, M., et al. (2020) Structural insights into differences in G protein activation by family A and family B GPCRs, *Science*, **369**, <https://doi.org/10.1126/science.aba3373>.
66. Inoue, A., Raimondi, F., Kadji, F. M. N., Singh, G., Kishi, T., Uwamizu, A., Ono, Y., Shinjo, Y., Ishida, S., Arang, N., Kawakami, K., Gutkind, J. S., Aoki, J., and Russell, R. B. (2019) Illuminating G-protein-coupling selectivity of GPCRs, *Cell*, **177**, 1933-1947.e25, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.044>.
67. Van Gastel, J., Hendrickx, J. O., Leysen, H., Santos-Otte, P., Luttrell, L. M., Martin, B., and Maudsley, S. (2018) β -arrestin based receptor signaling paradigms: potential therapeutic targets for complex age-related disorders, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1369, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01369>.
68. Jean-Charles, P.-Y., Kaur, S., and Shenoy, S. K. (2017) G protein-coupled receptor signaling through β -arrestin-dependent mechanisms, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **70**, 142-158, <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000482>.
69. Bradley, J., and McLoughlin, D. (2009) Use of the DiscoverX Hit hunter cAMP assay for direct measurement of cAMP in Gs and Gi GPCRs, *Methods Mol. Biol.*, **552**, 171-179, https://doi.org/10.1007/978-1-60327-317-6_12.
70. Yasgar, A., Jadhav, A., Simeonov, A., and Coussens, N. P. (2016) AlphaScreen-based assays: ultra-high-throughput screening for small-molecule inhibitors of challenging enzymes and protein-protein interactions, *Methods Mol. Biol.*, **1439**, 77-98, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3673-1_5.
71. Kool, J., van Marle, A., Hulscher, S., Selman, M., van Iperen, D. J., van Altena, K., Gillard, M., Bakker, R. A., Irth, H., Leurs, R., et al. (2007) A flow-through fluorescence polarization detection system for measuring GPCR-mediated modulation of cAMP production, *J. Biomol. Screen.*, **12**, 1074-1083, <https://doi.org/10.1177/1087057107308881>.
72. Kumar, B. A., Kumari, P., Sona, C., and Yadav, P. N. (2017) GloSensor assay for discovery of GPCR-selective ligands, *Methods Cell Biol.*, **142**, 27-50, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.07.012>.
73. Robichaux, W. G., 3rd and Cheng, X. (2018) Intracellular cAMP sensor EPAC: physiology, pathophysiology, and therapeutics development, *Physiol. Rev.*, **98**, 919-1053, <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2017>.
74. Lyapina, E., Marin, E., Gusach, A., Orekhov, P., Gerasimov, A., Luginina, A., Vakhrameev, D., Ergasheva, M., Kovaleva, M., Khusainov, G., Khorn, P., Shevtsov, M., Kovalev, K., Bukhdruker, S., Okhrimenko, I., Popov, P., Hu, H., Weierstall, U., Liu, W., Cho, Y., Gushchin, I., Rogachev, A., et al. (2022) Structural basis for receptor selectivity and inverse agonism in S1P5 receptors, *Nat. Commun.*, **13**, 4736, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32447-1>.
75. Krasavin, M., Lukin, A., Sukhanov, I., Gerasimov, A. S., Kuvarzin, S., Efimova, E. V., Dorofeikova, M., Nichugovskaya, A., Matveev, A., Onokhin, K., Zakharov, K., Gureev, M., and Gainetdinov, R. R. (2022) Discovery of trace amine associated receptor 1 (TAAR1) agonist 2-(5-(4'-chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)ethan-1-amine (LK00764) for the treatment of psychotic disorders, *Biomolecules*, **12**, <https://doi.org/10.3390/biom12111650>.
76. Paramonov, V. M., Mamaeva, V., Sahlgren, C., and Rivero-Müller, A. (2015) Genetically-encoded tools for cAMP probing and modulation in living systems, *Front. Pharmacol.*, **6**, 196, <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00196>.
77. Chen, Y., Xu, Z., Wu, D., Li, J., Song, C., Lu, W., and Huang, J. (2015) Luciferase reporter gene assay on human 5-HT receptor: which response element should be chosen? *Sci. Rep.*, **5**, 8060, <https://doi.org/10.1038/srep08060>.
78. Garbison, K. E., Heinz, B. A., and Lajiness, M. E. (2012) *IP-3/IP-1 Assays*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
79. Degorce, F., Card, A., Soh, S., Trinquet, E., Knapik, G. P., and Xie, B. (2009) HTRF: A technology tailored for drug discovery – a review of theoretical aspects and recent applications, *Curr. Chem. Genomics*, **3**, 22-32, <https://doi.org/10.2174/1875397300903010022>.
80. Luginina, A., Gusach, A., Marin, E., Mishin, A., Brouillette, R., Popov, P., Shiriaeva, A., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.-M., Lyapina, E., et al. (2019) Structure-based mechanism of cysteinyl leukotriene receptor inhibition by anti-asthmatic drugs, *Sci. Adv.*, **5**, eaax2518, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2518>.

