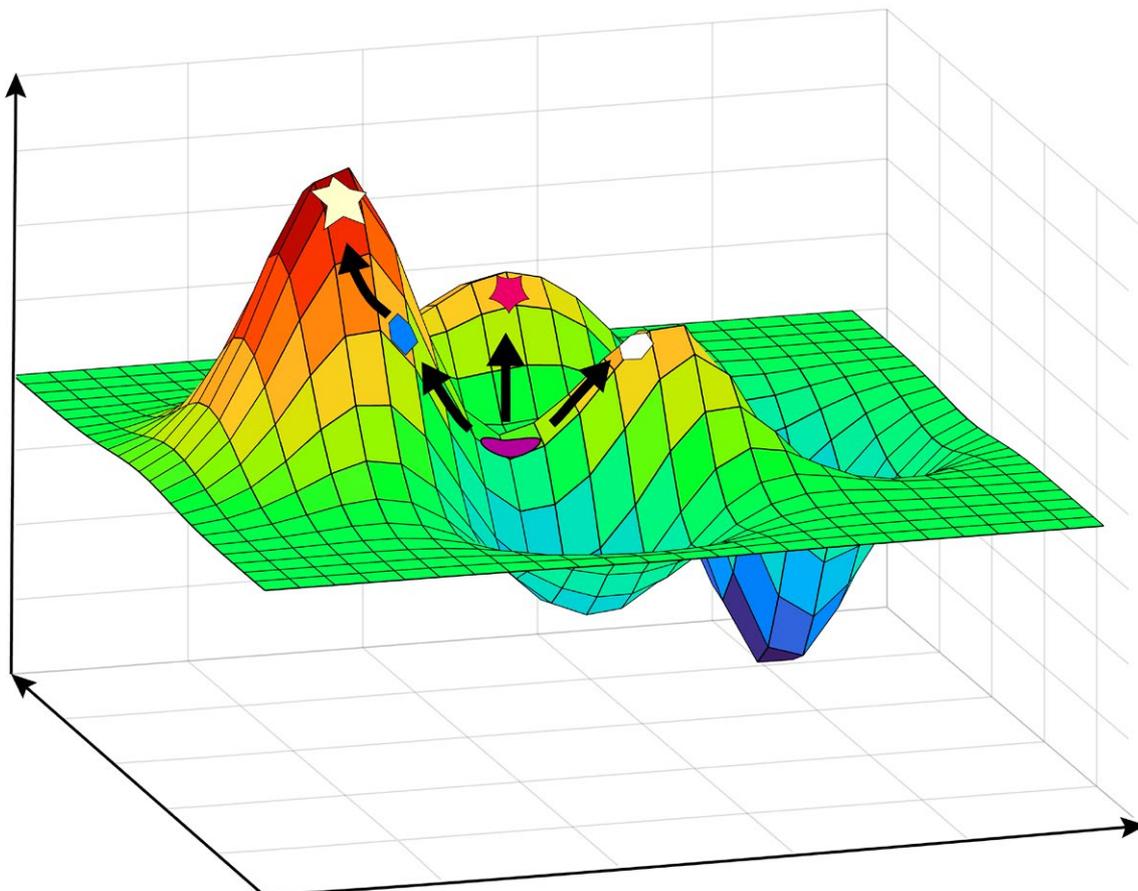


# Acta Naturae



**ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ**

**СТР. 11**

**ПОКАЗАТЕЛИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПОСЛЕ  
ВВЕДЕНИЯ «СПУТНИК ЛАЙТ» НА ДЛИТЕЛЬНЫХ СРОКАХ  
У НЕИНФИЦИРОВАННЫХ И ИНФИЦИРОВАННЫХ SARS-COV-2  
ДОБРОВОЛЬЦЕВ**

**СТР. 52**

**ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОДУКЦИЯ АНТИМИКРОБНЫХ  
ПЕПТИДОВ В ДРОЖЖАХ ПОЗВОЛЯЕТ ПРОВОДИТЬ  
МАССИРОВАННУЮ ОЦЕНКУ АКТИВНОСТИ  
ДНК-КОДИРУЕМЫХ АНТИМИКРОБНЫХ АГЕНТОВ *IN SITU***

**СТР. 71**

## Индукция синтеза шаперонов в нейрональных клетках человека блокирует старение, вызванное окислительным стрессом

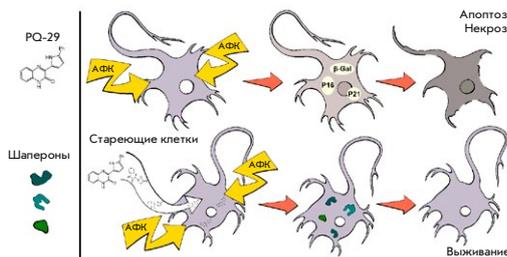


Иллюстрация принципа действия низкомолекулярных индукторов синтеза шаперонов для защиты нейрональных клеток от окислительного стресса

Е. А. Дутьшева, Л. С. Кузнецова, И. А. Утепова, Б. А. Маргулис, И. В. Гужова, В. Ф. Лазарев

Окислительный стресс сопровождается многими патологиями, характеризующиеся деградацией нейронов, приводя к более тяжелой форме течения этих заболеваний. Среди основных причин таких последствий – нарушение белкового гомеостаза и запуск необратимых процессов деградации клеточного цикла и клеточной физиологии, приводящих к старению. Предложен новый подход к борьбе со старением, вызванным окислительным стрессом, основанный на использовании низкомолекулярного индуктора синтеза шаперонов.

## Сочетание доксорубина в низкой дозе и SLURP-1 усиливает их противоопухолевый эффект и ассоциируется со снижением экспрессии EGFR

О. В. Шлепова, М. Л. Бычков, В. О. Шипунова, Е. И. Шрамова, М. А. Шулепко, Т. Я. Горностаева, Е. А. Киселева, И. Д. Кукушкин, В. А. Казаков, Е. А. Туховская, И. А. Дьяченко, А. Н. Мурашев, З. О. Шенкарев, С. М. Деев, М. П. Кирпичников, Е. Н. Люкманова

Злокачественные опухоли кожи, такие как плоскоклеточная карцинома (SCC), характеризуются высокой скоростью роста, метастазированием и часто встречающейся химиорезистентностью. Цитотоксический антибиотик доксорубин используется для лечения SCC, однако его применение ограничено из-за высокой токсичности. Нами изучено использование повышенной дозы SLURP-1 и комбинации SLURP-1 с низкой дозой доксорубина для лечения SCC у мышей, которым ксенотрансплантировали клетки эпидермоидной карциномы A431. Комбинация с доксорубином усиливала противоопухолевую активность SLURP-1 и значительно подавляла метастазирование. Эффект от комбинированной терапии сопровождался снижением экспрессии EGFR в опухолях. Показано прямое ингибирование активации EGFR белком SLURP-1. Токсичность комбинированной терапии не выявлена. Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности применения SLURP-1 в комбинации с химиотерапией в низких дозах при SCC и требуют дальнейшего изучения.

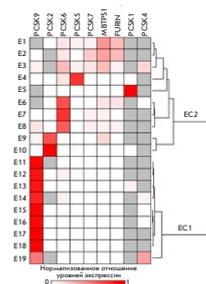


Схема введения препаратов и измерения роста опухоли

## Изменение экспрессии генов пробелокконвертаз в плоскоклеточных карциномах пищевода человека

А. А. Комиссаров, М. В. Зиновьева, А. В. Сасс, Т. В. Виноградова, С. И. Кошечкин, В. В. Демкин, И. Б. Зборовская, С. В. Костров, И. В. Демидюк

Пробелокконвертазы (ПБК) – это семейство белков, включающее девять высокоспецифичных субтилизинподобных сериновых эндопептидаз человека. С использованием количественной ПЦР в реальном времени проанализированы уровни экспрессии генов ПБК в парных образцах опухолевой и окружающей нормальной ткани, полученных от 19 пациентов с диагнозом плоскоклеточная карцинома пищевода. Обнаружено достоверное повышение представленности мРНК генов *PCSK6*, *PCSK9*, *MBTPS1* и *FURIN* в опухолевой ткани, что может указывать на вовлеченность данных ПБК в формирование и прогрессию злокачественных новообразований пищевода. Полученные данные указывают на то, что гены ПБК могут быть важными маркерами онкологических заболеваний человека.



Анализ паттернов изменения экспрессии генов ПБК при раке пищевода

# Acta Naturae

ТОМ 17, № 1 (64), ЯНВАРЬ—МАРТ 2025  
издается с апреля 2009 года

## Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,  
Национальный исследовательский университет  
«Высшая школа экономики»

## Редакционный совет:

Главные редакторы: А.Г. Габибов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,  
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,  
М.В. Угрюмов

## Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),  
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),  
И.П. Биленкина (Москва, Россия),  
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),  
Дж. Ву (Шанхай, Китай),  
В.М. Говорун (Москва, Россия),  
С.М. Деев (Москва, Россия),  
О.А. Донцова (Москва, Россия),  
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),  
М. Зуали (Париж, Франция),  
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),  
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),  
П. Массон (Гренобль, Франция),  
В.О. Попов (Москва, Россия),  
И.А. Тихонович (Москва, Россия),  
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),  
А. Фрибуле (Компьень, Франция),  
В.К. Швядас (Москва, Россия),  
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин

Верстка: К.К. Опарин

Корректурa: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

WEB-редактор: О.Б. Семина

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4

Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60

E-mail: actanaturae@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал  
*Acta Naturae* обязательна. Любое воспроизведение опубликованных  
материалов без письменного согласия редакции не допускается.  
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,  
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2025

Номер подписан в печать 29 марта 2025 г.

Тираж 25 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,

г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2



Основатель и председатель  
редакционного совета (с 2009 по 2023 г.)  
журнала *Acta Naturae*  
академик Григорьев Анатолий Иванович

Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих  
периодических изданий Высшей аттестационной  
комиссии Минобрнауки России

Включен в базы данных PubMed,  
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.0 (WOS); 3.5 (Scopus)

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

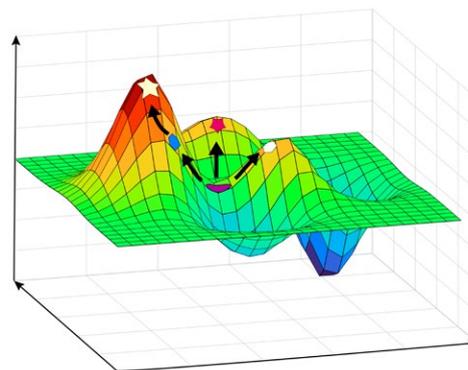
- А. А. Вартанян, В. С. Косоруков  
Провоспалительные цитокины  
в ферроптозе при раке..... 4
- С. В. Куприянов, К. М. Кириленко, Д. Н. Старков  
Иммунорегуляторные ферменты..... 11

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- О. П. Гаврилова, А. С. Орина, Т. Ю. Гагкаева,  
Н. Н. Гогина  
Токсинопродуцирующая способность  
штаммов гриба *Fusarium proliferatum*,  
выделенных из зерна..... 20

## СОДЕРЖАНИЕ

- Е. А. Дутьшева, Л. С. Кузнецова, И. А. Утепова,  
Б. А. Маргулис, И. В. Гужова, В. Ф. Лазарев  
**Индукция синтеза шаперонов в нейрональных  
клетках человека блокирует старение,  
вызванное окислительным стрессом** ..... 29
- А. Г. Емельянова, М. А. Золотовская,  
Е. В. Поддубская, А. А. Модестов,  
В. С. Прасолов, Д. В. Кузьмин, А. А. Буздин  
**Активация молекулярных путей ERK1/2  
и ее связь с патогенностью злокачественных  
опухолей человека** ..... 36
- Ф. М. Ижаева, А. И. Тухватулин,  
А. Ш. Джаруллаева, И. В. Должикова,  
О. В. Зубкова, Д. В. Щепляков, Н. Л. Лубенец,  
Е. А. Смолярчук, Т. Г. Зубкова, А. С. Ерохова,  
И. М. Черенкова, К. М. Бухтин, О. Попова,  
Н. М. Тухватулина, **Б. С. Народицкий**,  
Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург  
**Показатели гуморального иммунитета  
после введения «Спутник Лайт» на длительных  
сроках у неинфицированных и инфицированных  
SARS-CoV-2 добровольцев** ..... 52
- А. А. Комиссаров, М. В. Зиновьева, А. В. Сасс,  
**Т. В. Виноградова**, С. И. Кошечкин, В. В. Демкин,  
**И. Б. Зборовская**, С. В. Костров, И. В. Демидюк  
**Изменение экспрессии генов  
пробелоконвертаз в плоскоклеточных  
карциномах пищевода человека** ..... 64
- С. О. Пипия, А. О. Иванова, Ю. А. Мокрушина,  
И. Е. Елисеев, А. Г. Габиров, И. В. Смирнов,  
С. С. Терехов  
**Гетерологическая продукция  
антимикробных пептидов в дрожжах позволяет  
проводить массивную оценку активности  
ДНК-кодируемых антимикробных  
агентов *in situ*** ..... 71
- И. М. Студнева, Л. И. Серебрякова,  
О. М. Веселова, И. В. Доброхотов,  
М. Е. Палькеева, Д. В. Авдеев,  
А. С. Молокоедов, М. В. Сидорова,  
О. И. Писаренко  
**Галанин уменьшает ишемическое/  
реперфузионное повреждение сердца у крыс  
со стрептозотоциновым диабетом** ..... 78
- О. В. Шлепова, М. Л. Бычков,  
В. О. Шипунова, Е. И. Шрамова,  
М. А. Шулепко, Т. Я. Горностаева,  
Е. А. Киселева, И. Д. Кукушкин, В. А. Казаков,  
Е. А. Туховская, И. А. Дьяченко, А. Н. Мурашев,  
З. О. Шенкарев, С. М. Деев, М. П. Кирпичников,  
Е. Н. Люкманова  
**Сочетание доксорубина в низкой дозе  
и SLURP-1 усиливает их противоопухолевый  
эффект и ассоциируется со снижением  
экспрессии EGFR** ..... 87
- Zhipeng Zhang, Yanqin Ma, Yan He, Dong Wang,  
Huaian Song, Kun Yue, Xiaomei Zhang  
**Inhibition of HBV Replication by a Fully Humanized  
Neutralizing Antibody *In Vivo* and *In Vitro*** ..... 97
- КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ**
- С. В. Зубова, Я. В. Радзюкевич, Н. И. Косякова,  
И. Р. Прохоренко  
**Липополисахарид *Rhodobacter capsulatus*  
PG – потенциальный блокатор активации  
Toll-подобных рецепторов 2 и 4** ..... 106
- А. В. Недолужко, Ф. С. Шарко, С. М. Расторгуев  
**Межродовая геномная интрогрессия повышает  
адаптивный потенциал у девятиглай колюшки  
(*Pungitius pungitius*)** ..... 110
- Правила для авторов** ..... 114



**РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ**  
(см. статью Пипия и др.)

УДК 615.277.3:616-092.9

# Провоспалительные цитокины в ферроптозе при раке

А. А. Вартанян\*, В. С. Косоруков

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

\*E-mail: zhivotov57@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.2024

Принята к печати 22.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27547

**РЕФЕРАТ** Ферроптоз, или железозависимая регулируемая гибель клетки, индуцируется перекисным окислением полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов мембран и находится под контролем глутатионпероксидазы-4. В последние годы получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что резистентность к химио-, радио-, иммуно- и таргетной терапии опухоли тесно связана с резистентностью к ферроптозу. В обзоре обсуждаются молекулярные характеристики ферроптоза при раке. Значительное внимание уделено образованию иммуносупрессивного пространства на территории опухоли. Основной акцент сделан на вовлечение хронической избыточной продукции провоспалительных цитокинов в становлении резистентности к ферроптозу.

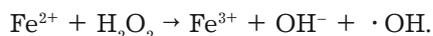
**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рак, ферроптоз, внутриопухолевая иммуносупрессия, провоспалительные цитокины.

**СОКРАЩЕНИЯ** Tf – трансферрин; TfR1 – рецептор трансферрина; FPN – ферропортин; GPX4 – глутатионпероксидаза-4; GSH – глутатион; xC-система – цистин-глутаматный антипортер; DAMP – (Damage-associated molecular patterns) молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями; PARP – поли(ADP-рибоза)-полимераза; CAF – (cancer-activated fibroblasts) активируемые опухолью фибробласты; MDSC – (myeloid-derived suppressor cells) миелоидные супрессорные клетки; Treg – регуляторные Т-лимфоциты; FDA – (Food and Drug Administration) Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами; IFN – интерферон; TNF – фактор некроза опухоли; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; IL-6 – интерлейкин-6.

## ВВЕДЕНИЕ

Концепция, согласно которой изменения в геноме опухолевой клетки вносят лишь небольшой вклад в прогрессию злокачественной опухоли, является общепринятой [1]. Поведение опухолевой клетки – выживание, пролиферацию и переход в метастатическую фазу роста – определяет микроокружение (внеклеточный матрикс, соседние нетрансформированные клетки, клетки иммунной системы, кровь). Микроокружение опухоли регулирует также резистентность к терапии [2].

Первое сообщение о ферроптозе, железозависимой форме гибели клетки, появилось в 2012 году [3]. При ферроптозе избыток ионов  $Fe^{2+}$ , находящихся в несвязанном с белками состоянии, запускает реакцию Фентона:



Реакционная способность гидроксил-радикала, генерируемого в ходе реакции Фентона, чрезвычайно

высока, он способен окислять практически любой компонент клетки. Центральным медиатором ферроптоза является накопление в клетке продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот [4]. Следует отметить, что активация ферроптоза не требует процессинга эффекторов клеточной смерти, например каспаз или газдерминов: ферроптоз энергетически менее затратная система гибели клетки. Интерес к ферроптозу заметно возрос после появления данных о чувствительности к нему опухолевых клеток, резистентных к химио-, радио- и таргетной терапии [5].

Переход опухоли в фазу агрессивного роста происходит в условиях неполного контроля иммунной системой. Установлена дисфункция как инфильтрирующих опухоль, так и циркулирующих Т-лимфоцитов (см. обзор [6]). Под влиянием опухоли значительным изменениям подвергаются и макрофаги: наблюдается поляризация макрофагов в M2-фенотип [7]. Цитокины, секретируемые опухолевыми клетками, привлекают в опухоль

Treg. Увеличение количества Treg в опухоли происходит на всех стадиях болезни, они подавляют пролиферацию и функциональную активность CD4+ и CD8+ T-клеток [8]. В супрессии иммунного ответа важную роль играют и MDSC [9]. Перепрограммирование противоопухолевого иммунитета, в результате которого иммунокомпетентные клетки микроокружения стимулируют рост первичных опухолей, и нестабильность генома опухолевой клетки сегодня рассматриваются как факторы, обеспечивающие защиту опухоли от иммунной системы и ее прогрессию.

В данном обзоре кратко обсуждаются особенности метаболизма железа при раке, основные характеристики ферроптоза, а также вовлечение хронической продукции провоспалительных цитокинов в прогрессию опухоли. Особое внимание уделено становлению резистентности опухоли к ферроптозу.

### ЖЕЛЕЗО В МИКРООКРУЖЕНИИ ОПУХОЛИ

До недавнего времени прогрессию опухоли изучали с точки зрения зависимости выживания опухолевых клеток от таких важнейших метаболитов, как глюкоза и глутамин. Сегодня, пожалуй, не осталось сомнений, что железо в микроокружении опухоли является не менее важной составляющей выживаемости опухолевых клеток. И это вполне понятно, поскольку железо в клетке выполняет ряд метаболически важных функций, доставляя кислород в ткани (в составе гема) или выступая кофактором ряда ферментов, например, рибонуклеотидредуктазы, участвующей в биосинтезе ДНК или ферментов цикла Кребса [10]. Регулируя запасы железа в опухоли, можно существенно влиять на пролиферацию опухолевых клеток. И конечно же, не стоит забывать, что железо используют не только опухолевые клетки, но и клетки микроокружения опухоли.

Клетки получают железо, в основном, с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза комплекса Tf /железо. Связывание комплекса Tf/железо со своим рецептором, TfR1 (CD71), приводит к интернализации комплекса Tf /железо/ CD71 в клетку. В клетке железо диссоциирует из комплекса в эндосомах, встраивается в железозависимые белки, а рецептор и Tf возвращаются на поверхность клетки [11]. Не связанное с белками железо депонируется в клетке благодаря формированию комплекса с ферритином [12]. Свободное, не связанное с белками и ферритином, железо экспортируется из клетки через мембраносвязанный белок, FPN, или становится частью лабильного пула железа [13]. Уровень железа в организме регулирует пептидный

гормон гепсидин. В ответ на повышение концентрации железа в крови в гепатоцитах активируются экспрессия гепсидина и его секреция в кровоток. Связывание гепсидина с FPN способствует интернализации обоих белков в клетку и их деградации в лизосомах. В результате блокируется выход железа из клеток-депо, что ведет к снижению содержания железа в плазме крови. В случае недостатка железа происходит подавление транскрипции гепсидина [14]. Связывание железа белками не только поддерживает жизнеспособность клетки, но и защищает клетки от высокорекреационноспособного гидроксильного радикала, генерируемого в реакции Фентона. Следует отметить, что наш организм для защиты от изменений в метаболизме железа выработал достаточно жесткие механизмы контроля. Это означает, что наши клетки не могут контролировать запасы железа только в экстремальных случаях, в число которых входят и онкологические заболевания.