81. Gusach, A., Luginina, A., Marin, E., Brouillette, R. L., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.-M., Ishchenko, A., Popov, P., Patel, N., Fujimoto, T., et al. (2019) Structural basis of ligand selectivity and disease mutations in cysteinyl leukotriene receptors, *Nat. Commun.*, **10**, 5573, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13348-2>.
82. Caers, J., Peymen, K., Suetens, N., Temmerman, L., Janssen, T., Schoofs, L., and Beets, I. (2014) Characterization of G protein-coupled receptors by a fluorescence-based calcium mobilization assay, *J. Vis. Exp.*, e51516, <https://doi.org/10.3791/51516>.
83. Cheng, Z., Garvin, D., Paguio, A., Stecha, P., Wood, K., and Fan, F. (2010) Luciferase reporter assay system for deciphering GPCR pathways, *Curr. Chem. Genomics*, **4**, 84-91, <https://doi.org/10.2174/1875397301004010084>.
84. Kaufmann, J., Blum, N. K., Nagel, F., Schuler, A., Drube, J., Degenhart, C., Engel, J., Eickhoff, J. E., Dasgupta, P., Fritzwanker, S., Guastadisegni, M., Schulte, C., Miess-Tanneberg, E., Maric, H. M., Spetea, M., Kliewer, A., Baumann, M., Klebl, B., et al. (2022) A bead-based GPCR phosphorylation immunoassay for high-throughput ligand profiling and GRK inhibitor screening, *Commun. Biol.*, **5**, 1206, <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04135-9>.
85. Wang, T., Li, Z., Cvijic, M. E., Krause, C., Zhang, L., and Sum, C. S. (2017) *Measurement of β -Arrestin Recruitment for GPCR Targets*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
86. Oakley, R. H., Hudson, C. C., Cruickshank, R. D., Meyers, D. M., Payne, R. E., Jr., Rhem, S. M., and Loomis, C. R. (2002) The cellular distribution of fluorescently labeled arrestins provides a robust, sensitive, and universal assay for screening G protein-coupled receptors, *Assay Drug Dev. Technol.*, **1**, 21-30, <https://doi.org/10.1089/154065802761001275>.
87. Donthamsetti, P., Quejada, J. R., Javitch, J. A., Gurevich, V. V., and Lambert, N. A. (2015) Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) to characterize agonist-induced arrestin recruitment to modified and unmodified G protein-coupled receptors, *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **70**, 2.14.1-2.14.14, <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0214s70>.
88. Dogra, S., Sona, C., Kumar, A., and Yadav, P. N. (2016) Tango assay for ligand-induced GPCR- β -arrestin2 interaction: application in drug discovery, *Methods Cell Biol.*, **132**, 233-254, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.11.001>.
89. Zhao, X., Jones, A., Olson, K. R., Peng, K., Wehrman, T., Park, A., Mallari, R., Nebalasca, D., Young, S. W., and Xiao, S.-H. (2008) A homogeneous enzyme fragment complementation-based beta-arrestin translocation assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors, *J. Biomol. Screen.*, **13**, 737-747, <https://doi.org/10.1177/1087057108321531>.
90. Olsen, R. H. J., DiBerto, J. F., English, J. G., Glaudin, A. M., Krumm, B. E., Slocum, S. T., Che, T., Gavin, A. C., McCorvy, J. D., Roth, B. L., et al. (2020) TRUPATH, an open-source biosensor platform for interrogating the GPCR transducerome, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 841-849, <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0535-8>.
91. Faron-Górecka, A., Szlachta, M., Kolasa, M., Solich, J., Górecki, A., Kuśmider, M., Żurawek, D., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2019) Understanding GPCR dimerization, *Methods Cell Biol.*, **149**, 155-178, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.08.005>.
92. Kufareva, I., Stephens, B., Gilliland, C. T., Wu, B., Fenalti, G., Hamel, D., Stevens, R. C., Abagyan, R., and Handel, T. M. (2013) A novel approach to quantify G-protein-coupled receptor dimerization equilibrium using bioluminescence resonance energy transfer, *Methods Mol. Biol.*, **1013**, 93-127, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-426-5_7.
93. Erdogan, E., Altunbas, I., Kabaoglu, N., and Yanikomeroglu, H. (2020) A cognitive radio enabled RF/FSO communication model for aerial relay networks: possible configurations and opportunities, *arXiv*, <https://doi.org/10.1109/OJVT.2020.3045486>.
94. Guo, S., Zhao, T., Yun, Y., and Xie, X. (2022) Recent progress in assays for GPCR drug discovery, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **323**, C583-C594, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00464.2021>.
95. Werry, T. D., Wilkinson, G. F., and Willars, G. B. (2003) Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca^{2+} , *Biochem. J.*, **374**, 281-296, <https://doi.org/10.1042/BJ20030312>.
96. Horioka, M., Ceraudo, E., Lorenzen, E., Sakmar, T. P., and Huber, T. (2021) Purinergic receptors crosstalk with CCR5 to amplify Ca^{2+} signaling, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **41**, 1085-1101, <https://doi.org/10.1007/s10571-020-01002-1>.
97. Voisin, T., Perner, C., Messou, M.-A., Shiers, S., Ualiyeva, S., Kanaoka, Y., Price, T. J., Sokol, C. L., Bankova, L. G., Austen, K. F., and Chiu, I. M. (2021) The CysLT2R receptor mediates leukotriene C4-driven acute and chronic itch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, <https://doi.org/10.1073/pnas.2022087118>.
98. Pilar Pedro, M., Lund, K., Kang, S. W. S., Chen, T., Stuelten, C. H., Porat-Shliom, N., and Iglesias-Bartolome, R. (2023) A GPCR screening in human keratinocytes identifies that the metabolite receptor HCAR3 controls epithelial proliferation, migration, and cellular respiration, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.05.30.542853>.
99. Cvetkovic, C., Patel, R., Shetty, A., Hogan, M. K., Anderson, M., Basu, N., Aghlara-Fotovat, S., Ramesh, S., Sardar, D., Veisheh, O., et al. (2022) Assessing Gq-GPCR-induced human astrocyte reactivity using bioengineered neural organoids, *J. Cell Biol.*, **221**, <https://doi.org/10.1083/jcb.202107135>.
100. Takahashi, T. (2019) Organoids for drug discovery and personalized medicine, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **59**, 447-462, <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021108>.