На поддержание высокого индекса пролиферации опухолевыми клетками требуется значительно больше железа, поэтому для компенсации недостатка железа в опухолевых клетках повышается экспрессия TfR1. Опухолевые клетки накапливают также ферритин, депонируя железо. Изменяется и экспрессия FPN, экспортирующего железо из клетки. В большинстве злокачественных новообразований наблюдается снижение экспрессии FPN (см. обзор [15]). Следствием этих последовательных процессов является снижение уровня железа в крови и, соответственно, катастрофически низкий уровень гемоглобина у онкологических больных. Внутривенные инъекции легко усвояемых форм железа, нормализующие уровень гемоглобина при анемии, как правило, не повышают уровень гемоглобина у онкологических больных. Вскрытие показывает, что основная часть железа депонируется в печени [16]. Перепрограммирование метаболизма железа, способствующее его накоплению в опухолевой клетке, характерно для всех видов опухолей.

С агрессивным течением болезни сегодня связывают и мутации в опухолевой клетке. Важно отметить, что мутации во многих онкогенах (*c-myc*, *KRAS*, *BRAF*, *PI3K*), делеция в *PTEN* способствуют повышению уровня железа внутри клетки, а мутации в опухолевых генах-супрессорах (*p53*) – снижают лабильный пул железа [17, 18]. Для агрессивного течения опухолевого процесса необходимо также накопление в опухоли M2-макрофагов, секретирующих железо. Таким образом, для увеличения поступления железа и уменьшения его потери недостаточно инициировать изменения в экспрессии белков, контролирующих уровень железа в опу-

холевых клетках. Необходим также диалог между опухолевыми клетками и клетками микроокружения. И не стоит забывать, что микроокружение опухоли – это постоянно меняющаяся среда.

### **ФЕРРОПТОЗ – ЖЕЛЕЗОЗАВИСИМАЯ РЕГУЛИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТКИ**

В 2018 году Nomenclature Committee on Cell Death официально определил ферроптоз как регулируемую гибель клетки, вызванную аномальным окислением полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов мембран и контролируруемую GPX4.

Эта форма гибели клетки связана с генерацией гидроксильного радикала в реакции Фентона. При ферроптозе  $\text{HO}\cdot$  атакует ПНЖК фосфолипидов мембран. Чаще остальных перекисному окислению подвергается фосфатидилэтаноламин, содержащий в качестве полиненасыщенной жирной кислоты арахидоновую ( $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ) или адреновую ( $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_2$ ) кислоты. Продукты перекисного окисления фосфолипидов мембран в опухолевой клетке накапливаются не только в результате активации реакции Фентона, но и при снижении активности антиоксидантной системы защиты клетки. Система антиоксидантной защиты включает селенопротеин GPX4 и GSH [19]. Используя GSH в качестве донора электронов, GPX4 восстанавливает потенциально опасные гидроперекиси липидов в нетоксичные спирты. Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой, конститутивно активированной в клетке [20]. Детоксикация перекисей липидов под действием GPX4 лимитируется присутствием в клетке цистина, предшественника GSH, который поступает через xC-систему [21]. В клетке происходит обмен глутамата на цистин в соотношении 1 : 1. Цистин восстанавливается до цистеина различными редуктазами, включая тиоредоксинредуктазу-1, и используется в качестве строительного блока для биосинтеза GSH. Ключевая роль xC-системы в прогрессии заболевания подтверждается и результатами клинических наблюдений: частота рецидивов xC-позитивных опухолей значительно выше, чем xC-негативных. GPX4 и xC-система рассматриваются как потенциальные мишени, воздействуя на которые можно изменить редокс-статус клетки. «Золотым стандартом» индукции ферроптоза продолжает оставаться эрастин, блокирующий поступление цистина в клетку. Вторая группа индукторов ферроптоза включает ингибиторы GPX4 (в основном RSL3 и RSL5 – RAS related lethal 3 и RAS related lethal 5).

Перекисное окисление фосфолипидов нарушает белок-липидные взаимодействия, изменяет активность мембраносвязанных ферментов, влияет

на проницаемость мембраны. Непрерывное интенсивное окисление ПНЖК фосфолипидов мембран приводит к возникновению разрывов в плазматической мембране и вытеканию содержимого клетки в межклеточную среду. DAMP в микроокружении опухоли (их можно разделить на две подгруппы – адъювант и антиген) способствуют усилению инфильтрации опухоли CD8+ Т-клетками, созреванию дендритных клеток, повышению фагоцитарной активности макрофагов [22, 23]. Таким образом, ферроптоз в опухолевых клетках вовлекается не только в прямую индукцию гибели клеток, но также в перепрограммирование иммунной системы, формируя специфический иммунный ответ на опухолевые антигены, что должно вести к уничтожению еще какой-то части опухолевых клеток.

Онкосупрессорная роль ферроптоза впервые была показана на трижды негативном раке молочной железы [24]. Выраженная зависимость роста опухоли от глутамина указывала на снижение активности xC-системы в поглощении цистина. Далее установили, что сорафениб, ингибитор тирозинкиназ, истощает запасы глутатиона в клетке, блокируя xC-систему, и запускает ферроптоз [25]. Аналогичным эффектом обладали и ингибиторы PARP [26]. Индуцируют ферроптоз в опухолевых клетках и соединения, блокирующие активность GPX4 (например, алкилирующий агент альтрета-мин, одобренный FDA) [27]. Интересно отметить, что резистентность к иммунотерапии PD-1/PD-L1 также связывают с резистентностью к ферроптозу [28]. Даже упомянутые в столь кратком обзоре клинические данные указывают на то, что ферроптоз должен вносить определенный вклад в реализацию эффектов противоопухолевых препаратов.

### **МИКРООКРУЖЕНИЕ В ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛИ**

Постоянное увеличение массы опухоли при далеко несовершенной системе кровоснабжения опухоли сопровождается частичной гибелью клеток. Погибающие клетки вызывают продукцию провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$  и - $\beta$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  и некоторых других) [29]. Роль этих цитокинов заключается в регуляции иммунного ответа организма на воспаление, вызванное повреждением ткани. В ответ на иммуностимулирующие сигналы, выбрасываемые погибающими клетками, в микроокружение опухоли мигрируют иммунокомпетентные клетки, которые начинают секретировать провоспалительные цитокины. Высокие концентрации провоспалительных цитокинов переводят опухоль в фазу более агрессивного роста [30]. По мере увеличения опухолевой массы повышается количество погибающих опухолевых клеток и количество

антигенов в микроокружении опухоли: воспаление переходит в хроническое. Хроническая избыточная экспрессия провоспалительных медиаторов наблюдается на всех стадиях развития рака: выраженность воспаления в метастатических опухолях значительно повышена по сравнению с ранними стадиями заболевания [31].

Молекулярные изменения, инициируемые адаптацией опухоли к нехватке питания, кислорода и энергии, активируют резидентные покоящиеся фибробласты. Фибробласты опухолевой ткани (CAF) практически заново создают внеклеточный матрикс, секретируя виментин, ламинин, фибронектин и коллаген, основной каркасный белок внеклеточного матрикса. Уплотнение внеклеточного матрикса стимулирует рост злокачественной опухоли. Жесткость внеклеточного матрикса действует так же, как барьер, препятствующий проникновению лекарственных средств в опухоль (см. обзор [32]).

Недостаток питания при стремительном росте опухоли сопровождается образованием очагов некроза. В межклеточную среду выбрасываются DAMP, что приводит к опосредованному дендритными клетками захвату и презентации антигена, индукции ответа цитотоксических Т-клеток. По мере прогрессии опухоли реактивный статус Т-лимфоцитов снижается. Т-клетки переходят в состояние анергии, характеризующееся снижением цитолитической активности, а также снижением индекса пролиферации Т-клеток (см. обзор [33]).

В иммунный ответ на DAMP вовлекаются и макрофаги (см. обзор [34]). Цитотоксическая активность макрофагов на начальных этапах инфильтрации опухоли макрофагами сдерживает прогрессию опухоли, однако ее недостаточно для контроля опухолевого роста. Противоопухолевый иммунный ответ подавляется поляризацией макрофагов в M2-фенотип. Секретируя ростовые факторы, цитокины и компоненты внеклеточного матрикса, M2-макрофаги увеличивают злокачественный потенциал опухолевых клеток.

Центральным звеном регуляции иммунного ответа как на опухолевые, так и на собственные антигены, являются Treg. В норме Treg препятствуют развитию аутоиммунных заболеваний. Основная функция Treg в опухоли сводится к блокаде пролиферации CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (см. обзор [35]). И, что чрезвычайно важно, Treg создают на территории опухоли иммунодефицитное пространство, которое позволяет там жить и бактериям. Показано, что увеличение количества Treg в опухоли независимо от других клинических факторов вызывает статистически значимое увеличение смертности от рака простаты [36].

Для поддержания иммуносупрессии опухоль рекрутирует из крови MDSC. При злокачественных новообразованиях миелоидные супрессоры подавляют ответ Т- и NK-клеток. MDSC также экспрессируют CD40, индуцирующей накопление Treg в микроокружении опухоли (см. обзор [37]). Интересно отметить, что Treg, MDSC и M2-макрофаги резистентны к ферроптозу, а CD8<sup>+</sup> Т-клетки чувствительны к Fe-зависимой гибели [38].

### **ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ИНТЕРЛЕЙКИНЫ В МИКРООКРУЖЕНИИ ОПУХОЛИ**

Интерлейкины, низкомолекулярные белки, синтезируются преимущественно клетками иммунной системы и подразделяются на провоспалительные (IL-1, -6, -12, TNF- $\alpha$ , интерфероны, хемокины, IL-8 и др.) и противовоспалительные – IL-4, -10, -13, -17 (см. обзор [39]).

В микроокружении опухоли доминирует экспрессия IL-6 (см. обзор [40]). Уровень IL-6 повышен при раке молочной железы, шейки матки, толстой кишки, пищевода, головы и шеи, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, а также у пациентов с немелкоклеточным раком легкого и множественной миеломой [41]. Накоплен огромный клинический материал, подтверждающий корреляцию IL-6 с резистентностью к терапии [42] и активацией метастазирования (см. обзор [43]). Связывание IL-6 со своим рецептором (IL-6Ra, gp80) и корецептором gp130 активирует сигнальный путь JAK2/STAT3 [44]. STAT3 принадлежит к семейству проонкогенных транскрипционных факторов, тесно связанных с ингибированием апоптоза и пролиферацией опухолевых клеток, активацией метастазирования и ангиогенеза [45]. Гиперактивация сигнального пути IL-6/IL-6R/JAK2/STAT3 наблюдается практически при всех типах опухолей [46]. Важно отметить, что уровень IL-6, циркулирующего в крови больных, является прогностическим маркером как течения болезни, так и ответа опухоли на терапию [47].

В микроокружении опухоли в высоких концентрациях обнаруживаются и IL-1 $\alpha$ , и IL-1 $\beta$  [48]. Уровень IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  заметно повышен при меланоме, раке толстой кишки, легкого, молочной железы, опухолей головы и шеи и связан с переходом опухоли в агрессивную фазу роста [49]. Во время генотоксического стресса повышение продукции IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  и их секреция активируют кровоснабжение опухоли (см. обзор [50]). Имеются также данные о корреляции экспрессии IL-1 $\beta$  с формированием отдаленных метастазов [51]. Связывание IL-1 $\alpha$  со своим рецептором активирует экспрессию проонкогенного транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, ко-

торый блокирует Fas-зависимый апоптоз и создает условия для выживания и прогрессии опухоли [52]. Становится очевидным, что высокие концентрации провоспалительных цитокинов в микроокружении опухоли являются органическими составляющими роста злокачественной опухоли. Многие недавние исследования подтверждают представление о том, что прогрессия злокачественных новообразований обеспечивается эффектом «тлеющего» воспаления.

### **ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ В ФЕРРОПТОЗЕ ПРИ РАКЕ**

Как отмечено выше, опухоль перепрограммирует метаболизм железа, способствуя его накоплению в клетке. Казалось бы, высокие концентрации железа внутри опухолевой клетки должны активировать ферроптоз. Однако в опухоли ферроптоз блокирован. На клетках плоскоклеточного рака головы и шеи показано, что IL-6 стимулирует экспрессию белков хС-системы [53]. Ингибирование хС-системы в этих клетках восстанавливало ферроптоз. Генетическое выведение из строя (нокдаун) белков хС-системы снижало пролиферацию клеток *in vitro*. Таким образом экспериментально подтверждено, что провоспалительный цитокин, IL-6, блокирует ферроптоз, активируя хС-систему. Вовлечение внутриопухолевой иммуносупрессии в блокирование ферроптоза подтверждено и на моделях подкожных ксенотрансплантатов опухолей у мышей. RSL3, ингибитор GPX4, подавлял рост опухоли у бестимусных голых мышей [54]. В другом исследовании показан противоопухолевый эффект IKE (имидазолкетонэрастин, индуктор ферроптоза) в модели лимфомы у мышей с иммунодефицитом [55].

В индукции ферроптоза в опухолевой клетке участвуют и другие провоспалительные цитокины. На клетках гепатоцеллюлярной карциномы показано, что IFN- $\gamma$  блокирует транскрипцию гена *SLC7A11*, кодирующего субъединицу хС-системы [56]. В условиях дефицита GSH накопление продуктов перекисного окисления фосфолипидов запускает ферроптоз. Экспрессию *SLC7A11* и *SLC3A2* в опухолевых клетках подавлял и TNF- $\alpha$ : снижение поступления цистина приводило к гибели клетки в результате развития окислительного стресса [57]. Важно отметить, что индуцированный IFN- $\gamma$  или TNF- $\alpha$  ферроптоз может реализоваться только на начальных стадиях болезни, при переходе опухоли в фазу агрессивного роста происходит смещение в сторону секреции IL-6. В агрессивной фазе роста внутриопухолевая концентрация IL-6 многократно превышает уровень других цитокинов: ферроптоз в клетках с высокозлокачественным фенотипом заблокирован [58].

Следующим регулятором воспаления, сопряженного с онкогенезом, является транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, который активируется в ответ на провоспалительные цитокины, инсулиноподобный фактор роста, фактор некроза опухолей. NF- $\kappa$ B участвует в регуляции контроля клеточного цикла и пролиферации, адгезии и миграции, в ангиогенезе и инвазии (см. обзор [59]). Получено экспериментальное доказательство участия NF- $\kappa$ B и в ферроптозе. На клетках U87 глиобластомы показано, что RSL3, ингибитор GPX4, активирует сигнальный путь NF- $\kappa$ B. Активная NF- $\kappa$ B запускает ферроптоз, снижая экспрессию *SLC7A11* – субъединицу хС-системы и GPX4 [60]. В результате повышается концентрация гидропероксидов липидов и запускается ферроптоз. В подкожных ксенотрансплантатах ингибирование NF- $\kappa$ B BAY 11-7082 отменяло противоопухолевый эффект RSL3. И, подводя итоги, в процессе прогрессии опухоли вырабатывает механизмы, позволяющие ей избегать ферроптоз. По всей видимости, резистентность к ферроптозу на фоне высоких внутриклеточных концентраций железа является еще одной детерминантой, позволяющей опухоли уйти от противоопухолевой терапии. Выявленная резистентность к ферроптозу, индуцированная провоспалительным микроокружением опухоли, не только расширяет наши знания о механизмах, лежащих в основе прогрессии злокачественного заболевания, но и смещает акценты в интерпретации значения внутриопухолевой иммуносупрессии в канцерогенезе. Учитывая конститутивную активность сигнального пути IL-6/JAK2/STAT3 при злокачественных заболеваниях [61], резистентность к ферроптозу может рассматриваться как необходимое условие прогрессии опухоли.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Хотя программы ранней диагностики злокачественных новообразований заметно улучшили выживаемость онкологических больных, серьезным препятствием в лечении рака по-прежнему остается лекарственная устойчивость. Обнаружение того факта, что клетки, уцелевшие при химио-, радио- и таргетной терапии, чувствительны к ферроптозу, значительно повысило интерес к ферроптозу. Гибель резистентной к терапии клетки становится возможной благодаря добавлению дополнительного окислительного стресса гидроксильными радикалами, генерируемыми в реакции Фентона: антиоксидантная система защиты клетки практически полностью разрушается. Стратегии использования ферроптоза в лечении метастазов открывают новые возможности в терапии рака. В доклинических моделях индукторы ферроптоза вызывали

относительно ограниченные токсические эффекты в нормальных клетках и демонстрировали хорошую переносимость. В рандомизированном исследовании Functional Assessment of Cancer Therapy-Lung Cancer на пациентах с немелкоклеточным раком легкого было показано, что гуманизированные антитела к IL-6 (ALD518) замедляли кахексию, снижая потерю веса с 1.5 кг/месяц до 0.19 кг/месяц и повышали безрецидивную выживаемость больных на 2.2 месяца [62]. На рост опухоли ALD518 существенно не влиял. По всей видимости, использования анти-IL-6-антител недостаточно для блокирования роста опухоли, хотя монотерапия и улучшает качество жизни больных. Существенный интерес вызывают предварительные результаты клинического изучения применения комбинации индукторов ферроптоза с противоопухолевыми препаратами при раке

яичника, тройном негативном раке молочной железы, раке простаты, колоректальном раке, гепатоцеллюлярной карциноме (см. обзор [63]). Кроме того, можно надеяться, что потенциальная способность ферроптоза вызывать специфический иммунный ответ, которая усиливает терапевтический эффект других методов лечения (см. обзор [64]), приведет к продлению ремиссии у онкологических больных. ●

*Исследование выполнено в рамках  
Государственного задания «Экспериментальная  
разработка новых лекарственных средств  
для терапии злокачественных опухолей»  
(№ 123022100036-8).*

*Авторы заявляют об отсутствии  
конфликта интересов.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- de Visser K.E., Joyce J.A. // *Cancer Cell*. 2023. V. 41. № 3. P. 374–403.
- Al-Akra L., Bae D.H., Leck L.Y.W., Richardson D.R., Jansson P.J. // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2019. V. 1863. № 9. P. 1390–1397.
- Dixon S.J., Stockwell B.R. // *Cell*. 2012. V. 49. P. 1060–1072.
- Mou Y., Wang J., Wu J., He D., Zhang C., Duan C., Li B. // *J. Hematol. Oncol.* 2019. V. 12. № 1. P. 34.
- Friedmann Angeli J.P., Krysko D.V., Conrad M. // *Nat. Rev. Cancer*. 2019. V. 19. № 7. P. 405–414.
- Martínez-Lostao L., Anel A., Pardo J. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 22. P. 5047–5056.
- Li M., Yang Y., Xiong L., Jiang P., Wang J., Li C. // *J. Hematol. Oncol.* 2023. V. 16. № 1. P. 80.
- Ohue Y., Nishikawa H. // *Cancer Sci.* 2019. V. 110. № 7. P. 2080–2089.
- Gabrilovich D.I. // *Cancer Immunol. Res.* 2017. V. 5. № 1. P. 3–8.
- Zhang D.L., Ghosh M.C., Rouault T.A. // *Front. Pharmacol.* 2014. V. 5. P. 124–129.
- Wallace D.F. // *Clin. Biochem. Rev.* 2016. V. 37. № 2. P. 51–62.
- Plays M., Müller S., Rodriguez R. // *Metallomics*. 2021. V. 13. № 5. P. mfab021.
- Drakesmith H., Nemeth E., Ganz T. // *Cell Metabolism*. 2015. V. 22. № 5. P. 777–787.
- Vela D., Vela-Gaxha Z. // *Exp. Mol. Med.* 2018. V. 50. № 2. P. e436.
- Ludwig H., Evstatiev R., Kornek G., Aapro M., Bauernhofer T., Buxhofer-Ausch V., Fridrik M., Geissler D., Geissler K., Gisslinger H., et al. // *Wien Klin. Wochenschr.* 2015. V. 127. № 23–24. P. 907–919.
- Kew M.C. // *Liver Cancer*. 2014. V. 3. № 1. P. 31–40.
- Horniblow R.D., Bedford M., Hollingworth R., Evans S., Sutton E., Lal N., Beggs A., Iqbal T., Tselepis C. // *Cancer Sci.* 2017. V. 108. P. 1135–1143.
- Zhang F., Wang W., Tsuji Y., Torti S.V., Torti F.M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 33911–33918.
- Brigelius-Flohe R., Maiorino M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1830. P. 3289–3303.
- Meister A. // *Meth. Enzymol.* 1995. V. 251. P. 3–7.
- Liu J., Xia X., Huang P. // *Mol. Ther.* 2020. V. 28. № 11. P. 2358–2366.
- Murao A., Aziz M., Wang H., Brenner M., Wang P. // *Apoptosis*. 2021. V. 26. № 3–4. P. 152–162.
- Roussot N., Ghiringhelli F., Rébé C. // *Cells*. 2022. V. 11. № 22. P. 3672.
- Liu Y., Hu Y., Jiang Y., Bu J., Gu X. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 1036140.
- Li Q., Chen K., Zhang T., Jiang D., Chen L., Jiang J., Zhang C., Li S. // *Eur. J. Pharmacol.* 2023. V. 955. P. 175913.
- Hong T., Lei G., Chen X., Li H., Zhang X., Wu N., Zhao Y., Zhang Y., Wang J. // *Redox Biol.* 2021. V. 42. P. 101928.
- Morcos C.A., Khattab S.N., Haiba N.S., Bassily R.W., Abu-Serie M.M., Teleb M. // *Bioorg. Chem.* 2023. V. 141. P. 106839.
- Yin J., Meng X., Peng L., Xie W., Liu X., He W., Li S. // *Curr. Mol. Med.* 2023. V. 23. № 5. P. 401–409.
- Dinarello C.A. // *Cancer Metastasis Rev.* 2006. V. 25. № 3. P. 307–313.
- Goenka A., Khan F., Verma B., Sinha P., Dmello C.C., Jogalekar M.P., Gangadaran P., Ahn B.C. // *Cancer Commun. (London)*. 2023. V. 43. № 5. P. 525–561.
- Inácio Pinto N., Carnier J., Oyama L.M., Otoch J.P., Alcântara P.S., Tokeshi F., Nascimento C.M. // *Mediators Inflamm.* 2015. V. 2015. P. 791060.
- Lavie D., Ben-Shmuel A., Erez N., Scherz-Shouval R. // *Nat. Cancer*. 2022. V. 3. № 7. P. 793–807.
- Farhood B., Najafi M., Mortezaee K. // *J. Cell Physiol.* 2019. V. 234. № 6. P. 8509–8521.
- Pan Y., Yu Y., Wang X., Zhang T. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 583084.
- Ohue Y., Nishikawa H. // *Cancer Sci.* 2019. V. 110. № 7. P. 2080–2089.
- Karpishev V., Mousavi S.M., Sheykholeslami N., Fathi M., Saray M., Aghebati-Maleki L., Jafari R., Zolbanin N., Jadidi-Niaragh F. // *Life Sci.* 2021. V. 284. P. 119132.
- Hegde S., Leader A.M., Merad M. // *Immunity*. 2021. V. 54. № 5. P. 875–884.
- Kim R., Taylor D., Vonderheide R.H., Gabrilovich D.I. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2023. V. 44. № 8. P. 542–552.
- Briukhovetska D., Dörr J., Endres S., Libby P., Dinarello C.A., Kobold S. // *Nat. Rev. Cancer*. 2021. V. 21. № 8. P. 481–499.

40. Uciechowski P, Dempke W.C.M. // *Oncology*. 2020. V. 98. № 3. P. 131–137.
41. Heikkilä K., Ebrahim S., Lawlor D.A. // *Eur. J. Cancer*. 2008. V. 44. № 7. P. 937–945.
42. Kumari N., Dwarakanath B.S., Das A., Bhatt A.N. // *Tumour Biol*. 2016. V. 37. № 9. P. 11553–11572.
43. Goulet C.R., Champagne A., Bernard G., Vandal D., Chabaud S., Pouliot F., Bolduc S. // *BMC Cancer*. 2019. V. 19. № 1. P. 137.
44. Taher M.Y., Davies D.M., Maher J. // *Biochem. Soc. Trans*. 2018. V. 46. № 6. P. 1449–1462.
45. Li Y.J., Zhang C., Martincuks A., Herrmann A., Yu H. // *Nat. Rev. Cancer*. 2023. V. 23. № 3. P. 115–134.
46. El-Tanani M., Al Khatib A.O., Aladwan S.M., Abuelhana A., McCarron P.A., Tambuwala M.M. // *Cell Signal*. 2022. V. 92. P. 110275.
47. Łukaszewicz M., Mroczo B., Szmitkowski M. // *Pol. Arch. Med. Wewn*. 2007. V. 117. № 5–6. P. 247–251.
48. Baker K.J., Houston A., Brint E. // *Front Immunol*. 2019. V. 10. P. 1197–1205.
49. Gelfo V., Romaniello D., Mazzeschi M., Sgarzi M., Grilli G., Morselli A., Manzan B., Rihawi K., Lauriola M. // *Int. J. Mol. Sci*. 2020. V. 21. № 17. P. 6009.
50. Voronov E., Shouval D.S., Krelin Y., Cagnano E., Benharroch D., Iwakura Y., Dinarello C.A., Apte R.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 5. P. 2645–2650.
51. Apte R.N., Dotan S., Elkabets M., White M.R., Reich E., Carmi Y., Song X., Dvozkin T., Krelin Y., Voronov E. // *Cancer Metastasis Rev*. 2006. V. 25. № 3. P. 387–408.
52. Diep S., Maddukuri M., Yamauchi S., Geshow G., Delk N.A. // *Cells*. 2022. V. 11. № 1. P. 1673.
53. Li M., Jin S., Zhang Z., Ma H., Yang X. // *Cancer Lett*. 2022. V. 527. P. 28–40.
54. Yang J., Mo J., Dai J., Ye C., Cen W., Zheng X., Jiang L., Ye L. // *Cell Death Dis*. 2021. V. 12. № 11. P. 1079.
55. Zhang Y., Tan H., Daniels J.D., Zandkarimi F., Liu H., Brown L.M. // *Cell Chem. Biol*. 2019. V. 26. № 5. P. 623–633.
56. Li L., Xing T., Chen Y., Xu W., Fan B., Ju G., Zhao J., Lin L., Yan C., Liang J., Ren X. // *Cell Death Discov*. 2023. V. 9. № 1. P. 331.
57. Yin J., Meng X., Peng L., Xie W., Liu X., He W., Li S. // *Curr. Mol. Med*. 2023. V. 23. № 5. P. 401–409.
58. Rašková M., Lacina L., Kejík Z., Venhauerová A., Skaličková M., Kolář M., Jakubek M., Rosel D., Smetana K., Brábek J. // *Cells*. 2022. V. 22. P. 3698.
59. Taniguchi K., Karin M. // *Nat. Rev. Immunol*. 2018. V. 18. № 5. P. 309–324.
60. Li S., He Y., Chen K., Sun J., Zhang L., He Y., Yu H., Li Q. // *Oxid. Med. Cell Longev*. 2021. P. 2915019.
61. Huang B., Lang X., Li X. // *Front. Oncol*. 2022. V. 12. P. 1023177.
62. Bayliss T.J., Smith J.T., Schuster M., Dragnev K.H., Rigas J.R. // *Expert. Opin. Biol. Ther*. 2011. V. 11. № 12. P. 1663–1668.
63. Liu X., Zhang Y., Wu X., Xu F., Ma H., Wu M., Xia Y. // *Front. Pharmacol*. 2022. V. 13. P. 909821.
64. Qi D., Peng M. // *Front. Immunol*. 2023. V. 14. P. 1188365.

УДК 571.27

# Иммунорегуляторные ферменты

С. В. Куприянов\*, К. М. Кириленко, Д. Н. Старков

Томский государственный университет, лаборатория эволюционной цитогенетики, Томск, 634050 Россия

\*E-mail: pfft@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2024

Принята к печати 06.12.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27549

**РЕФЕРАТ** Иммунорегуляторные ферменты, обладающие активностью и биологических катализаторов, и регуляторных элементов, играют ключевую роль в контроле иммунных реакций, а нарушение функций этих белков может быть причиной различных патологических состояний, таких как супрессия противоопухолевого иммунного ответа или нарушение противоинфекционного иммунитета. В данном обзоре описаны такие наиболее изученные иммунорегуляторные ферменты, как индоламин-2,3-диоксигеназа 1, аргиназа 1, индуцибельная синтаза оксида азота, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза 1, приведена их классификация, рассмотрены особенности, присущие представителям данной группы. Рассмотрены также новые направления медицинского применения иммунорегуляторных ферментов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** иммунометаболизм, регуляция иммунного ответа, ферментативная регуляция.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** IDO1 – индоламин-2,3-диоксигеназа 1; ARG1 – аргиназа 1; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; IFN- $\gamma$  – интерферон-гамма; Th1 – Т-хелперы 1 типа; AhR – рецептор ароматических углеводов; Th2 – Т-хелперы 2 типа; PBMС – мононуклеарные клетки периферической крови; iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота; NO – оксид азота; IL-12 – интерлейкин 12; Th17 – Т-хелперы 17 типа; ENTPD1 – эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза 1; PAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами.

## ВВЕДЕНИЕ

Основная задача иммунной системы – сохранение постоянства внутренней среды организма путем борьбы с чужеродными агентами – патогенами, а также с собственными измененными клетками [1]. Речь идет не только об опухолевых клетках, но и о клетках иммунной системы, бесконтрольная деятельность которых может наносить вред организму, что проявляется в аутоиммунной или аллергической патологии. Таким образом, контроль иммунной системы можно рассматривать как центральное звено обеспечения ее нормальной функции.

Метаболизм клеток иммунной системы отличается от метаболизма других систем организма. Многие специфические функции иммунных клеток, такие как пролиферация в ответ на антиген или синтез и высвобождение повреждающих агентов для защиты от патогенов, требуют изменения метаболических процессов [2]. Так, обязательным условием активации многих типов лимфоцитов является включение «эффекта Варбурга», который характеризуется тем, что пируват, полученный в реакциях гликолиза, не используется пируватдегидрогеназным комплек-

сом, а переходит в лактат, но при отсутствии гипоксии, что отличает «эффект Варбурга» от анаэробного гликолиза [3]. Особенности метаболических процессов при иммунном ответе изучает область иммунометаболизма [4]. Одним из ее направлений является регуляция иммунного ответа с помощью метаболических процессов. Особую роль в этом играют иммунорегуляторные ферменты. В настоящее время нет четкого определения, что является иммунорегуляторным ферментом. Описан лишь ряд представителей, таких как индоламин-2,3-диоксигеназа 1 (IDO1) [5], аргиназа 1 (ARG1) [6], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) [7] и др. Целью данного обзора является систематизация современных представлений об иммунорегуляторных ферментах.

Важно подчеркнуть, что метаболическая регуляция иммунного процесса осуществляется не только на уровне отдельных ферментов, но и на уровне метаболических путей [8, 9]. Гликолиз является важным процессом, регулирующим активацию Т-лимфоцитов, однако для его обеспечения необходима работа нескольких ферментов. В представленном обзоре мы не называем такие ферменты иммунорегуляторными, так как они являются

частью регуляторного метаболического пути. С другой стороны, достаточно экспрессии одного только фермента IDO1 для изменения работы иммунной системы [5], и данный фермент работает как самостоятельное звено регуляции. Такие ферменты и рассмотрены в обзоре. Изучение иммунорегуляторных ферментов находится в начале своего развития, поэтому необходимо привести ряд ферментов с известными иммунорегуляторными свойствами, а далее, на основе этих ферментов, дать определение группы таких ферментов в целом. В данной работе будут описаны индоламин-2,3-диоксигеназа 1, аргиназа 1, индуцибельная синтаза оксида азота, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза 1, так как эти ферменты являются наиболее изученными представителями группы иммунорегуляторных ферментов и отражают основные механизмы регуляции. На основе описания данных белков построена классификация иммунорегуляторных ферментов по механизму и месту приложения их действия.

### IDO1

Индоламин-2,3-диоксигеназа 1 (IDO1) является одним из ферментов катаболизма триптофана [10], специфичность которого не ограничивается триптофаном. Иммуносупрессивное действие IDO1 связано с превращением триптофана в кинуренины. IDO1 экспрессируется антигенпрезентирующими клетками [11] и сильно стимулируется интерфероном-гамма (IFN- $\gamma$ ) [12]. Примечательно, что иммуносупрессивное действие IDO1 наиболее выражено в отношении Т-хелперных клеток типа 1 (Th1) [13], которые продуцируют IFN- $\gamma$  [14]. Таким образом может формироваться отрицательная обратная связь, ограничивающая избыточную пролиферацию данных клеток.

Выделяют следующие механизмы иммунорегуляторного действия IDO1:

- истощение триптофана [15];
- продукция кинуренинов, действующих через рецептор ароматических углеводов (AhR) [16];
- неферментативная функция в качестве сигнального белка [17].

Опосредованная IDO1-иммуносупрессия поддерживает иммунологическую толерантность в привилегированных органах, таких как плацента [18], роговица глаза [19].

Известен ряд патологических состояний, при которых наблюдается дисфункция системы IDO1, например, экспрессия данного фермента в опухолях приводит к ускользанию опухолей от иммунного надзора, что способствует прогрессированию за-

болевания [20]. Некоторые патогены также научились использовать IDO1 для подавления иммунной системы хозяина. Например, *Leishmania major* и *L. donovani* способны индуцировать экспрессию IDO1 в дендритных клетках человека, что приводит к ингибированию пролиферации лимфоцитов и нарушению иммунного ответа [21]. С другой стороны, выявлен антибактериальный эффект IDO1 в отношении ряда патогенов, который реализуется за счет истощения эссенциального субстрата – триптофана [22]. Ингибиторы IDO1 хорошо изучены в качестве противоопухолевых агентов, однако их клиническая эффективность остается ограниченной, несмотря на положительные результаты доклинических исследований, возможно, из-за активации альтернативных механизмов иммуносупрессии [23].

### ARG1

Аргиназа 1 (ARG1) катаболизирует аргинин до орнитина и мочевины [24]. Этот фермент проявляет регуляторную активность, связанную с истощением аргинина, который является эссенциальной аминокислотой для иммунных клеток [25]. В среде с активной аргиназой и дефицитом аргинина наблюдается подавление активации и дифференцировки Т-клеток (данный механизм не работает при избытке аргинина) [26]. На мышинных моделях показано, что в ответ на продукцию цитокинов клетками Th2 макрофаги экспрессируют аргиназу, что приводит к регуляции численности Th2-клеток и воспаления, индуцируемого данной клеточной популяцией [27]. Экспрессия ARG1 иммунными клетками человека также связана с регуляцией иммунного ответа. Показано, что нейтрофилы, выделенные из крови пациентов с сепсисом, могут подавлять пролиферацию CD8+ Т-лимфоцитов при совместном культивировании клеток за счет экспрессии ARG1 [28]. Также показано, что нейтрофилы, циркулирующие в крови пациентов с глиобластомой, могут осуществлять дегрануляцию аргиназы, подавляя активность клеток адаптивной иммунной системы [29]. Примечательно, что нейтрофилы в норме содержат большое количество гранул с аргиназой, но фермент не взаимодействует с аргинином цитоплазмы клеток, что не приводит к усиленному потреблению аргинина из крови при циркуляции нейтрофилов [30]. Можно предположить, что дегрануляция необходима для активации регуляторной функции аргиназы. Экспрессировать аргиназу 1 в ответ на повреждающие факторы способны и другие лейкоциты из фракции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека [31], однако в настоящее время не известно, является ли это регуляторным механизмом. Примечательно, что ARG1 также

выполняет противомикробную функцию: в нейтрофилах человека фермент локализуется в специфических гранулах и высвобождается в фаголизосому с фагоцитированным патогеном, что приводит к локальному истощению аргинина и гибели микроорганизмов [30]. Активность аргиназы макрофагов в очагах специфического воспаления может сдерживать распространение патогена, что показано на мышинных моделях туберкулезной инфекции [32]. Наиболее вероятно, что этот механизм связан с истощением аргинина, так как не выявлено прямого влияния метаболитов ARG1 на рост микобактерий.

### iNOS

В отличие от аргиназы и IDO1 индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS) является иммунорегуляторным ферментом в отношении врожденной иммунной системы, а именно, оксид азота (NO) способен подавлять продукцию интерлейкина 12 (IL-12) в макрофагах и дендритных клетках, что показано на животных моделях [33]. NO также является противомикробным агентом [34], действующим в основном против внутриклеточных патогенов; бактерицидное действие оксида азота обусловлено образованием сильного окислителя пероксинитрита, который повреждает различные структуры клеток патогена. Оксид азота является короткоживущей молекулой, поэтому его основное регуляторное действие проявляется в синтезирующих его клетках, где NO нитрозилирует функциональные аминокислотные остатки (например, тирозина) в сигнальных белках. Посредством нитрозилирования молекула NO способна подавлять дифференцировку клеток Th17 у мышей [35], а также дифференцировку макрофагов M1 [36]. Эти исследования проведены на мышинных моделях, поэтому необходимо оценить применимость полученных результатов к клеткам человека. Экспрессия iNOS во врожденных иммунных клетках контролирует экспрессию провоспалительных цитокинов, что контрастирует с ролью NO в качестве бактерицидного агента. Можно предположить, что, по аналогии с ARG1, локализация в разных клеточных компартментах может быть связана с выполнением данных функций.

### GAPDH

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) является одним из ферментов гликолиза – ключевого пути метаболизма глюкозы в иммунных клетках [37]. Недавно был продемонстрирован механизм регуляции иммунного ответа в Т-лимфоцитах с помощью GAPDH [38]. При достаточном содержании глюкозы этот фермент обеспечивает протекание гликолиза, необходимого для получения энергии

и субстратов для анаболических процессов. В условиях дефицита глюкозы GAPDH переключается на регуляторную функцию, распознавая определенные мотивы в некоторых мРНК и способствуя их деградации, снижая тем самым уровень экспрессии некоторых белков, одним из которых является IFN- $\gamma$ , основной цитокин клеток Th1. Таким образом, Т-лимфоциты не могут синтезировать IFN- $\gamma$  в условиях дефицита глюкозы. Этот феномен может частично объяснить снижение активности иммунного ответа Th1 в тканях некоторых опухолей, которые также интенсивно используют глюкозу; депривация глюкозы действительно выявлена в качестве иммуносупрессивного фактора опухолевого микроокружения [39]. Примечательно, что продукция цитокинов с помощью GAPDH может регулироваться путем отрицательной обратной связи, настроенной таким образом, чтобы ограничить избыточную продукцию IFN- $\gamma$  при чрезмерной экспансии Т-лимфоцитов, которые усиленно потребляют глюкозу из окружающей среды при пролиферации [40].

### ENTPD1

Фермент эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза 1 (ENTPD1) – это экзонуклеотид-фосфорилаза, которая расщепляет нуклеотиды до нуклеозидов [41]. ENTPD1, или CD39, экспрессируется на поверхности иммунных клеток. Механизм регуляторного действия CD39 основан на расщеплении внеклеточного АТФ до аденозина, который подавляет активацию ряда иммунных клеток (в частности, макрофагов и Т-лимфоцитов) через рецепторы A2A и ассоциированные с ними внутриклеточные сигнальные пути [42, 43]. Этот механизм изучен как на мышинных моделях, так и на клетках человека [44]. Большое количество исследований, проведенных как на животных, так и на материале, полученном от пациентов, указывает на участие ENTPD1 в иммуносупрессии при различных онкологических заболеваниях [45]. Расщепление АТФ в плазме крови с помощью ENTPD1, локализованного на поверхности плазмочитов, рассматривается как один из механизмов, ответственных за иммуносупрессию у пациентов, перенесших сепсис [46].

### КЛАССИФИКАЦИЯ И ОБЩИЕ ОСОБЕННОСТИ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ

На основании данных о приведенных представителях группы иммунорегуляторных ферментов можно составить классификацию (рис. 1), а также выделить ряд общих особенностей данных ферментов, которые могут быть использованы для поиска новых представителей группы.

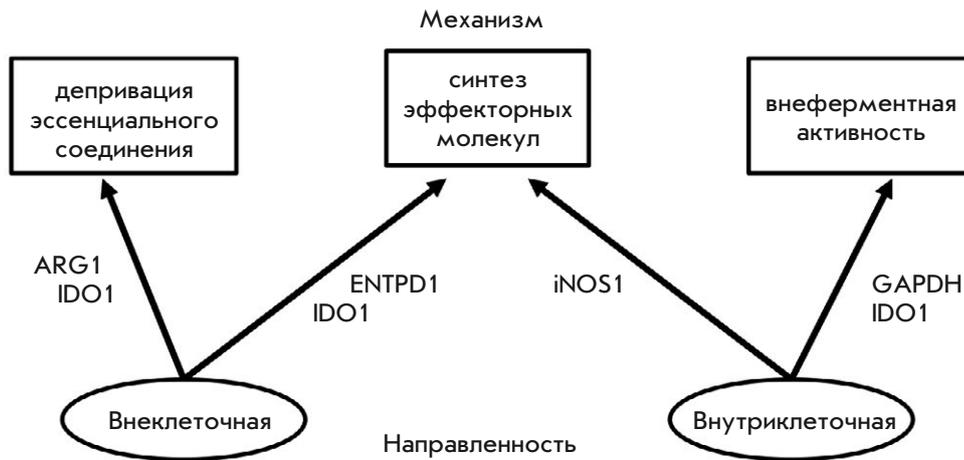


Рис. 1. Классификация иммунорегуляторных ферментов

**Классификация**

По механизму действия данные ферменты можно разделить на:

- осуществляющие депривацию эссенциальных и условно эссенциальных соединений (рис. 2);
- синтезирующие регуляторный метаболит (рис. 3);
- проявляющие внеферментативную активность (рис. 4).

Депривация незаменимых соединений ограничивает пролиферативную активность клеток, поэтому данная стратегия используется в основном при регуляции адаптивного иммунного ответа, ввиду высокой пролиферативной активности лимфоцитов. Данный эффект в меньшей степени влияет на популяции покоящихся клеток, метаболизм которых менее интенсивен, а также зависит от концентрации эссенциального соединения, способности ткани к его синтезу или транспорту (например, в мышинной модели инфекции *L. major* удалось нейтрализовать ингибирующее действие аргиназы на Т-лимфоциты путем введения аргинина [26]). Из перечисленных ферментов подобным механизмом обладают IDO1 (в том случае, когда работает в качестве фермента) и ARG1.

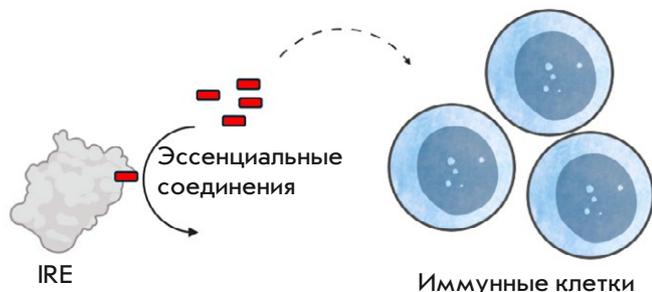


Рис. 2. Механизм регуляции посредством депривации эссенциальных и условно эссенциальных соединений

Регуляция посредством синтеза активных метаболитов, напротив, оказывает влияние не на все клетки с определенным уровнем метаболизма в микроокружении, а на специфические популяции, экспрессирующие соответствующие рецепторы. Регуляция может иметь внешний или внутренний характер, в зависимости от расположения ферментов и рецепторов к регуляторным метаболитам. Данный механизм характерен для IDO1, ENTPD1 и iNOS (действие NO ограничено самой клеткой из-за быстрого распада молекулы).