101. Jacobson, K. A. (2015) New paradigms in GPCR drug discovery, *Biochem. Pharmacol.*, **98**, 541-555, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.085>.
102. Doré, A. S., Robertson, N., Errey, J. C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B., Hurrell, E., Bennett, K., Congreve, M., Magnani, F., et al. (2011) Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine, *Structure*, **19**, 1283-1293, <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.06.014>.
103. Congreve, M., de Graaf, C., Swain, N. A., and Tate, C. G. (2020) Impact of GPCR structures on drug discovery, *Cell*, **181**, 81-91, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.003>.
104. Borodovsky, A., Barbon, C. M., Wang, Y., Ye, M., Prickett, L., Chandra, D., Shaw, J., Deng, N., Sachsenmeier, K., Clarke, J. D., et al. (2020) Small molecule AZD4635 inhibitor of A2AR signaling rescues immune cell function including CD103⁺ dendritic cells enhancing anti-tumor immunity, *J. Immunother. Cancer*, **8**, e000417, <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000417>.
105. Johnson, C. R., Kangas, B. D., Jutkiewicz, E. M., Bergman, J., and Coop, A. (2022) Drug design targeting the muscarinic receptors and the implications in central nervous system disorders, *Biomedicines*, **10**, 398, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020398>.
106. Saxena, A. R., Gorman, D. N., Esquejo, R. M., Bergman, A., Chidsey, K., Buckridge, C., Griffith, D. A., and Kim, A. M. (2021) Danuglipron (PF-06882961) in type 2 diabetes: a randomized, placebo-controlled, multiple ascending-dose phase 1 trial, *Nat. Med.*, **27**, 1079-1087, <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01391-w>.
107. Saxena, A. R., Frias, J. P., Brown, L. S., Gorman, D. N., Vasas, S., Tsamandouras, N., and Birnbaum, M. J. (2023) Efficacy and safety of oral small molecule glucagon-like peptide 1 receptor agonist danuglipron for glycemic control among patients with type 2 diabetes: a randomized clinical trial, *JAMA Netw. Open*, **6**, e2314493, <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.14493>.
108. Kim, H., Lim, T., Ha, G. E., Lee, J.-Y., Kim, J.-W., Chang, N., Kim, S. H., Kim, K. H., Lee, J., Cho, Y., et al. (2023) Structure-based drug discovery of a corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist using an X-ray free-electron laser, *Exp. Mol. Med.*, **55**, 2039-2050, <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01082-1>.

RATIONAL DRUG DESIGN TARGETING G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS: LIGAND SEARCH AND SCREENING

Review

**A. P. Luginina¹, A. N. Khnykin¹, P. A. Khorn¹, O. V. Moiseeva^{1,2},
N. A. Safronova¹, V. A. Pospelov¹, D. E. Dashevskii¹, A. S. Belousov¹,
V. I. Borshchevskiy^{1,3*}, and A. V. Mishin^{1*}**

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology (NIU), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia;
e-mail: borshchevskiy.vi@phystech.edu, mishinalexey@phystech.edu*

² *G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

³ *Frank Laboratory of Neutron Physics, Joint Institute for Nuclear Research,
141980 Dubna, Moscow Region, Russia*

G protein-coupled receptors (GPCRs) are transmembrane proteins that participate in most physiological processes and serve as key pharmacological targets. Recent advances in structural biology of GPCRs have enabled the development of drugs based on structure (Structure Based Drug Design, SBDD). SBDD utilizes information about the receptor–ligand complex to search for suitable compounds, expanding the chemical space of search without the need for experimental screening. In our review we include a description of Structural-base Virtual Screening (SBVS) of ligands to GPCRs and a description of methods for functional testing of selected potential drug compounds. We also discuss recent advances in the development of SBDD approaches applicable to GPCRs and highlight successful examples of their use.

Keywords: drug development, GPCR, SBVS, functional tests