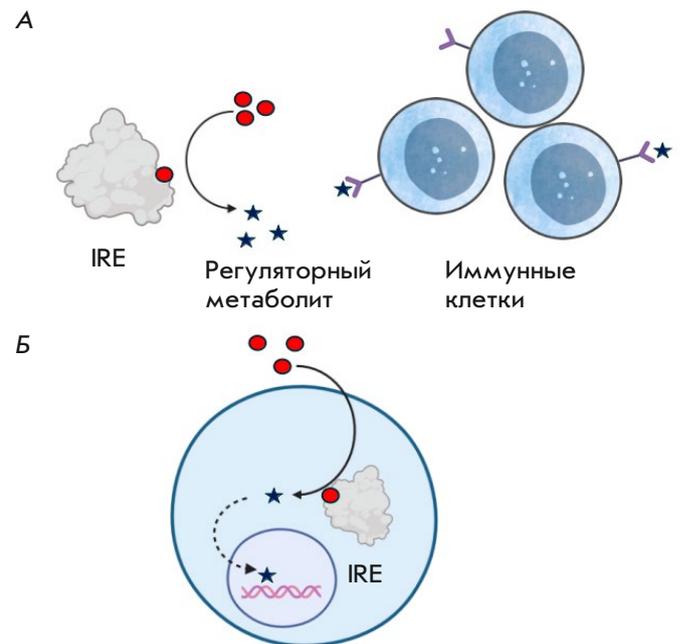
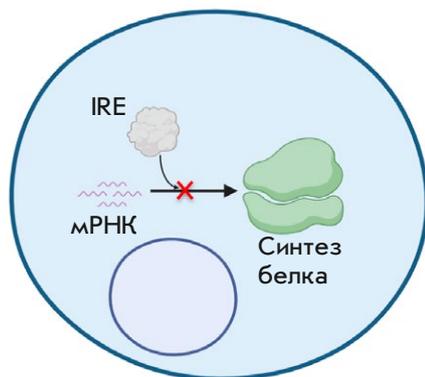


Рис. 3. Механизм регуляции функций иммунных клеток посредством синтеза регуляторного метаболита. А – синтез регуляторного метаболита вне клетки (внешняя регуляция). Б – синтез регуляторного метаболита внутри клетки (внутренняя регуляция)

**Рис. 4.** Механизм регуляции посредством внеферментативной активности



Внеферментативная активность предполагает наличие у фермента дополнительных свойств, например, способности влиять на белки внутриклеточных сигнальных путей или уровни мРНК. Подобным механизмом обладают IDO1 и GAPDH. На примере IDO1 можно отметить, что ферменты могут использовать несколько механизмов одновременно. Фермент iNOS, с одной стороны, способен истощать запасы эссенциального для иммунных клеток аргинина, однако в настоящее время нет данных, подтверждающих депривацию аргинина с помощью iNOS. Аргиназа, которая истощает тот же субстрат, более эффективна по сравнению с iNOS, так как для катализа ей не требуется кислород, содержание которого часто снижено в очагах воспаления [47].

По направленности действия можно выделить следующие группы ферментов:

- ферменты с внеклеточной направленностью;
- ферменты с внутриклеточной направленностью.

Ферменты GAPDH, iNOS и IDO1 (когда IDO1 действует как сигнальный белок) обладают внутриклеточной направленностью, так как находятся внутри клеток и влияют в основном на экспрессию генов в тех клетках, в которых находятся. Примечательно, что внутриклеточная активность данных белков зависит от уровней субстратов в микроокружении клетки, что позволяет настраивать активность фермента. Лучше всего данный принцип прослеживается на примере GAPDH, который действует как регулятор только в ситуации, когда нет подходящих условий для осуществления ферментативной активности (дефицит глюкозы).

Ферменты с внеклеточной направленностью, такие как ARG1, ENTPD1 и IDO1 (когда IDO1 работает в качестве фермента) влияют не только на клетки, которые их экспрессируют (в ряде случаев могут и не влиять на данные клетки, как например, экспрессия ENTPD1, по-видимому, не влияет на плазмобласты, на которых фермент

локализован [46]), но и на окружающие популяции клеток.

### Общие особенности действия иммунорегуляторных ферментов

Ферменты, осуществляющие иммунную регуляцию, имеют ряд общих особенностей, главная из которых – активация в условиях формирования иммунного ответа. Экспрессия данных ферментов зависит от молекул-активаторов иммунного ответа, таких как ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны (PAMP) и провоспалительных/противовоспалительных цитокинов (IDO1 [12], ARG1 и iNOS [6], ENTPD1 [48]). Некоторым исключением может быть GAPDH, однако его регуляторная активность сопряжена с деградацией мРНК IFN- $\gamma$ , увеличение экспрессии которого достигается под действием PAMP и цитокинов [49]. Следствием этого свойства является то, что иммунорегуляторные ферменты подвергаются регуляции по принципу отрицательной обратной связи – активируясь в результате иммунного ответа (стимулами выступают PAMP и цитокины), они приводят к подавлению иммунного ответа и сохранению гомеостаза, так как избыточная активация иммунной системы сопровождается разрушением собственных тканей организма [50].

Второй особенностью является зависимость от метаболического контекста, в котором работает фермент. Действие ферментов, которые используют механизм депривации, можно отменить, если сохраняется достаточное количество субстрата. Действие ферментов, которые продуцируют регуляторные метаболиты, напротив, усиливается при повышенном содержании субстрата, а при снижении количества доступного субстрата активность утрачивается (ферменты депривации также утрачивают активность при снижении концентрации субстрата, но их регуляторное действие от этого усиливается, так как цель – снижение концентрации – достигается). Отдельно можно выделить IDO1. Этот фермент работает в обоих случаях – и при избытке, и при недостатке триптофана. Выдвинута гипотеза, согласно которой IDO1 подавляет Th1-клетки в большей степени, чем Th2, так как на клетки Th1 кинуренины оказывают проапоптотическое действие, тогда как недостаток триптофана приводит только к остановке пролиферации клеток Th2 [13]. Таким образом, действие IDO1 также может зависеть от метаболического контекста: избыток триптофана подавляет Th1-клетки посредством производства кинуренина, а при недостатке триптофана подавление распространяется и на Th2-клетки, путем усиления депривации триптофана. Клетки Th1 и Th2 конкурентно подавляют активность друг дру-

га [51], поэтому можно предполагать, что в условиях нормальной концентрации триптофана IDO1 поддерживает Th2-опосредованный иммунный ответ, а при снижении концентрации триптофана останавливается деятельность T-клеток в целом.

Еще одной особенностью, характерной для иммунорегуляторных ферментов (не для всех указанных в обзоре), является их противомикробная активность. IDO1 [22], ARG1 [30], iNOS [34] обладают противомикробной активностью и используются иммунной системой для борьбы с некоторыми типами возбудителей. Механизмы противомикробного действия ферментов аналогичны регуляторным механизмам: депривация эссенциального соединения с ограничением пролиферативной активности возбудителя [22] либо синтез противомикробного метаболита [34]. Можно предположить, что изначально дополнительной функцией данных ферментов была борьба с инфекционными заболеваниями, но в процессе эволюции они приобрели также регуляторную функцию, поскольку метаболизм активных иммунных клеток (например, пролиферирующих лимфоцитов) сходен с метаболизмом делящихся клеток патогенов (бактерий, грибов, простейших). Предполагается, что ряд регуляторных механизмов иммунной системы возник из эффекторных механизмов уничтожения патогенов.

### **ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ И СТРАТЕГИИ ПОИСКА НОВЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ**

Основываясь на особенностях иммунорегуляторных ферментов, можно предложить методики поиска новых представителей данной группы. Общая особенность, которая должна быть использована при поиске: ферменты, регулирующие иммунный ответ, должны быть чувствительны к его активации. Данную особенность для потенциальных представителей можно проверять с помощью биоинформатических подходов: анализа последовательности промотора гена белка с целью поиска сайтов связывания с белками провоспалительных или противовоспалительных сигнальных путей [52], таких как NF- $\kappa$ B [53]. В случае, когда белок не имеет сайтов связывания с сигнальными факторами, он все еще может участвовать в иммунной регуляции, активируясь косвенным путем через другие сигнальные пути, прямое участие которых в воспалительном ответе не доказано. В подобных случаях можно изучать дифференциальную экспрессию генов [54] при активации иммунного ответа. Для лучших кандидатов оба предложенных метода должны давать положительный результат. После подтверждения факта активации фермента

при иммунном ответе определяют механизм регуляции.

### **Депривация эссенциального или условно эссенциального соединения**

Особенностью данного механизма является то, что подходящими свойствами могут обладать ферменты катаболизма эссенциальных соединений, которые могут быть либо первыми в цепи реакций превращения (опираясь на данные IDO1 и ARG1), либо же скорость-лимитирующими ферментами в метаболических путях указанных субстратов. Важным моментом является определение эссенциального соединения, так как показано, что для активированных иммунных клеток, анаболическая активность которых многократно усиливается, некоторые субстраты становятся эссенциальными, даже при условии возможности их синтеза в организме. Так, глутамин необходим для пролиферативного ответа T-лимфоцитов, что показано на клеточных культурах человека и животных [55]. Можно предположить, что глутаминаза 1 является потенциальным иммунорегуляторным ферментом. На культурах клеток человека показано, что ингибирование глутаминазы 1 приводит к подавлению пролиферации CD4+ T-лимфоцитов [56], что согласуется с ролью глутаминолиза в обеспечении пролиферации лимфоцитов. Недавно обнаружили способность *Mycobacterium tuberculosis* ингибировать глутаминазу 1 в культуре макрофагов мыши, что способствовало выживанию патогена [57]. Клетки опухоли (как активно пролиферирующие клетки) или ее микроокружения также могут использовать глутаминазу для усиленного метаболизма глутамин, что сопровождается снижением противоопухолевого иммунного ответа [58]. Тем не менее в настоящее время не известно, существуют ли регуляторные механизмы в самой иммунной системе, реализуемые с помощью глутаминазы 1, например, способны ли одни иммунные клетки, потребляя глутамин, вызывать истощение данной аминокислоты и регулировать функцию других клеток (как в случае IDO1).

Витамины являются эссенциальными соединениями, необходимыми для пролиферации и дифференцировки всех клеток, в том числе и иммунной системы [59], поэтому ферменты, вовлеченные в метаболизм витаминов, потенциально могут обладать иммунорегуляторными функциями, т.е. могут относиться к иммунорегуляторным ферментам. Примером может служить дигидрофолатредуктаза, осуществляющая метаболизм фолиевой кислоты. Дефицит фолиевой кислоты влияет на активность иммунных клеток мыши [60], более того, в экспериментах на мышках показано, что с помощью на-

правленного истощения популяций Т-лимфоцитов, экспрессирующих большое количество фолатного рецептора, можно контролировать течение иммунных реакций [61]. Дефицит фолиевой кислоты в данной субпопуляции клеток может приводить к нарушению их функций. Тем не менее не известно, можно ли регулировать численность иммунных клеток путем истощения фолата *in vivo*.

### **Синтез регуляторного метаболита**

Многие метаболиты с сигнальной функцией (гормоны, нейромедиаторы) являются потенциальными регуляторами иммунной активности. Так, например, серотонин способен влиять на пролиферацию и высвобождение цитокинов в иммунных клетках разного типа [62], что делает триптофангидроксилазу потенциальным иммунорегуляторным ферментом. Другой фермент с иммуносупрессивной функцией – это оксидаза L-аминокислот (IL4I1), которая опосредует синтез метаболитов триптофана, активирующих AhR, как и IDO1, что вызывает иммуносупрессию и прогрессирование опухолевого процесса в мышечных моделях (необходимо дальнейшее исследование, подтверждающее использование IL4I1 клетками самой иммунной системы) [63]. Ключевой особенностью триады ферментов – IDO1, IL4I1, триптофангидроксилаза – является их общий субстрат триптофан. Можно сделать вывод, что для поиска потенциальных иммунорегуляторных ферментов, способных синтезировать регуляторный метаболит, рационально использовать ферменты, осуществляющие метаболизм субстрата, который уже используется другим установленным иммунорегуляторным ферментом, ферментом синтеза низкомолекулярных гормонов или нейромедиаторов. Показано, что нейромедиатор гамма-аминомасляная кислота синтезируется иммунными клетками и влияет на их работу, что делает глутаматдекарбоксилазу потенциальным иммунорегуляторным ферментом [64].

### **Внеферментативная активность**

В настоящее время известно достаточно большое количество белков, обладающих несколькими видами биологической активности [65]. Ферменты этой группы являются потенциальными иммунорегуляторными ферментами. Внеферментативной регуляторной активностью обладает не только GAPDH, но и другой фермент гликолиза – гексокиназа, которая способна связываться с митохондриальным ионным каналом VDAC, что позволяет опухолевым клеткам ингибировать один из апоптотических путей в экспериментальных условиях [66]. Гексокиназа может потенциально участвовать в контроле иммунных реакций, например, повышая

выживаемость некоторых популяций иммунных клеток за счет снижения апоптоза. Наиболее перспективной стратегией поиска внеферментативной активности представляются анализ структуры белка и поиск мотивов связывания РНК или сигнальных/структурных белков с помощью современных биоинформатических подходов [67].

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ**

Исследование иммунорегуляторных ферментов имеет не только фундаментальное значение. Технологии, использующие функции иммунорегуляторных ферментов, обладают большим потенциалом для использования в медицине. Наиболее хорошо изучено применение ингибиторов иммунорегуляторных ферментов. Ингибиторы IDO1 были исследованы в качестве иммунотерапевтических противоопухолевых средств, и, хотя в качестве монотерапии они и имели ограниченные результаты, можно говорить о том, что такие препараты обладают синергичным действием с ингибиторами контрольных точек [68]. Ингибиторы аргиназы также исследуются в качестве противоопухолевых иммунотерапевтических средств [69]. Другой стратегией является использование самих иммунорегуляторных ферментов. Так, рекомбинантная человеческая аргиназа была использована в качестве противоопухолевого средства для ауксотрофных по аргинину опухолей [70] (препарат вводился в ткань опухоли совместно с основной терапией в эксперименте на мышах). В основе эффекта использовался тот же принцип депривации эссенциального соединения, который характерен для регуляции численности быстроделяющихся клеток. Данная стратегия потенциально сочетается с использованием скаффолдов с интегрированными в них ферментами или их ингибиторами для локальной модуляции функции иммунной системы (данный подход для различных иммуномодуляторов в настоящее время активно развивается [71]), что может найти применение как в онкоиммунологии, так и в трансплантологии или терапии инфекционных и аутоиммунных заболеваний.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Иммунорегуляторные ферменты являются новым объектом изучения, и необходима дальнейшая работа для их поиска, классификации и расшифровки механизмов их действия. Учет указанных в обзоре особенностей может облегчить поиск новых представителей, так как в настоящее время известно, какие реакции протекают в организме с эссенциальными соединениями и какие ферменты индуцируются про/противовоспалительными

цитокинами (такие белки являются наиболее перспективными кандидатами для поиска у них иммунорегуляторных свойств). Контроль иммунных реакций с помощью метаболизма расширяет понимание биологии иммунной системы, что позволит разработать новые методы целенаправленного воздействия на нее. Формирование обратных связей за счет метаболизма может быть использовано

в терапевтических целях для контроля иммунной системы за счет добавления субстратов, ингибиторов или же самих ферментов в зависимости от типа заболевания. ●

*Результаты получены при финансовой поддержке Программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Villani A.C., Sarkizova S., Hacohen N. // *Annu. Rev. Immunol.* 2018. V. 36. № 1. P. 813–842. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053035>
- O'Neill L.A.J., Kishton R.J., Rathmell J. // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. V. 16. № 9. P. 553–565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>
- Maciulek J.A., Pasternak J.A., Wilson H.L. // *Curr. Opin. Immunol.* 2014. V. 27. P. 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.006>
- Jung J., Zeng H., Horng T. // *Nat. Cell Biol.* 2019. V. 21. P. 85–93. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0217-x>
- Wu H., Gong J., Liu Y. // *Mol. Med. Rep.* 2018. V. 17. № 4. P. 4867–4873. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8537>
- Munder M. // *Br. J. Pharmacol.* 2009. V. 158. № 3. P. 638–651. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>
- Nakano T., Goto S., Takaoka Y., Tseng H.P., Fujimura T., Kawamoto S., Ono K., Chen C.L. // *Biofactors.* 2018. V. 44. № 6. P. 597–608. <https://doi.org/10.1002/biof.1379>
- Li Y., Jia A., Wang Y., Dong L., Wang Y., He Y., Wang S., Cao Y., Yang H., Bi Y., Liu G.J. // *Cell. Physiol.* 2019. V. 234. № 11. P. 20298–20309. <https://doi.org/10.1002/jcp.28300>
- Elebo N., Fru P., Omoshoro-Jones J., Candy G.P., Nweke E.E. // *Mol. Med. Rep.* 2020. V. 22. № 6. P. 4981–4991. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11622>
- Xue C., Li G., Zheng Q., Gu X., Shi Q., Su Y., Chu Q., Yuan X., Bao Z., Lu J. // *Cell Metab.* 2023. V. 35. № 8. P. 1304–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.06.004>
- Trabanelli S., Ocadlikova D., Evangelisti C., Parisi S., Curti A. // *Curr. Med. Chem.* 2011. V. 18. № 15. P. 2234–2239. <https://doi.org/10.2174/092986711795656054>
- Taylor M.W., Feng G. // *FASEB J.* 1991. V. 5. № 11. P. 2516–2522. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.11.1907934>
- Xu H., Zhang G.-X., Ciric B., Rostami A. // *Immunol. Lett.* 2008. V. 121. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.08.008>
- Romagnani S. // *Immunol. Today.* 1991. V. 12. № 8. P. 256–257. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90120-I](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90120-I)
- Munn D.H., Sharma M.D., Baban B., Harding H.P., Zhang Y., Ron D., Mellor A.L. // *Immunity.* 2005. V. 22. № 5. P. 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.013>
- Mezrich J.D., Fechner J.H., Zhang X., Johnson B.P., Burlingham W.J., Bradfield C.A. // *J. Immunol.* 2010. V. 185. № 6. P. 3190–3198. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903670>
- Pallotta M.T., Orabona C., Volpi C., Vacca C., Belladonna M.L., Bianchi R., Servillo G., Brunacci C., Calvitti M., Biccato S. // *Nat. Immunol.* 2011. V. 12. № 9. P. 870–878. <https://doi.org/10.1038/ni.2077>
- Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., Bondarev I., Conway S.J., Marshall B., Brown C., Mellor A.L. // *Science.* 1998. V. 281. № 5380. P. 1191–1193. <https://doi.org/10.1126/science.281.5380.1191>
- Zaher S.S., Germain C., Fu H., Larkin D.F.P., George A.J.T. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. V. 52. № 5. P. 2640–2648. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5793>
- Ferns D.M., Kema I.P., Buist M.R., Nijman H.W., Kenter G.G., Jordanova E.S. // *Oncoimmunology.* 2015. V. 4. № 2. P. e981457. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.981457>
- Donovan M.J., Tripathi V., Favila M.A., Geraci N.S., Lange M.C., Ballhorn W., McDowell M.A. // *Parasite Immunol.* 2012. V. 34. № 10. P. 464–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01380.x>
- Njau F., Geffers R., Thalmann J., Haller H., Wagner A.D. // *Microbes Infect.* 2009. V. 11. № 13. P. 1002–1010. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.006>
- Fujiwara Y., Kato S., Nesline M.K., Conroy J.M., DePietro P., Pabla S., Kurzrock R. // *Cancer Treat. Rev.* 2022. V. 110. P. 102461. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102461>
- Jenkinson C.P., Grody W.W., Cederbaum S.D. // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 1996. V. 114. № 1. P. 107–132. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02138-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02138-8)
- Popovic P.J., Zeh H.J. III, Ochoa J.B. // *J. Nutr.* 2007. V. 137. № 6. P. 1681S–1686S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1681S>
- Modolell M., Choi B.S., Ryan R.O., Hancock M., Titus R.G., Abebe T., Hailu A., Müller I., Rogers M.E., Bangham C.R.M., et al. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009. V. 3. № 7. P. e480. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000480>
- Pesce J.T., Ramalingam T.R., Mentink-Kane M.M., Wilson M.S., El Kasmi K.C., Smith A.M., Thompson R.W., Cheever A.W., Murray P.J., Wynn T.A. // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. № 4. P. e1000371. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000371>
- Dai X.K., Ding Z.X., Tan Y.Y., Bao H.R., Wang D.Y., Zhang H. // *World J. Emerg. Med.* 2022. V. 13. № 4. P. 266. <https://doi.org/10.5847/wjem.j1920-8642.2022.068>
- Sippel T.R., White J., Nag K., Tsvankin V., Klaassen M., Kleinschmidt-DeMasters B.K., Waziri A. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 22. P. 6992–7002. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1107>
- Munder M., Mollinedo F., Calafat J., Canchado J., Gil-Lamagnere C., Fuentes J.M., Luckner C., Doschko G., Soler G., Eichmann K. // *Blood.* 2005. V. 105. № 6. P. 2549–2556. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2521>
- Ochoa J.B., Bernard A.C., O'Brien W.E., Griffen M.M., Maley M.E., Rockich A.K., Tsuei B.J., Boulanger B.R., Kearney P.A., Morris S.M. // *Jr. Ann. Surg.* 2001. V. 233. № 3. P. 393–399. <https://doi.org/10.1097/0000658-200103000-00014>
- Duque-Correa M.A., Kühl A.A., Rodriguez P.C., Zedler U., Schommer-Leitner S., Rao M., Weiner J. III, Hurwitz R., Qualls J.E., Kosmiadi G.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 38. P. E4024–E4032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408839111>
- Xiong H., Zhu C., Li F., Hegazi R., He K., Babyatsky M., Bauer A.J., Plevy S.E. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 11. P. 10776–10783. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313416200>
- De Groot M.A., Fang F.C. // *Clin. Infect. Dis.* 1995. V. 21. Suppl. 2. P. S162–S165. [https://doi.org/10.1093/clinids/21.Supplement\\_2.S162](https://doi.org/10.1093/clinids/21.Supplement_2.S162)

35. Yang J, Zhang R., Lu G., Shen Y., Peng L., Zhu C., Cui M., Wang W., Arnaboldi P., Tang M., Gupta M. // *J. Exp. Med.* 2013. V. 210. № 7. P. 1447–1462. <https://doi.org/10.1084/jem.20122494>
36. Lu G., Zhang R., Geng S., Peng L., Jayaraman P., Chen C., Xu F., Yang J., Li Q., Zheng H. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6676. <https://doi.org/10.1038/ncomms7676>
37. Soto-Herederó G., Gómez de Las Heras M.M., Gabandé-Rodríguez E., Oller J., Mittelbrunn M. // *FEBS J.* 2020. V. 287. № 16. P. 3350–3369. <https://doi.org/10.1111/febs.15327>
38. Chang C.H., Curtis J.D., Maggi L.B., Faubert B., Villarino A.V., O'Sullivan D., Huang S.C.C., van der Windt G.J., Blagih J., Qiu J. // *Cell.* 2013. V. 153. № 6. P. 1239–1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.016>
39. Marijt K.A., Sluijter M., Blijleven L., Tolmeijer S.H., Scheeren F.A., van der Burg S.H., van Hall T. // *J. Immunother. Cancer.* 2019. V. 7. P. 152. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0627-8>
40. Palmer C.S., Ostrowski M., Balderson B., Christian N., Crowe S.M. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00001>
41. Kukulski F., Lévesque S.A., Lavoie E.G., Lecka J., Bigonnesse F., Knowles A.F., Robson S.C., Kirley T.L., Sévigny J. // *Purinergic Signal.* 2005. V. 1. P. 193–204. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-6217-x>
42. Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J.F., Enjyoji K., Linden J., Oukka M. // *J. Exp. Med.* 2007. V. 204. № 6. P. 1257–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>
43. Haskó G., Pacher P. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012. V. 32. № 4. P. 865–869. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.226852>
44. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M.L. // *Blood.* 2007. V. 110. № 4. P. 1225–1232. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>
45. Bastid J., Cottalorda-Regairaz A., Alberici G., Bonnefoy N., Eliaou J.F., Bensussan A. // *Oncogene.* 2013. V. 32. № 14. P. 1743–1751. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.269>
46. Nascimento D.C., Viacava P.R., Ferreira R.G., Damaceno M.A., Piñeros A.R., Melo P.H., Donate P.B., Toller-Kawahisa J.E., Zoppi D., Veras F.P. // *Immunity.* 2021. V. 54. № 9. P. 2024–2041. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.08.005>
47. El Kasmi K.C., Qualls J.E., Pesce J.T., Smith A.M., Thompson R.W., Henao-Tamayo M., Basaraba R.J., König T., Schleicher U., Koo M.S., Kaplan G. // *Nat. Immunol.* 2008. V. 9. № 12. P. 1399–1406. <https://doi.org/10.1038/ni.1671>
48. Mascanfroni I.D., Yeste A., Vieira S.M., Burns E.J., Patel B., Sloma I., Wu Y., Mayo L., Ben-Hamo R., Efroni S. // *Nat. Immunol.* 2013. V. 14. № 10. P. 1054–1063. <https://doi.org/10.1038/ni.2695>
49. Young H.A., Ghosh P. // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 1997. V. 56. P. 109–128. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)61004-1](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)61004-1)
50. Rosenblum M.D., Remedios K.A., Abbas A.K. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 6. P. 2228–2233. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>
51. Morel P.A., Oriss T.B. // *Crit. Rev. Immunol.* 1998. V. 18. № 4. P. 275–303. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v18.i4.10>
52. Bortoluzzi S., Coppe A., Bisognin A., Pizzi C., Danieli G.A. // *BMC Bioinformatics.* 2005. V. 6. № 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-121>
53. Moynagh P.N.J. // *Cell Sci.* 2005. V. 118. № 20. P. 4589–4592. <https://doi.org/10.1242/jcs.02579>
54. Costa-Silva J., Domingues D., Lopes F.M. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 12. P. e0190152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>
55. Calder P.C., Yaqoob P. // *Amino Acids.* 1999. V. 17. P. 227–241. <https://doi.org/10.1007/BF01366922>
56. Sener Z., Cederkvist F.H., Volchenkov R., Holen H.L., Skålhegg B.S. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 7. P. e0160291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160291>
57. Yu J., Yan N., Gong Z., Ma Q., Liu J., Wu X., Deng G. // *Cell. Signal.* 2024. V. 124. P. 111422. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2024.111422>
58. Wang B., Pei J., Xu S., Liu J., Yu J. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2024. V. 43. № 1. P. 74. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02994-0>
59. Peterson C.T., Rodionov D.A., Osterman A.L., Peterson S.N. // *Nutrients.* 2020. V. 12. № 11. P. 3380. <https://doi.org/10.3390/nut12113380>
60. Wu C.H., Huang T.C., Lin B.F. // *J. Nutr. Biochem.* 2017. V. 41. P. 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.11.008>
61. Yamaguchi T., Hirota K., Nagahama K., Ohkawa K., Takahashi T., Nomura T., Sakaguchi S. // *Immunity.* 2007. V. 27. № 1. P. 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.017>
62. Roumier A., Béchade C., Maroteaux L. // *Serotonin. Acad. Press.* 2019. P. 181–196. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800050-2.00010-3>
63. Sadik A., Patterson L.F.S., Öztürk S., Mohapatra S.R., Panitz V., Secker P.F., Pfänder P., Loth S., Salem H., Prentzell M.T., et al. // *Cell.* 2020. V. 182. № 5. P. 1252–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.038>
64. Jin Z., Mendu S.K., Birnir B. // *Amino Acids.* 2013. V. 45. P. 87–94. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1193-7>
65. Werelusz P., Galiniak S., Mołoi M. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2024. V. 1871. № 1. P. 119598. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119598>
66. Rodríguez-Saavedra C., Morgado-Martínez L.E., Burgos-Palacios A., King-Díaz B., López-Coria M., Sánchez-Nieto S. // *Front. Mol. Biosci.* 2021. V. 8. P. 701975. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.701975>
67. Zhang Y., Yan J., Chen S., Gong M., Gao D., Zhu M., Gan W. // *Curr. Bioinform.* 2020. V. 15. № 8. P. 898–911. <https://doi.org/10.2174/1574893615999200711165743>
68. Le Naour J., Galluzzi L., Zitvogel L., Kroemer G., Vacchelli E. // *Oncoimmunology.* 2020. V. 9. № 1. P. 1777625. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1777625>
69. Borek B., Gajda T., Golebiowski A., Blaszczyk R. // *Bioorg. Med. Chem.* 2020. V. 28. № 18. P. 115658. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115658>
70. Badeaux M.D., Rellig A.S., Agnello G., Enzler D., Kasiewicz M.J., Priddy L., Wiggins J.F., Muir A., Sullivan M.R., van Cleef J. // *Cancer Immunol. Res.* 2021. V. 9. № 4. P. 415–429. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-0317>
71. Adu-Berchie K., Mooney D.J. // *Acc. Chem. Res.* 2020. V. 53. № 9. P. 1749–1760. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00341>

УДК 632.4.01/08

# Токсинопродуцирующая способность штаммов гриба *Fusarium proliferatum*, выделенных из зерна

О. П. Гаврилова<sup>1\*</sup>, А. С. Орина<sup>1</sup>, Т. Ю. Гагкаева<sup>1</sup>, Н. Н. Гогина<sup>2</sup><sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, 196608 Россия<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, Сергиев Посад, 141311 Россия

\*E-mail: olgavrilova1@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.10.2024

Принята к печати 02.12.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27546

**РЕФЕРАТ** Гриб *Fusarium proliferatum* распространен повсеместно, способен инфицировать широкий спектр растений и синтезирует разнообразные микотоксины, количество которых может значительно варьировать. Проанализированы 12 штаммов *F. proliferatum sensu lato*, выделенных из зерна пшеницы (6), овса (4) и кукурузы (2). С целью идентификации штаммов проводили филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов фактора элонгации трансляции EF-1a, β-тубулина и второй субъединицы РНК-полимеразы II. Тип спаривания определяли с помощью специфичной ПЦР. Профиль микотоксинов, продуцируемых штаммами, определяли методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Все 12 штаммов *Fusarium* формировали на филогенетическом дереве отдельную кладу с референсными штаммами *F. proliferatum*, что подтверждает их видовую принадлежность. Установлено присутствие в каждом штамме только одной идиоморфы в локусе MAT, что указывает на гетероталлический тип спаривания гриба. Идиоморфа MAT1-1 встречалась в 2 раза чаще, чем MAT1-2. Все штаммы *F. proliferatum* активно продуцировали фумонизины В<sub>1</sub> (71–6175 мг/кг), В<sub>2</sub> (12–2661 мг/кг) и В<sub>3</sub> (6–588 мг/кг), а также высокие количества боверицина (64–455 мг/кг) и более низкие количества (12–6565 мкг/кг) монилиформина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** *Fusarium*, филогенетический анализ, микотоксины, ВЭЖХ-МС/МС.

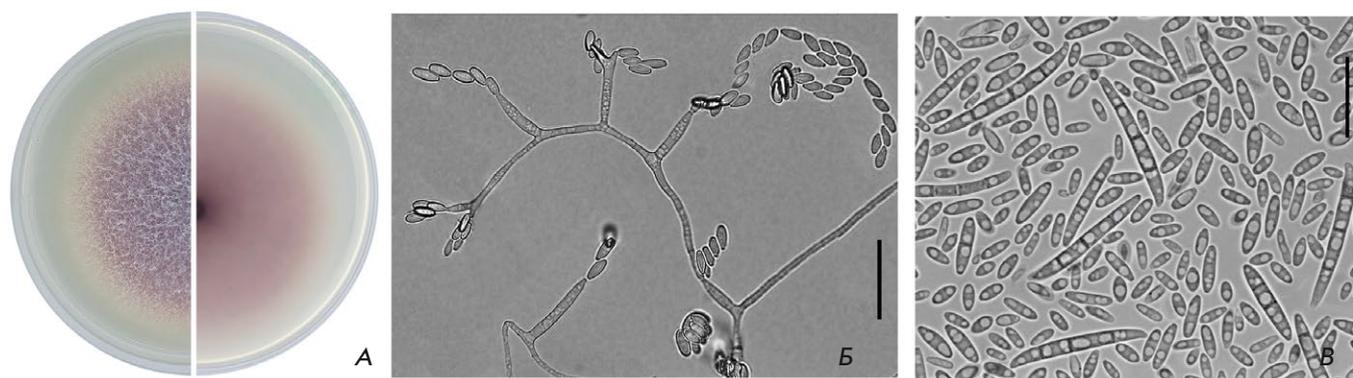
**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** FF – *Fusarium fujikuroi*; *tef* – ген фактора элонгации трансляции EF-1a; *tub* – ген β-тубулина; *rpb2* – ген второй субъединицы РНК-полимеразы II; ML (maximum likelihood) – метод максимального правдоподобия; BP (Bayesian probability) – значение Байесовской апостериорной вероятности; MAT-локус – локус типа спаривания; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией; ФУМ – фумонизины группы В; ФВ<sub>1</sub> – фумонизин В<sub>1</sub>; ФВ<sub>2</sub> – фумонизин В<sub>2</sub>; ФВ<sub>3</sub> – фумонизин В<sub>3</sub>; БОВ – боверицин; МОН – монилиформин.

## ВВЕДЕНИЕ

Комплекс видов *Fusarium fujikuroi* (FF) представляет одну из наиболее крупных групп в пределах рода *Fusarium* и является ярким примером значительных преобразований видовой концепции рода. Сравнительные морфологические и молекулярно-филогенетические исследования позволили установить, что комплекс видов FF представлен более чем 60 различными видами, но это, с большой вероятностью, не полный список [1]. Характеристика каждого таксона в комплексе видов FF проводится по сумме физиолого-биохимических признаков, поскольку для разграничения видов диапазона морфо-

логических характеристик недостаточно, поскольку они не всегда очевидны, стабильны и надежны. С внедрением молекулярных технологий показано, что ранее описанные виды FF являются полифилетическими, состоящими из морфологически сходных, но филогенетически различных видов [2–4].

В комплексе FF встречаются как патогенные, так и/или эндофитные для широкого круга растений организмы, а также возбудители заболеваний человека и животных [5]. Эти грибы вырабатывают структурно разнообразные вторичные метаболиты, включая микотоксины, а также фитогормоны – гиббереллины, ауксины и цитокинины [6, 7]. Спектр вто-



**Рис. 1.** А – культура гриба *F. proliferatum* MFG 58486 (картофельно-сахарозный агар, 7 сут, 25°С, в темноте); Б – микроконидии на моно- и полифиалидах; В – микроконидии и макроконидии (синтетический агар Ниренберг, 14 сут, 25°С, в темноте)

ричных метаболитов у многих видов комплекса FF еще требует уточнения и может отличаться даже у близкородственных видов [8–10]. Четкое определение границ видов *Fusarium* и характеристика их свойств помогают более надежно идентифицировать штаммы и улучшают понимание их биологии.

Гриб *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg (Matsush.) является одним из активно изучаемых представителей комплекса видов FF из-за его повсеместного распространения и способности инфицировать широкий спектр растений [11], включая злаковые, бобовые [12, 13], овощные [14] и плодовые культуры [15–17]. Болезни, вызванные *F. proliferatum*, могут проявляться в виде гнилей или увядания [13, 18, 19], а, кроме того, инфекционный процесс в растении часто протекает бессимптомно. Наряду с близкородственным видом *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. proliferatum* является одним из наиболее вредоносных патогенов кукурузы, вызывающим гнили початков и стеблей [20]. На зерновых культурах в благоприятных для гриба условиях зараженное зерно пшеницы может быть щуплым с признаками черного зародыша [21], а у инфицированного овса отмечали обесцвечивание и некротическую штриховатость колосковых чешуек, а также покоричневение зерна [22].

Благодаря обильному образованию микроконидий, собранных в фальшивые головки, короткие цепочки на моно- и полифиалидных клетках, а также макроконидий (рис. 1), *F. proliferatum* легко распространяется по воздуху и переносится насекомыми на новые неинфицированные растения [23]. Как и многие другие патогены, он сохраняется в семенах [14] и на растительных остатках в почве [24].

*Fusarium proliferatum* способен образовывать телеоморфную стадию, формируя перитеции с аскоспорами на поверхности субстрата [25]. У гетеро-

талличных видов FF половое размножение может происходить только между особями противоположного типа спаривания, регулируемого МАТ-локусом, представленным двумя идиоморфами – МАТ1-1 и МАТ1-2 [26]. Эффективный размер популяции гетероталличного вида должен содержать более или менее одинаковое число особей, характеризующихся определенной идиоморфой, что приводит к возникновению полового процесса, в то время как значительный перекос в частоте встречаемости одного из типов спаривания может привести к неспособности гриба к половому спороношению и снижению его внутривидового разнообразия [27].

Как и другие представители комплекса видов FF, *F. proliferatum* синтезирует токсичные вторичные метаболиты: ФУМ, БОВ, МОН, фузапролиферин, фузарины, фузариевую кислоту и др., способные накапливаться в зерне и представлять опасность для здоровья его потребителей [28]. Установлена достоверная связь между зараженностью *F. proliferatum* зерна пшеницы и количеством обнаруженных в нем ФУМ [29, 30]. Обобщение накопленной к настоящему времени информации о контаминации микотоксинами зерна разных злаков показывает, что пшеница или ячмень накапливают ФУМ в меньших количествах [31–33], чем кукуруза, в зерне которой эти метаболиты часто встречаются в высоких количествах [34, 35]. Известно, что количество микотоксинов, продуцируемых штаммами *F. proliferatum* различного субстратного происхождения, может значительно варьировать, среди них могут встречаться как активные продуценты, так и нетоксигенные штаммы [8, 28, 29, 36–38].

Цель исследования состояла в идентификации с помощью филогенетического анализа штаммов *F. proliferatum*, выделенных из зерновых культур, и определении их токсинопродуцирующей способности *in vitro*.

Таблица 1. Штаммы *F. proliferatum*, выбранные для исследований

Штамм из коллекции	Происхождение	Растение-хозяин	Год	Номер последовательности в GenBank		
				<i>tef</i>	<i>tub</i>	<i>rpb2</i>
MFG* 58227	Краснодарский край	пшеница	2009	MW811114	OK000500	OK000527
MFG 58471	Краснодарский край	пшеница	2012	MW811115	OK000501	OK000528
MFG 58486	Краснодарский край	пшеница	2012	MW811117	OK000503	OK000530
MFG 59046	Краснодарский край	пшеница	2016	MW811122	OK000508	OK000535
MFG 60309	Краснодарский край	пшеница	2017	MW811125	OK000513	OK000540
MFG 60803	Амурская обл.	пшеница	2019	MW811134	OK000522	OK000549
MFG 58589	Ленинградская обл.	овес	2013	MW811118	OK000504	OK000531
MFG 58590	Приморский край	овес	2013	MW811119	OK000505	OK000532
MFG 92501	Ленинградская обл.	овес	2007	MW811135	OK000524	OK000551
MFG 58667	Нижегородская обл.	овес	2014	MW811121	OK000507	OK000534
MFG 58484	Воронежская обл.	кукуруза	2012	MW811116	OK000502	OK000529
MFG 58603	Липецкая обл.	кукуруза	2012	MW811120	OK000506	OK000533

\*MFG – коллекция культур лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР, Санкт-Петербург, Россия.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Штаммы грибов *Fusarium*

Из коллекции чистых культур грибов, хранящихся в лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР, выбрали 12 штаммов (табл. 1), предварительно идентифицированных по сумме морфологических признаков как представители комплекса видов FF. Все штаммы выделены из собранных в различных регионах РФ образцов зерна: шесть – из пшеницы (*Triticum aestivum* L.), четыре – овса (*Avena sativa* L.) и два – из кукурузы (*Zea mays* L.).

### Молекулярно-генетический анализ

Все культуры грибов выращивали на картофельно-сахарозной агаризованной среде (КСА) в термостатируемом шкафу Binder KBW 400 (Германия) при 25°C в течение 7 сут. ДНК выделяли из мицелия по стандартной методике с помощью 2% раствора цетилтриметиламмонийбромиды и хлороформа.

Фрагменты генов *tef*, *tub* и *rpb2* амплифицировали с использованием праймеров EF1 / EF2, T1 / T2 и fRPB2-5F / fRPB2-7Cr [39]. Полученные фрагменты секвенировали методом Сэнгера на секвенаторе ABIPrism 3500 (Applied Biosystems – Hitachi, Япония) с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, США). Консенсусные нуклеотидные последовательности выравнивали в программе Vector NTI Advance 10 (Thermo Fisher Scientific, США) и депонировали в базу данных NCBI GenBank (табл. 1).

В филогенетический анализ были включены нуклеотидные последовательности репрезентатив-

ных штаммов *Fusarium* spp. из коллекций Службы сельскохозяйственных исследований (NRRL, США), Института грибного биоразнообразия Вестердейк (CBS, Нидерланды) и других коллекций (табл. 2). Филогенетические отношения между таксонами оценивали методом ML с помощью программы IQ-TREE 2 v.2.1.3. Лучшую модель замены нуклеотидов, используемую для построения деревьев ML (TIM2e+R2), также определяли в программе IQ-TREE 2 v.2.1.3. Достоверность топологии филогенетических деревьев определяли посредством бутстреп-анализа (1000 повторностей). Также рассчитывали значения BP с помощью MrBayes v. 3.2.1 на платформе Armadillo 1.1.

Тип спаривания штаммов идентифицировали с помощью аллель-специфической ПЦР с праймерами Gfmat1a/Gfmat1b (MAT1-1) и Gfmat1c/Gfmat1d (MAT1-2), разработанными для видов комплекса FF, и температурой отжига 55°C согласно протоколу [40]. Размеры фрагментов, соответствующих аллелям MAT1-1 и MAT1-2, составили 200 и 800 п.н. соответственно.

### Анализ токсинопродуцирующей способности грибов

В стеклянных сосудах объемом 250 мл смешивали 20 г рисовых зерен и 12 мл воды и автоклавировали при 121°C в течение 40 мин. Автоклавированные зерна риса охлаждали и инокулировали двумя дисками диаметром 5 мм, вырезанными из предварительно выращенных на КСА чистых культур грибов. Неинокулированные зерна использовали в качестве контроля. В течение двух недель колбы инкубиро-

Таблица 2. Референсные штаммы *Fusarium* spp., включенные в филогенетический анализ

Вид	Номер штамма	Происхождение	Субстрат	Год	Номер последовательности в GenBank		
					<i>tef</i>	<i>tub</i>	<i>rpb2</i>
<i>F. acutatum</i>	CBS 402.97 T	Индия		1995	MW402125	MW402323	MW402768
<i>F. acutatum</i>	NRRL 13308	Индия		1985	AF160276	MW402348	MN193883
<i>F. agaranthi</i>	NRRL 54463 T	Австралия	<i>Agaranthus</i> sp.	2010	KU900630	KU900635	KU900625
<i>F. agaranthi</i>	NRRL 54464	Австралия	<i>Agaranthus</i> sp.	2010	MN193856	KU900637	KU900627
<i>F. aglaonematis</i>	ZHKUCC 22-0077 T	Китай	<i>Aglaonema modestum</i> , стебель	2020	ON330437	ON330440	ON330443
<i>F. aglaonematis</i>	ZHKUCC 22-0078	Китай	<i>Aglaonema modestum</i> , стебель	2020	ON330438	ON330441	ON330444
<i>F. anthophilum</i>	CBS 119859	Новая Зеландия	<i>Cymbidium</i> sp., листья		MN533991	MN534092	MN534233
<i>F. anthophilum</i>	CBS 222.76 T	Германия	<i>Euphorbia pulcherrima</i> , стебель		MW402114	MW402312	MW402811
<i>F. concentricum</i>	CBS 450.97 T	Коста-Рика	<i>Musa sapientum</i> , плод	1983	AF160282	MW402334	JF741086
<i>F. concentricum</i>	CBS 453.97	Гватемала	<i>Musa sapientum</i>	1996	MN533998	MN534123	MN534264
<i>F. elaeagni</i>	LC 13627 T	Китай	<i>Elaeagnus pungens</i>	2017	MW580466	MW533748	MW474412
<i>F. elaeagni</i>	LC 13629	Китай	<i>Elaeagnus pungens</i>	2017	MW580468	MW533750	MW474414
<i>F. erosum</i>	LC 15877 T	Китай	кукуруза, стебель	2021	OQ126066	OQ126321	OQ126518
<i>F. erosum</i>	LC 18581	Китай	кукуруза, початок	2021	OQ126067	OQ126320	OQ126519
<i>F. fujikuroi</i>	CBS 221.76 T	Тайвань	<i>Oryza sativa</i> , стебель	1973	MN534010	MN534130	KU604255
<i>F. fujikuroi</i>	CBS 257.52	Япония	<i>Oryza sativa</i> , проросток	1947	MW402119	MW402317	MW402812
<i>F. globosum</i>	CBS 428.97 T	ЮАР	<i>Zea mays</i> , семена	1992	KF466417	MN534124	KF466406
<i>F. globosum</i>	CBS 120992	ЮАР	<i>Zea mays</i> , семена	1992	MW401998	MW402198	MW402788
<i>F. hechiense</i>	LC 13644 T	Китай	<i>Musa nana</i>	2017	MW580494	MW533773	MW474440
<i>F. hechiense</i>	LC 13646	Китай	<i>Musa nana</i>	2017	MW580496	MW533775	MW474442
<i>F. lumajangense</i>	InaCCF 872 T	Индонезия	<i>Musa acuminata</i> , стебель	2014	LS479441	LS479433	LS479850
<i>F. lumajangense</i>	InaCCF 993	Индонезия	<i>Musa acuminata</i> , стебель	2014	LS479442	LS479434	LS479851
<i>F. mangiferae</i>	CBS 120994 T	Израиль	<i>Mangifera indica</i>	1993	MN534017	MN534128	MN534271
<i>F. mangiferae</i>	NRRL 25226	Индия	<i>Mangifera indica</i>		AF160281	U61561	HM068353
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 744.97	США	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1994	AF160312	U34424	LT575065

Таблица 2 (продолжение).

Вид	Номер штамма	Происхождение	Субстрат	Год	Номер последовательности в GenBank		
					<i>tef</i>	<i>tub</i>	<i>rpb2</i>
<i>F. nygamai</i>	NRRL 13448 T	Австралия	<i>Sorghum bicolor</i>	1980	AF160273	U34426	EF470114
<i>F. nygamai</i>	CBS 834.85	Индия	<i>Cajanus cajan</i>		MW402154	MW402355	MW402821
<i>F. panlongense</i>	LC 13656 T	Китай	<i>Musa nana</i>	2017	MW580510	MW533789	MW474456
<i>F. panlongense</i>	MUCL 55950	Китай	<i>Musa</i> sp.	2012	LT574905	LT575070	LT574986
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 22944	Германия	<i>Cymbidium</i> sp.	1994	AF160280	U34416	JX171617
<i>F. proliferatum</i>	ITEM 2287	Италия			LT841245	LT841243	LT841252
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 31071	США	пшеница	2001	AF291058	AF291055	
<i>F. proliferatum</i>	NRRL 32155	Индия	<i>Cicer arietinum</i>		FJ538242		
<i>F. proliferatum</i>	CBS 131570	Иран	пшеница		JX118976		JX162521
<i>F. sacchari</i>	CBS 223.76 T	Индия	<i>Saccharum officinarum</i>	1975	MW402115	MW402313	JX171580
<i>F. sacchari</i>	CBS 131372	Австралия	<i>Oryza australiensis</i> , стебель	2009	MN534033	MN534134	MN534293
<i>F. sanyaense</i>	LC 15882 T	Китай	кукуруза, стебель	2021	OQ126093	OQ126322	OQ126547
<i>F. sanyaense</i>	LC 18540	Китай	кукуруза, стебель	2021	OQ126095	OQ126308	OQ126549
<i>F. siculi</i>	CBS 142222 T	Италия	<i>Citrus sinensis</i>	2015	LT746214	LT746346	LT746327
<i>F. siculi</i>	CPC 27189	Италия	<i>Citrus sinensis</i>		LT746215	LT746347	LT746328
<i>F. sterilihyposum</i>	NRRL 53991	Бразилия	<i>Mangifera indica</i>	2009	GU737413	GU737305	
<i>F. sterilihyposum</i>	NRRL 53997	Бразилия	<i>Mangifera indica</i>	2009	GU737414	GU737306	
<i>F. subglutinans</i>	CBS 536.95				MW402139	MW402339	
<i>F. subglutinans</i>	CBS 136481	Италия	кровь человека		MW402059	MW402258	MW402748
<i>F. verticillioides</i>	NRRL 22172	Германия	кукуруза	1992	AF160262	U34413	EF470122
<i>F. verticillioides</i>	CBS 531.95		<i>Zea mays</i>		MW402136	MW402336	MW402771
<i>F. xylaroides</i>	NRRL 25486 T	Кот-д'Ивуар	<i>Coffea</i> sp., ствол	1951	AY707136	AY707118	JX171630
<i>F. xylaroides</i>	CBS 749.79	Гвинея	<i>Coffea robusta</i>	1963	MN534049	MN534143	MN534259

Примечание. CBS – номер штамма в коллекции Института грибного биоразнообразия Вестердейк (Утрехт, Нидерланды); InaCCF – номер штамма в коллекции культур Индонезийского научно-исследовательского центра биологии (Чибинонг, Индонезия); ITEM – номер штамма в коллекции культур Института пищевых производств (Бари, Италия); LC – номер штамма в коллекции культур лаборатории Dr. Lei Cai Института микробиологии Китайской академии наук (Пекин, Китай); MUCL – номер штамма в коллекции лаборатории микологии Лувенского католического университета (Оттиньи-Лувен-ла-Нев, Бельгия); NRRL – номер штамма в коллекции Службы сельскохозяйственных исследований (Пеория, США); ZHKUSS – номер штамма в коллекции культур Чжункайского университета сельского хозяйства и инженерии (Гуанчжоу, Китай); T – типовой штамм вида.

вали в темноте при 25°C, ежедневно встряхивая. Затем образцы высушивали при 55°C в течение 24 ч, измельчали на лабораторной мельнице (ИКА, Германия) при 25000 об/мин в течение 1 мин и хранили при -20°C.

Профиль вторичных токсичных метаболитов, продуцируемых грибами, определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС [41]. К 5 г рисовой муки добавляли 20 мл экстракционного растворителя (ацетонитрил/вода/уксусная кислота, 79 : 20 : 1). Обнаружение и количественное определение вторичных метаболитов выполняли на системе AB SCIEX Triple Quad™ 5500 MS/MS (Applied Biosystems, США), оснащенной источником ионизации с электрораспылением TurboV (SCIEX, США) и системой микроволнового анализа Agilent Infinity серии 1290 (Agilent, США). Хроматографическое разделение проводили при 25°C на колонке Gemini C18, 150 × 4.6 мм (Phenomenex, США).

В экстрактах анализировали содержание БОВ, МОН, ФВ<sub>1</sub>, ФВ<sub>2</sub> и ФВ<sub>3</sub>. Степень извлечения микотоксинов составила 79–105%. Количество микотоксинов определяли, сравнивая площади пиков с калибровочными кривыми, полученными с использованием стандартных растворов (Romer Labs Diagnostic GmbH, Австрия). Нижние пределы количественного определения БОВ и МОН составили 1.9 и 3.1 мкг/кг, а ФВ<sub>1</sub>, ФВ<sub>2</sub> и ФВ<sub>3</sub> – 8.7, 3.2 и 3.2 мкг/кг соответственно.

### Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ MS Excel 2010 и Minitab 17.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Молекулярно-генетическая характеристика штаммов

В филогенетический анализ вошли комбинированные последовательности (1913 п.н.) трех локусов: *tef* – 615 п.н., *tub* – 473 п.н. и *rpb2* – 825 п.н., число информативных сайтов в которых составило 154 п.н. (25.0%), 70 п.н. (14.8%) и 141 п.н. (17.1%) соответственно. Все 12 штаммов вошли в отдельную кладу с бутстреп-поддержкой ML/VP 94/1.0, также включающую пять референсных штаммов *F. proliferatum* (рис. 2). Клада *F. proliferatum* распределялась среди азиатской группы видов FF, топология филогенетических деревьев, построенных разными методами, была сходной и соответствовала реконструированной ранее [1]. Полученное филогенетическое дерево показывает генетическое разнообразие *F. proliferatum*: анализируемые и референсные штаммы внутри клады распределились в несколько групп, состав которых не связан с географиче-

ским или субстратным происхождением штаммов. Сходное разделение *F. proliferatum* на группы, обусловленное высокой внутривидовой изменчивостью этого вида гриба, не связанное с происхождением штаммов, отмечали и ранее [8, 42, 43].

С помощью специфичной ПЦР установлено, что в генотипе каждого штамма *F. proliferatum* присутствует только одна идиоморфа в MAT-локусе, а соотношение MAT1-1 и MAT1-2 идиоморф у анализируемых штаммов составило 8 : 4. Причем у штаммов, выделенных из кукурузы, MAT-локус представлен только идиоморфой MAT1-2, тогда как у штаммов, выделенных из овса, – только MAT1-1. В штаммах, выделенных из пшеницы, найдены разные аллели MAT-локуса – соотношение MAT1-1 к MAT1-2 составило 4 : 2.

Очевидно, несбалансированная встречаемость штаммов *F. proliferatum* с альтернативным типом спаривания в популяции гриба сказывается на уменьшении частоты формирования половой стадии в природе, что снижает его генетическую изменчивость, а также, как следствие, на адаптации патогена к изменяющимся условиям окружающей среды. Ранее показали, что соотношение штаммов *F. proliferatum*, выделенных из культурных растений, имеющих разные идиоморфы в MAT-локусе, может варьировать [8, 42]. Однако штаммы *F. proliferatum*, выделенные из зерна твердой пшеницы в Аргентине, характеризовались равной частотой альтернативных аллелей MAT-локуса, что позволило прогнозировать высокую вероятность обнаружения половой стадии гриба на полях пшеницы [42].

### Профиль микотоксинов, продуцируемых *F. proliferatum*

В экстрактах, полученных из инокулированных зерен риса, выявлены все пять анализируемых микотоксинов – БОВ, МОН и ФВ<sub>1</sub>, ФВ<sub>2</sub>, ФВ<sub>3</sub>, тогда как в исходном автоклавированном зерне риса эти соединения не обнаружены.

Все штаммы *F. proliferatum* были активными продуцентами ФУМ (суммарное количество трех микотоксинов составило 100–9424 мг/кг), из которых наиболее представленным был ФВ<sub>1</sub> (53–82% от суммы ФУМ), количества других были ниже – ФВ<sub>2</sub> (9–28%), ФВ<sub>3</sub> (2–39%). Штамм MFG 58590, выделенный из зерна овса из Приморского края, продуцировал наибольшее количество всех ФУМ. У двух штаммов – MFG 92501 и MFG 60803 – суммарное количество ФВ<sub>1</sub>, ФВ<sub>2</sub>, ФВ<sub>3</sub> составило 100 и 135 мг/кг, что значимо ниже, чем у других штаммов – 1077–7077 мг/кг (рис. 3).

Все штаммы *F. proliferatum* также продуцировали сходные высокие количества

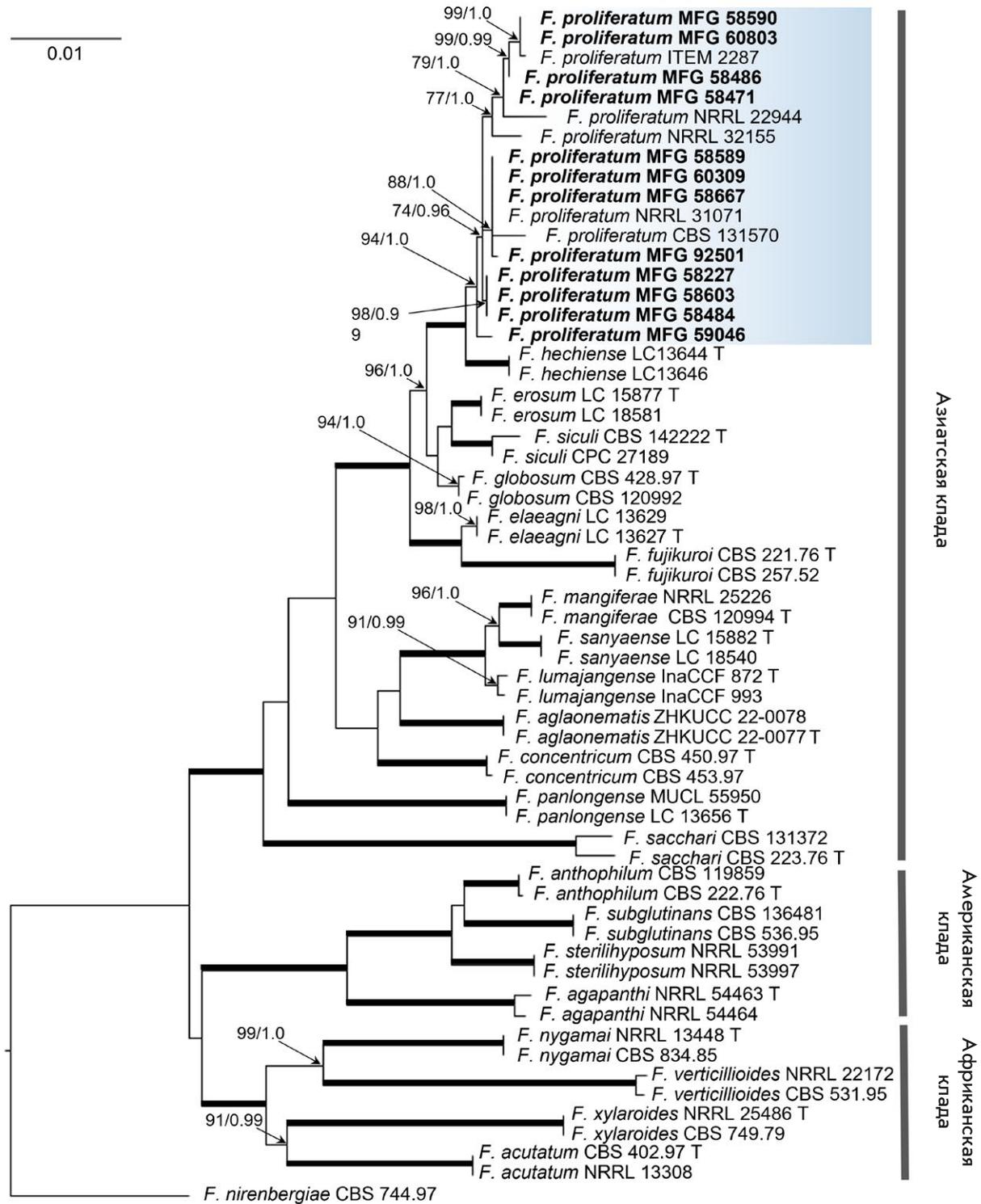


Рис. 2. Дендрограмма филогенетического сходства *Fusarium* spp., построенная на основе комбинированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *tef*, *tub* и *rpb2* методом ML. В узлах приведены значения бутстреп-поддержки (> 70%) при анализе методом ML, а также значения BP (> 0.95). Утолщенные линии обозначают поддержку ML/BP 100/1.0. Полуужирным шрифтом показаны штаммы из коллекции MFG, включенные в исследование. Штамм *F. nirenbergiae* CBS 744.97 выбран в качестве внешней группы

БОВ – от 64 до 455 мг/кг. Продукция МОН была существенно ниже, чем четырех других микотоксинов, и варьировала – от 12 до 6565 мкг/кг. В профиле микотоксинов штамма MFG 92501 МОН не выявлен.

Преобладание ФВ<sub>1</sub> по сравнению с другими ФУМ характерно для профиля микотоксинов *F. proliferatum* независимо от субстратного происхождения штаммов [12, 37, 38, 44]. В нашем исследовании не выявлено значимого влияния субстратного происхождения штамма на его способность к токсинообразованию (табл. 3). Известно, что на рост *F. proliferatum* и его способность продуцировать ФУМ влияет множество абиотических и биотических факторов [45–47]. Широкий спектр растений-хозяев *F. proliferatum* указывает на его высокие адаптационные способности, в том числе за счет синтезируемых вторичных метаболитов. Установлено, что способность продуцировать микотоксины не связана с растением-хозяином, из которого выделен *F. proliferatum* [23]. Заражение пшеницы штаммами этого гриба, выделенными из разных хозяев, приводило к накоплению в зерне ФВ<sub>1</sub> и БОВ [23], несмотря на то что изначально они различались по активности токсинообразования, и выявленное количество ФВ<sub>1</sub> в зараженных зернах пшеницы оказалось намного ниже, чем обычно встречается в кукурузе. Ранее показали, что у штаммов *F. proliferatum*, выделенных из зерна кукурузы, признак образования ФВ<sub>1</sub> оказался более вариабельным, чем у штаммов из зерна пшеницы [36]. Представление о роли ФУМ, в частности ФВ<sub>1</sub>, как фактора патогенности *F. proliferatum* до сих пор противоречиво [48]. У грибов *Fusarium*, продуцентов ФУМ, выявлен кластер генов (*FUM*), ответственных за биосинтез этих микотоксинов [1, 11]. Показано, что гены *FUM1*, *FUM6*, *FUM8* и *FUM21*, в отличие от *FUM19*, необходимы для синтеза ФУМ штаммами *F. proliferatum*. Делеция этих генов приводит не только к утрате способности синтезировать микотоксины, но и к уменьшению агрессивности штаммов в отношении растения-хозяина [49]. В то же время недавно установили, что штаммы *F. proliferatum*, выделенные из чеснока, могли продуцировать ФУМ *in vitro*, но не обязательно продуцировали их *in planta*

Таблица 3. Токсинопродуцирующая способность штаммов *F. proliferatum*, выделенных из разных зерновых культур

Растение-хозяин (число штаммов)	Микотоксины*		
	ФУМ, мг/кг	БОВ, мг/кг	МОН, мкг/кг
Пшеница (6)	3470 ± 1008	307 ± 67	1690 ± 764
Овёс (4)	4024 ± 1930	385 ± 43	260 ± 158
Кукуруза (2)	3538; 5578	363; 158	1041; 6565

\*Приведены средние значения и доверительный интервал при уровне значимости  $p < 0.05$ .

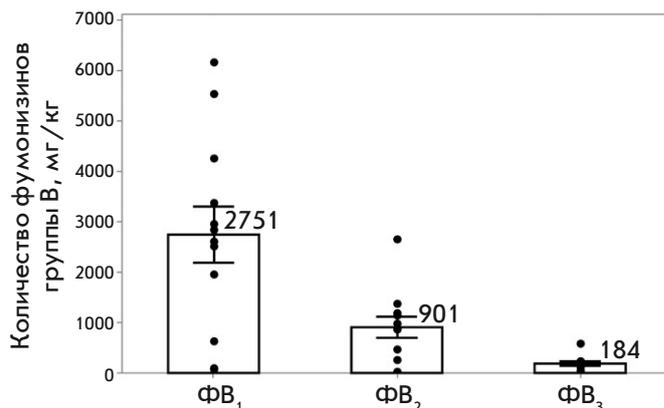


Рис. 3. Способность штаммов *F. proliferatum* продуцировать ФУМ (автоклавированный рис, 25°C, 14 сут, без освещения). Показаны средние значения и доверительные интервалы при уровне значимости  $p < 0.05$ ; точками отмечены значения для индивидуальных штаммов

[38]. Кроме того, при колонизации растения гриб подвергается воздействию метаболитов хозяина, которые также могут влиять на синтез и количество продуцируемых микотоксинов [50]. До сих пор, несмотря на присутствие *F. proliferatum* в микобиоте пшеницы, ячменя и овса, выращенных на территории Евразии, обнаружение высоких количеств ФУМ в зерне этих злаков является нетипичной ситуацией, в отличие от частой контаминации их БОВ и реже МОН [30, 51, 52]. Предположительно, зерно пшеницы, в сравнении с кукурузой, является менее благоприятным субстратом для накопления ФУМ [23, 44].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Филогенетический анализ штаммов *F. proliferatum*, выделенных из трех зерновых культур, выращенных на территории РФ, показал значительную внутривидовую гетерогенность гриба, не связанную с географическим и субстратным происхождением штаммов. Несбалансированная встречаемость штаммов *F. proliferatum* различного типа спаривания, вероятно, приводит к снижению роли полового процесса в жизненном цикле этого гетерогаметного гриба. Высокая токсинопродуцирующая способность *F. proliferatum*

в совокупности с благоприятными факторами предполагает риск контаминации зерна микотоксинами и необходимость мониторинга загрязнения. ●

Работа выполнена при поддержке  
Российского научного фонда  
(проект № 19-76-30005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yilmaz N., Sandoval-Denis M., Lombard L., Visagie C.M., Wingfield B.D., Crous P.W. // *Persoonia*. 2021. V. 46. P. 129–162.
2. Leslie J.F. // *Canadian J. Botany*. 1995. V. 7. P. 282–291.
3. O'Donnell K., Nirenberg H.I., Aoki T., Cigelnik E. // *Mycoscience*. 2000. V. 41. P. 61–78.
4. Kvas M., Marasas W.F.O., Wingfield B.D., Wingfield M.J., Steenkamp E.T. // *Fungal Diversity*. 2009. V. 34. P. 1–21.
5. Wigmann E.F., Behr J., Vogel R.F., Niessen L. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 5323–5337.
6. Brown D.W., Proctor R.H. // *Fungal Genetics Biol.* 2016. V. 89. P. 37–51.
7. Niehaus E.-M., Münsterkötter M., Proctor R.H., Brown D.W., Sharon A., Idan Y., Oren-Young L., Sieber C. M., Novák O., Pěňčík A., et al. // *Genome Biol. Evol.* 2016. V. 8. № 11. P. 3574–3599.
8. Jurado M., Marín P., Callejas C., Moretti A., Vázquez C., González-Jaén M.T. // *Food Microbiol.* 2010. V. 27. № 1. P. 50–57.
9. Proctor R.H., van Hove F., Susca A., Stea G., Busman M., van der Lee T., Waalwijk C., Moretti A., Ward T.J. // *Mol. Microbiol.* 2013. V. 90. № 2. P. 290–306.
10. Stępień L., Koczyk G., Waśkiewicz A. // *Fungal Biol.* 2011. V. 115. № 2. P. 112–123.
11. Proctor R.H., Desjardins A.E., Moretti A. The role of plant pathology in food safety and food security / Eds Strange R., Gullino M. Dordrecht: Springer, 2010. V. 3. P. 97–111.
12. Qiu J., Lu Y., He D., Lee Y.W., Ji F., Xu J., Shi J. // *Plant Disease*. 2020. V. 104. № 8. P. 2193–2201.
13. Yu H., Hwang S.F., Strelkov S.E. // *Pathogens*. 2024. V. 13. № 5. P. 407.
14. Mondani L., Chiusa G., Pietri A., Battilani P. // *Postharvest Biol. Technol.* 2021. V. 173. Art. 111407.
15. Xie L., Wu Y., Duan X., Li T., Jiang Y. // *Microbiol. Res.* 2022. V. 256. Art. 126952.
16. Duan Y.N., Jiang W.T., Zhang R., Chen R., Chen X.S., Yin C.M., Mao Z.Q. // *Plant Dis.* 2022. V. 106. № 11. P. 2958–2966.
17. López-Moral A., Antón-Domínguez B.I., Lovera M., Arquerro O., Trapero A., Agustí-Brisach C. // *Sci. Repts.* 2024. V. 14. Art. 5720.
18. Gaige A.R., Todd T., Stack J.P. // *Plant Dis.* 2020. V. 104. № 8. P. 2102–2110.
19. Koo Y.M., Ahsan S.M., Choi H.W. // *Mycobiology*. 2023. V. 51. № 3. P. 186–194.
20. Munkvold G.P. // *Eur. J. Plant Pathol.* 2003. V. 109. P. 705–713.
21. Desjardins A.E., Busman M., Proctor R.H., Stessman R. // *Food Addit. Contam. Part A*. 2007. V. 24. № 10. P. 1131–1137.
22. Molnár O. // *Eur. J. Plant Pathol.* 2016. V. 146. P. 699–703.
23. Guo Z., Pfohl K., Karlovsky P., Dehne H.W., Altincicek B. // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 9. Art. e0204602.
24. Gaige A.R., Giraldo M., Todd T., Stack J.P. // *Canadian J. Plant Pathol.* 2019. V. 41. № 2. P. 242–250.
25. Booth C. The genus *Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237 p.
26. Martin S.H., Wingfield B.D., Wingfield M.J., Steenkamp E.T. // *Fungal Genet. Biol.* 2011. V. 48. P. 731–740.
27. Leslie J.F., Klein K.K. // *Genetics*. 1996. V. 144. P. 557–567.
28. Stankovic S., Levic J., Petrovic T., Logrieco A., Moretti A. // *Eur. J. Plant Pathol.* 2007. V. 118. P. 165–172.
29. Guo Z., Pfohl K., Karlovsky P., Dehne H.-W., Altincicek B. // *Agricult. Food Sci.* 2016. V. 25. P. 138–145.
30. Senatore M.T., Prodi A., Tini F., Balmas V., Infantino A., Onofri A., Cappelletti E., Oufensou S., Sulyok M., Covarelli L. // *J. Sci. Food Agriculture*. 2023. V. 103. № 9. P. 4503–4521.
31. Stanković S., Lević J., Krnjaja V. // *Biotechnol. Animal Husbandry*. 2011. V. 27. № 3. P. 631–641.
32. Cendoya E., Chiotta M.L., Zchetti V., Chulze S.N., Ramirez M.L. // *J. Cereal Sci.* 2018. V. 80. P. 158–166.
33. Kononenko G.P., Burkin A.A., Zotova Ye.V. // *Veterinary Sci. Today*. 2020. V. 2. P. 139–145.
34. Kamle M., Mahato D.K., Devi S., Lee K.E., Kang S.G., Kumar P. // *Toxins*. 2019. V. 11. № 6. Art. 328.
35. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Зотова Е.В., Смирнов А.М. // *Рос. сельскохозяй. наука*. 2019. № 3. С. 28–31.
36. Tancic S., Stankovic S., Levic J., Krnjaja V., Vukojevi J. // *Genetika*. 2012. V. 44. № 1. P. 163–176.
37. Gálvez L., Urbaniak M., Waśkiewicz A., Stępień Ł., Palmero D. // *Food Microbiol.* 2017. V. 67. P. 41–48.
38. Gasser K., Sulyok M., Spangl B., Krska R., Steinkellner S., Hage-Ahmed K. // *Postharvest Biol. Technol.* 2023. V. 200. Art. 112312.
39. O'Donnell K., Laraba I., Geiser D.M. *Fusarium wilt. Methods in molecular biology*. New York: Humana, 2022. P. 1–20.
40. Steenkamp E.T., Wingfield B.D., Coutinho T.A., Zeller K.A., Wingfield M.J., Marasas W.F.O., Leslie J.F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 4378–4382.
41. Malachová A., Sulyok M., Beltrán E., Berthillera F., Krska R. // *J. Chromatography A*. 2014. V. 1362. P. 145–156.
42. Palacios S.A., Susca A., Haidukowski M., Stea G., Cendoya E., Ramírez M.L., Chulze S.N., Farnochi M.C., Moretti A., Torres A.M. // *Internat. J. Food Microbiol.* 2015. V. 201. P. 35–41.
43. Wang L., Liu Q., Ge S., Liang W., Liao W., Li W., Jiao G., Wei X., Shao G., Xie L., et al. // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 1004454.
44. Busman M., Desjardins A.E., Proctor R.H. // *Food Addit. Contam. Part A*. 2012. V. 29. № 7. P. 1092–1100.
45. Cendoya E., Pinson-Gadais L., Farnochi M.C., Ramirez M.L., Chéreau S., Marcheguay G., Ducos C., Barreau C., Richard-Forget F. // *Internat. J. Food Microbiol.* 2017. V. 253. P. 12–19.
46. Vismer H.F., Shephard G.S., van der Westhuizen L., Mngqawa P., Bushula-Njah V., Leslie J.F. // *Internat. J. Food Microbiol.* 2019. V. 296. P. 31–36.
47. Dong T., Qiao S., Xu J., Shi J., Qiu J., Ma G. // *Toxins*. 2023. V. 15. № 4. Art. 260.
48. Xie L., Wu Y., Wang Y., Jiang Y., Yang B., Duan X., Li T. // *Environ. Poll.* 2021. V. 288. Art. 117793.
49. Sun L., Chen X., Gao J., Zhao Y., Liu L., Hou Y., Wang L., Huang S. // *Toxins*. 2019. V. 11. № 6. Art. 327.
50. Lalak-Kańczugowska J., Witaszak N., Waśkiewicz A., Bocianowski J., Stępień Ł. // *Internat. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 3. Art. 3002.
51. Fraeyman S., Croubels S., Devreese M., Antonissen G. // *Toxins*. 2017. V. 9. № 7. Art. 228.
52. Gavrilova O.P., Gagkaeva T.Yu., Orina A.S., Gogina N.N. // *Dokl. Biol. Sci.* 2023. V. 508. № 1. P. 9–19.

УДК 577.29

# Индукция синтеза шаперонов в нейрональных клетках человека блокирует старение, вызванное окислительным стрессом

Е. А. Дутышева<sup>1</sup>, Л. С. Кузнецова<sup>1</sup>, И. А. Утепова<sup>2,3</sup>, Б. А. Маргулис<sup>1</sup>, И. В. Гужова<sup>1</sup>, В. Ф. Лазарев<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург Россия<sup>2</sup>Уральский Федеральный университет им. Первого президента России Б.Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург Россия<sup>3</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620108, Екатеринбург Россия

\*E-mail: lazarev@incras.ru

Поступила в редакцию 08.10.2024

Принята к печати 19.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27531

**РЕФЕРАТ** Окислительный стресс сопровождается многие патологии, характеризующиеся деградацией нейронов, приводя к более тяжелой форме течения этих заболеваний. Среди основных причин таких последствий – нарушение белкового гомеостаза и запуск необратимых процессов деградации клеточного цикла и клеточной физиологии, приводящих к старению. Нами предложен новый подход к борьбе со старением, вызванным окислительным стрессом, основанный на использовании низкомолекулярного индуктора синтеза шаперонов – одной из защитных систем клетки, регулирующей протеостаз и апоптоз. Представлены данные, демонстрирующие способность производного пирролилазина – PQ-29 – индуцировать накопление шаперонов в нейрональных клетках человека и предотвращать развитие старения, вызванного окислительным стрессом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** окислительный стресс, сенесценция, шапероны, пирролилазины, апоптоз, нейропротекция.

## ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс сопровождается подавляющее большинство патологий, характеризующихся деградацией нейронов, включая нейродегенеративные заболевания, черепно-мозговые травмы, инсульты и т.д. При этом, с одной стороны, появление активных форм кислорода (АФК) в нейрональных клетках вызывает повреждение белков, липидов и ДНК и, соответственно, провоцирует процессы клеточного старения, что в свою очередь повышает риск развития других сопутствующих заболеваний.

Основным источником и мишенью АФК в клетке являются митохондрии. АФК могут вызывать коллапс мембранного потенциала митохондрий, разрушение ультраструктуры митохондрий и истощение АТФ [1]. Повреждение митохондрий способно приводить к некрозу или апоптозу. Кроме того, окислительный стресс и митохондриальная дисфункция могут активировать пути p53/p21 и Rb/p16 [2]. Оба эти пути увеличивают экспрессию и активность β-галактозидазы, связанной со старением. Таким образом, борьба с повреждающими клетку послед-

ствиями окислительного стресса является важной частью терапии большинства нейродегенеративных процессов.

Один из важных факторов защиты нервных клеток – наличие белков теплового шока (HSP, шапероны). Эти белки играют значимую роль в предотвращении различных путей гибели клеток, они необходимы для таргетирования и разрушения поврежденных белков внутри клетки. Например, шаперон Hsp70 может предотвращать образование апоптосом, взаимодействовать с индуцирующим апоптоз фактором AIF и проапоптотическим белком Vim, а также препятствует активации каспаз-3 и -7 [3–5].

Другой шаперон, белок Hsp90, также подавляет активацию сигнальных систем клеточной смерти. Установлено, что Hsp90 препятствует образованию апоптосом, прикрепляясь к Araf-1, тем самым предотвращая его олигомеризацию и привлечение каспазы-9, необходимой для образования апоптосом [6]. Важно отметить, что как Hsp70, так и Hsp90 связывают денатурированные, неправильно свернутые белки, в том числе вследствие чрезмерного окис-

ления, и предотвращают их предрасположенность к образованию олигомеров и агрегатов [7].

Другие важные белки, необходимые для правильной работы шаперонной машины, – это кошапероны – полипептиды, содержащие j-домен, в частности Hsp40. Кошаперонные белки регулируют образование комплексов между Hsp70 и клиентскими белками, таким образом участвуя в распознавании и деградации денатурированных и окисленных белков [8].

В этом контексте интересен потенциал использования химических соединений для стимуляции белков теплового шока в качестве средства защиты нервной системы. Соединения, способные вызывать накопление шаперонов в клетках, продемонстрировали свою эффективность в моделях болезни Паркинсона [9] и Альцгеймера [10], вторичного повреждения после черепно-мозговой травмы [11] и многих других [12]. Ранее мы обнаружили, что некоторые соединения, относящиеся к классу пирролазинов, способны активировать синтез и накопление шаперонов, что приводило к терапевтическому эффекту в модели болезни Альцгеймера *in vitro* [13]. Одним из наиболее эффективных соединений является 3-(5-фенил-1H-пиррол-2-ил)хиноксалин-2(1H)-он (PQ-29). В данной работе мы изучили способность этого соединения предотвращать развитие старения, вызванного окислительным стрессом в нейрональных клетках человека.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Нейрональные клетки

Для подтверждения шаперон-индуцирующих и нейротекторных эффектов пирролазинов мы использовали мезенхимальные стволовые клетки, полученные из пульпы зуба человека (MSC-DP), как описано ранее [14]. Клетки MSC-DP получены из «Коллекции культур клеток позвоночных», поддержанной грантом Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% сыворотки плода крупного рогатого скота (FBS; Gibco, США), 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина («БиолоТ», Россия) при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Затем фенотип клеток изменяли на нейрональный (MSC-Neu), инкубируя в течение 5 дней в среде Neurobasal (BioinnLabs, Россия) с добавлением компонента Neuromax (PanEco, Россия), 3% сыворотки плода крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина (PanEco). Нейрональный фенотип верифицировали, анализируя экспрессию панели маркеров зрелых нейронов

[15, 16], включая β3-тубулин, NeuN, MAP2, синаптофизин (Syn), PSD95 и NeuroD1, с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР).

### Выделение РНК и ПЦР в реальном времени

РНК выделяли с помощью ExtractRNA (АО «Евроген», Москва, Россия), а затем проводили обратную транскрипцию с помощью набора MMLVRT (АО «Евроген») в соответствии с инструкциями производителя. ОТ-ПЦР проводили с использованием системы детекции ПЦР в реальном времени CFX96 (BioRad, США) и qPCRMix-HSSYBR (АО «Евроген») в соответствии с протоколом производителя. Подлинность ампликонов подтверждали с помощью анализа кривой плавления. Последовательности праймеров представлены в *табл. 1*, все праймеры синтезированы в АО «Евроген». Параметры ПЦР были следующими: 5 мин предварительной денатурации при 95°C, затем 40 циклов по 30 с при 95°C, 30 с при 65°C и 30 с при 70°C. Данные анализировали на кратность изменения с использованием программного обеспечения BioRadCFX.

### Анализ старения

Активность β-галактозидазы в клетках MSC-DP или MSC-Neu оценивали с помощью набора β-Glo (Promega, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Затем измеряли сигнал люминесценции с помощью прибора VarioscanLux (ThermoFisherScientific, США).

Таблица 1. Праймеры, использованные в исследовании

Ген	Праймер, нуклеотидная последовательность
Актин	F – 5'-TCAATGTCCTCCAGCCATGTATGT-3'
	R – 5'-GTGACACCATCTCCAGAGTCC-3'
NeuN	F – 5'-CAAGGACGGTCCAGAAGGAG-3'
	R – 5'-GGTAGTGGGAGGTGAGGTCT-3'
MAP2	F – 5'-GGAGGGCGCTAAGTCCG-3'
	R – 5'-AAAATCTGGGCGCAGAAACTG-3'
NeuroD1	F – 5'-TCTTCCACGTTAAGCCTCCG-3'
	R – 5'-CCATCAAAGGAAGGGCTGGT-3'
β3-тубулин	F – 5'-CCATGAAGGAGGTGGACGAG-3'
	R – 5'-ACGTTGTTGGGGATCCAATC-3'
Syn	F – 5'-CTTCGCCATCTTOGCTTTG-3'
	R – 5'-TCACTCTCGGTCTTGTGGC-3'
PSD95	F – 5'-GGATATGTGAACGGGACCGA-3'
	R – 5'-AAGCCCAGACCTGAGTTACC-3'
p16	F – 5'-ATAGTTACGGTTCGGAGGCCG-3'
	R – 5'-CACGGGTCGGGTGAGAGTG-3'
p21	F – 5'-CTCAGAGGAGGCGCCATGT-3'
	R – 5'-CGCCATTAGCGCATCACAG-3'

### Электрофорез и вестерн-блот-анализ

Клетки MSC-Neu обрабатывали пероксидом водорода в концентрации 100 мкМ в течение 2 ч, а затем подвергали воздействию PQ-29 в концентрации 0,5, 2, 8 или 300 мкМ в течение 1 или 2 ч. После этого клетки лизировали, лизаты использовали для электрофореза и блотинга в соответствии с ранее описанным протоколом [17], результаты анализировали с помощью антител к Hsp40 (клон J32), Hsp70 (клон 3C5) [18], Hsp90 (ThermoFisherScientific, США) и тубулину (ThermoFisherScientific) в качестве контроля нагрузки. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена козы антимышинные и козы антикроличьи антитела («Репертуар», Россия). Интенсивность полос рассчитывали в условных единицах (у. е.) с использованием программного обеспечения TotalLabQuant 1.0 (TotalLab, Gosforth, Великобритания), данные нормировали по средней интенсивности окрашивания тубулина.

### Анализ цитотоксичности

Цитотоксические эффекты PQ-29 оценивали, используя анализ активности дегидрогеназ по Моссману (МТТ), согласно [19].  $LC_{50}$  определяли на основе результатов эксперимента, в котором клетки MSC-Neu инкубировали с PQ-29 в концентрации от 0,05 до 1000 мкМ. После 48 ч инкубации проводили МТТ-тест. Каждый эксперимент проводили в четырех повторностях.

Для оценки развития процессов некроза и апоптоза клетки помещали в 96-луночный планшет и обрабатывали бромистым этидием и акридиновым оранжевым в фосфатно-солевом буфере (PBS) в концентрации 5 мг/мл для каждого красителя. Затем окрашенные клетки исследовали с помощью Zeiss Axioscope (Carl Zeiss, Германия).

### Статистический анализ

Рассчитывали среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Данные анализировали с использованием непараметрического теста Манна–Уитни с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 8. Каждый эксперимент проводили минимум 3 раза. Величины  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

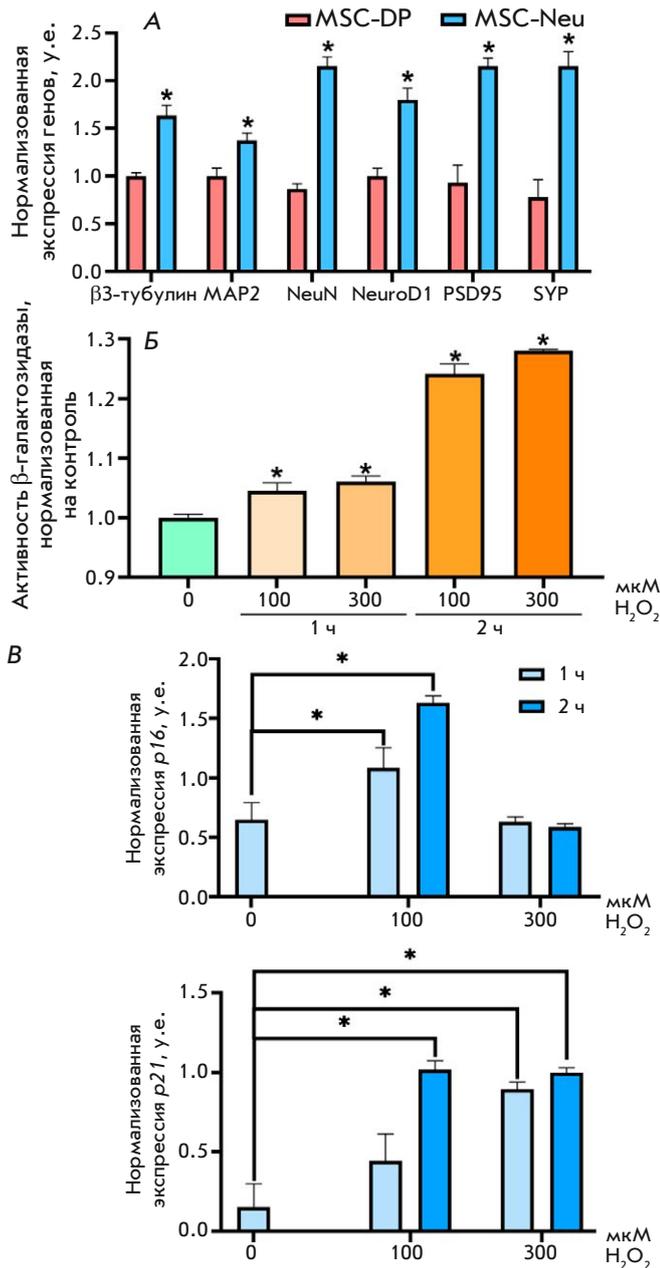
Первым этапом нашей работы стала проверка модели старения нейрональных клеток человека, индуцированного окислительным стрессом. С этой целью использовали мезенхимальные стволовые клетки человека из пульпы зуба MSC-DP, перепрограммированные в нейрональный фенотип – MSC-Neu.

Для проверки приобретения нейронального фенотипа MSC-Neu после процедуры дифференцировки мы анализировали с помощью ОТ-ПЦР маркеры нейронального фенотипа –  $\beta$ 3-тубулин, MAP2, синаптофизин, NeuroD1, PSD95 и NeuN. По данным ОТ-ПЦР количество мРНК исследуемых генов существенно возросло после дифференцировки. Так, экспрессия маркеров зрелых нейронов (а именно, синаптофизина, NeuroD1, PSD95, NeuN) увеличилась примерно в 3 раза (рис. 1А). Экспрессия более ранних нейрональных маркеров ( $\beta$ 3-тубулин, MAP2) также увеличилась, но не так значительно – примерно в 1,4–1,5 раза.

Далее мы проверили способность пероксида водорода вызывать старение в нейрональных клетках человека. Для этого клетки MSC-Neu культивировали в присутствии 100 или 300 мкМ пероксида водорода в течение 1 или 2 ч. Затем в клетках определяли активность известного маркера старения, фермента  $\beta$ -галактозидазы с помощью набора  $\beta$ -Glo (рис. 1Б). Обнаружено, что культивирование клеток MSC-Neu в присутствии пероксида водорода в течение 1 ч приводило к увеличению активности  $\beta$ -галактозидазы на 4,4 и 6,2% при использовании 100 и 300 мкМ пероксида водорода соответственно. Культивирование клеток MSC-Neu в присутствии 100 и 300 мкМ пероксида водорода в течение 2 ч привело к увеличению активности  $\beta$ -галактозидазы на 24,2 и 28,1% соответственно.

Для подтверждения релевантности изменения активности  $\beta$ -галактозидазы оценивали изменения в экспрессии генов белков p16 и p21, которые играют важную роль в двух ключевых каскадах, инициирующих старение. Используя метод ОТ-ПЦР, обнаружили, что инкубация клеток в присутствии 100 мкМ пероксида водорода в течение 1 ч привела к увеличению количества мРНК p16 и p21 в 1,68 и 2,93 раза соответственно, а в течение 2 ч – в 2,55 и 6,78 раза соответственно (рис. 1В). Использование более высоких концентраций пероксида водорода не вызвало увеличения количества мРНК p16 или p21, по-видимому, из-за высокой токсичности. В дальнейших экспериментах по моделированию старения, вызванного окислительным стрессом, мы культивировали MSC-Neu в присутствии 100 мкМ пероксида водорода в течение 2 ч.

Следующим этапом нашей работы стало изучение способности соединения PQ-29 (структурная формула представлена на рис. 2А) вызывать активацию синтеза и накопление шаперонов в нейрональных клетках, состарившихся в условиях окислительного стресса. Ранее мы установили способность PQ-29 индуцировать синтез шаперонов в нейрональных клетках, однако необходимо было убедиться,

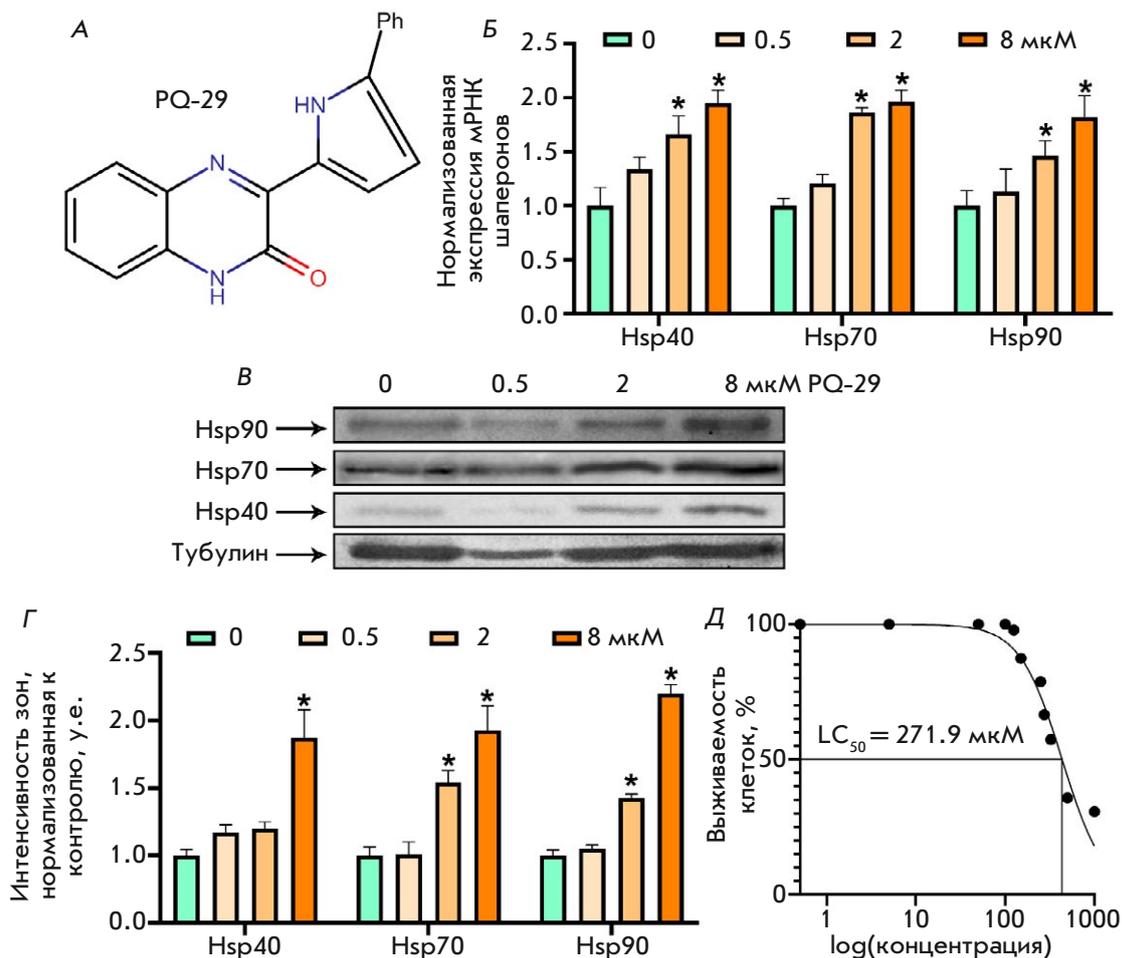


**Рис. 1.** Пероксид водорода вызывает старение в перепрограммированных человеческих нейронах MSC-Neu. А – анализ экспрессии нейрональных маркеров в клетках MSC-DP (до дифференцировки) и MSC-Neu (после дифференцировки). В качестве контроля использовали мРНК актина. Б – инкубация клеток MSC-Neu в течение 1 и 2 ч в присутствии пероксида водорода в концентрации 100 и 300 мкМ вызывает увеличение активности β-галактозидазы. В – инкубация клеток MSC-Neu в течение 1 и 2 ч в присутствии пероксида водорода в концентрации 100 и 300 мкМ вызывает увеличение уровней мРНК p16 (верхняя панель) и p21 (нижняя панель). Представлены средние значения ± стандартное отклонение из трех отдельных экспериментов, а наблюдаемые различия статистически значимы при \**p* < 0.05 (тест Манна–Уитни)

что PQ-29 может влиять и на стареющие клетки. Мы использовали метод ОТ-ПЦР для оценки количества мРНК шаперонов в клетках MSC-Neu, состарившихся в условиях окислительного стресса, после их культивирования в присутствии PQ-29 в течение 6 ч. Обнаружено, что экспрессия основных индуцибельных шаперонов, т.е. Hsp40, Hsp70 и Hsp90, увеличивалась после обработки клеток PQ-29, состарившихся в условиях окислительного стресса. Так, использование 8 мкМ PQ-29 вызвало увеличение количества мРНК Hsp40 в 1.95 раза, Hsp70 в 1.97 раза и Hsp90 в 1.82 раза (рис. 2Б). Далее с помощью вестерн-блоттинга оценили количество шаперонов в клетках MSC-Neu после их культивирования в присутствии PQ-29 в течение 24 ч. Показано, что использование 8 мкМ PQ-29 привело к увеличению количества Hsp40 в 1.87 раза, Hsp70 в 1.93 раза и Hsp90 в 2.2 раза (рис. 2В,Г).

Ранее мы установили, что PQ-29 обладает низкой цитотоксичностью [13], но нам нужно было убедиться, что его цитотоксичность не увеличится при воздействии на клетки, состаренные окислительным стрессом. Для этого с помощью метода МТТ определили величину LC<sub>50</sub> PQ-29 для клеток MSC-Neu, состаренных под воздействием окислительного стресса (рис. 2Д). Обнаружено, что величина LC<sub>50</sub> в таких условиях равна 271.9 мкМ. Таким образом, PQ-29 в использованных концентрациях не оказывал существенного цитотоксического эффекта на состаренные клетки.

На заключительном этапе работы изучали способность PQ-29 предотвращать старение и деградацию нейронов, вызванные окислительным стрессом. Стареющие под действием окислительного стресса клетки MSC-Neu культивировали с PQ-29 в различных концентрациях, а затем оценивали активность β-галактозидазы (с помощью набора β-Glo) и жизнеспособность клеток (окрашивание акридиновым оранжевым). Обнаружено, что PQ-29 в концентрации 2 и 8 мкМ предотвращал повышение активности β-галактозидазы, вызванное окислительным стрессом, на 9.4 и 24.3% соответственно (рис. 3А). Далее мы проанализировали уровень экспрессии генов белков p16 и p21 – известных маркеров старения – в стареющих клетках MSC-Neu в присутствии PQ-29. Оказалось, что PQ-29 в концентрации 8 мкМ предотвращал увеличение экспрессии p16, вызванное окислительным стрессом, на 78.3% (рис. 3Б, левая панель). Одновременно PQ-29 в концентрациях 2 и 8 мкМ предотвращал увеличение экспрессии p21 на 54.7 и 47.8% (рис. 3Б, правая панель). Наконец, с помощью окрашивания акридиновым оранжевым мы определили долю клеток, состарившихся из-за окислительного стресса, которые перешли в апоп-

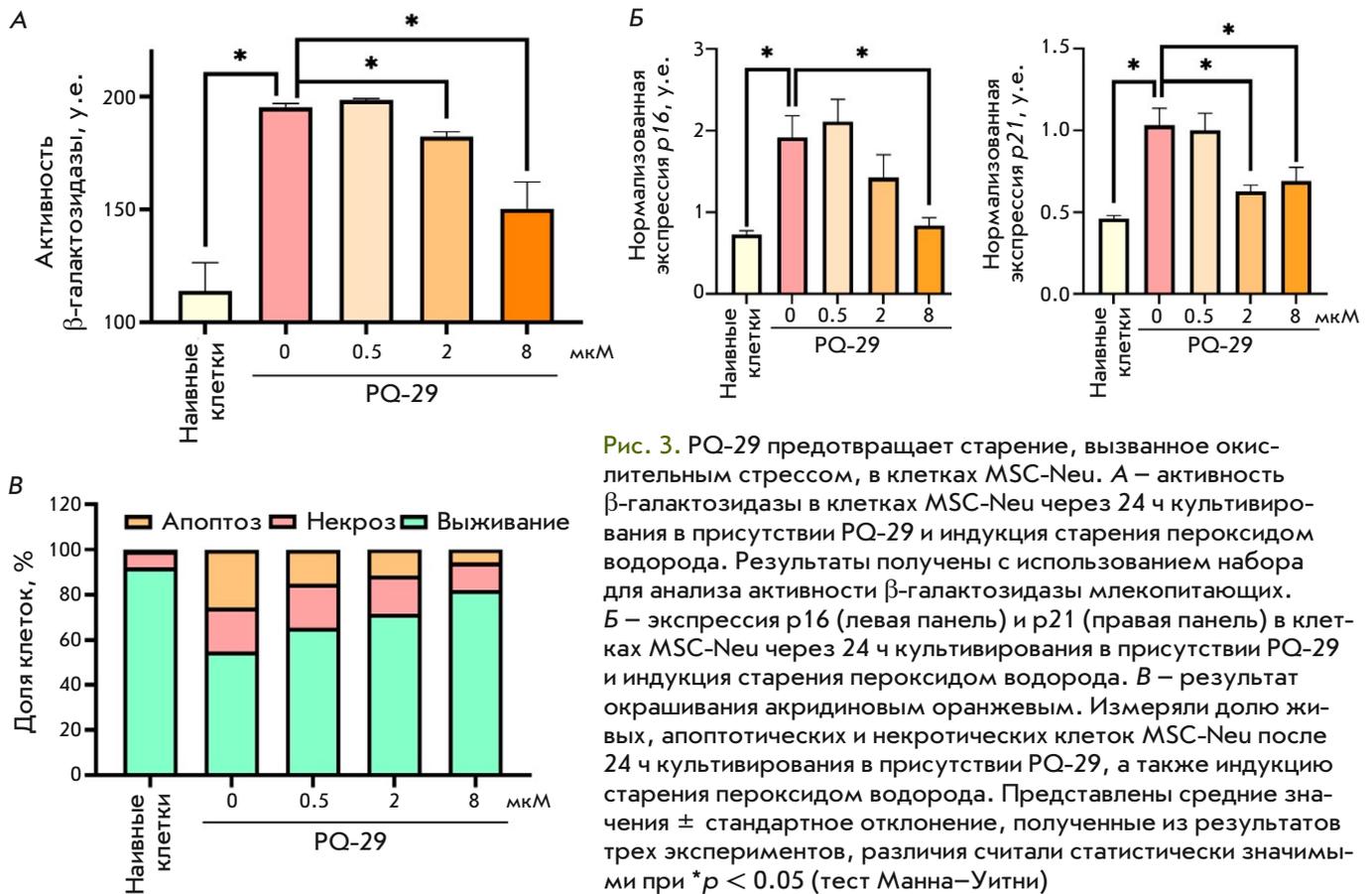


**Рис. 2.** PQ-29 увеличивает количество шаперонов в MSC-Neu при окислительном стрессе в нетоксичных дозировках. **А** – структурная формула PQ-29. **Б** – экспрессия шаперонов в клетках MSC-Neu после инкубации с PQ-29 в течение 6 ч. **В** – вестерн-блот-анализ содержания Hsp90, Hsp70 и Hsp40 в лизатах клеток MSC-Neu, инкубированных с PQ-29 в указанных концентрациях в течение 24 ч. В качестве контроля нагрузки использовали тубулин. Представлены репрезентативные изображения. **Г** – соотношение интенсивностей полос Hsp90, Hsp70 и Hsp40 и тубулина, нормализованные по отношению к контрольным клеткам. **Д** – определение LC<sub>50</sub> для PQ-29 при воздействии на культуру клеток MSC-Neu в условиях окислительного стресса. Приведены средние значения ± стандартное отклонение, вычисленные по результатам трех экспериментов, наблюдаемые различия статистически значимы при \**p* < 0.05 (тест Манна–Уитни)

тоз или некроз, и прояснили способность PQ-29 предотвращать гибель клеток. Показано, что PQ-29 в концентрации 2 и 8 мкМ предотвращал развитие как некроза, так и апоптоза нейрональных клеток. При этом доля некротических клеток снизилась с 19.6 до 17.1 и 12.2% (при использовании PQ-29 в концентрациях 2 и 8 мкМ соответственно), а доля апоптотических клеток – с 25.6 до 11.4 и 5.8% (при использовании 2 и 8 мкМ PQ-29 соответственно). Таким образом, применение PQ-29 в концентрации 2 и 8 мкМ приводило к увеличению доли наивных клеток с 54.7 до 71.5 и 82% соответственно (рис. 3В). Эти данные свидетельствуют о том, что PQ-29 способен предотвращать клеточное старение, вызванное окислительным стрессом.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что окислительный стресс – один из распространенных молекулярных механизмов, отсутствие адекватного ответа антиоксидантных систем клеток на который приводит к развитию разных патологий. Отчасти это связано с неспособностью систем белкового гомеостаза справляться с возрастающим количеством поврежденных или мутантных белков [20]. Другим механизмом негативного влияния окислительного стресса является запуск необратимых процессов нарушения клеточного цикла и клеточной физиологии, приводящих к старению. Одним из способов защиты клеток, в том числе нейрональных, испытывающих окислительный стресс, помимо антиоксидантов является использование ин-



**Рис. 3.** PQ-29 предотвращает старение, вызванное окислительным стрессом, в клетках MSC-Neu. **А** – активность β-галактозидазы в клетках MSC-Neu через 24 ч культивирования в присутствии PQ-29 и индукция старения пероксидом водорода. Результаты получены с использованием набора для анализа активности β-галактозидазы млекопитающих. **Б** – экспрессия p16 (левая панель) и p21 (правая панель) в клетках MSC-Neu через 24 ч культивирования в присутствии PQ-29 и индукция старения пероксидом водорода. **В** – результат окрашивания акридиновым оранжевым. Измеряли долю живых, апоптотических и некротических клеток MSC-Neu после 24 ч культивирования в присутствии PQ-29, а также индукцию старения пероксидом водорода. Представлены средние значения ± стандартное отклонение, полученные из результатов трех экспериментов, различия считали статистически значимыми при \* $p < 0.05$  (тест Манна–Уитни)

дукторов синтеза шаперонов, способных повышать устойчивость нейронов к окислительному стрессу (рис. 4). Аналогичные работы проводились и ранее. Например, показано, что индуктор синтеза шаперонов U133 повышает устойчивость клеток глиобластомы крысы С6 к воздействию АФК [17]. Более того, активация синтеза шаперонов снижает протеотоксическую нагрузку на клетки, вызванную окислительным стрессом [21].

С другой стороны, помимо снижения вызванной окислительным стрессом «острой» токсичности – окисления белков и липидов и активации апоптоза – важным фактором, оказывающим влияние на функционирование нейронов, являются отсроченные негативные процессы, в том числе запуск механизмов старения. Известно, что шапероны предотвращают активацию старения через сигнальные пути p53/p21 и Rb/p16 [2], однако исследования, в которых показана эта регуляция, проведены на опухолевых клетках и не могут считаться в полной мере релевантными в контексте нейродегенеративных процессов. Более того, по мере прогрессирования патологий различного генеза, как правило, наблюдается снижение экспрессии шаперонов в нейрональных клетках; в частности, этот

феномен установлен при черепно-мозговой травме, инсульте и болезни Альцгеймера.

Индукторы синтеза шаперонов давно и успешно изучаются в качестве перспективных нейропротекторных препаратов, в настоящее время один из индукторов шаперонов – Аринокломол – проходит клинические испытания [22]. Однако данные о возможном влиянии индукторов на процесс старения отсутствуют. В данной работе соединение PQ-29 предложено в качестве агента, способного активировать синтез ключевых шаперонов Hsp70 и Hsp90, а также кошаперона Hsp40. Использование PQ-29 позволило не только остановить отсроченный цитотоксический эффект окислительного стресса, но и предотвратить инициацию старения нейрональных клеток под воздействием АФК. Отдельно отметим, что параметр  $LC_{50}$  для PQ-29 при воздействии на старые нейроны оказался ниже, чем при воздействии на нейроны, не подверженные окислительному стрессу: 271 против 494 мкМ [10]. Это свидетельствует о том, что устойчивость клеток, стареющих под действием окислительного стресса, снижается из-за воздействия химических агентов.

Ранее мы синтезировали некоторые соединения пирролилазина (в том числе PQ-29) и установили их способность индуцировать синтез белков теплового

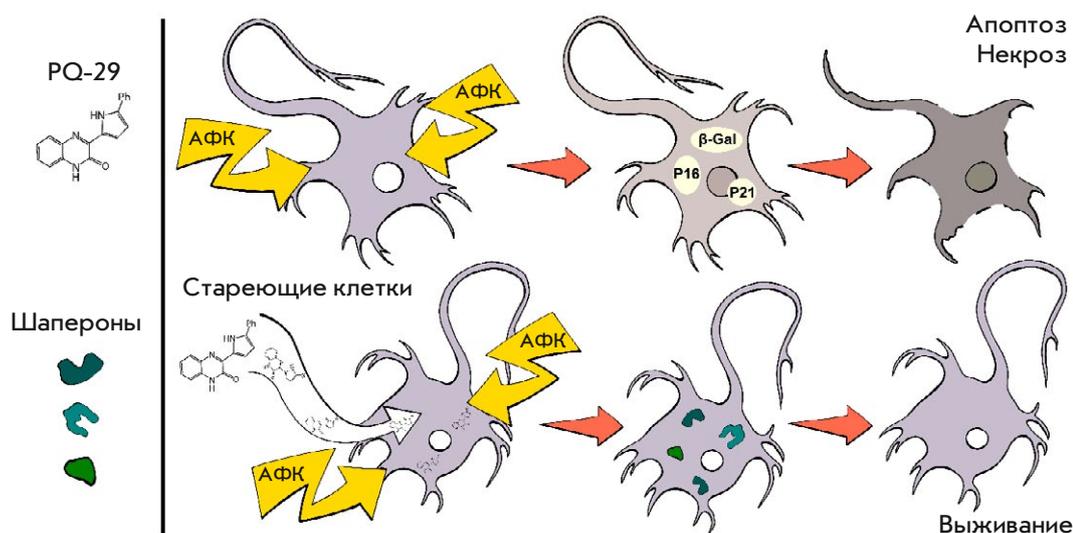


Рис. 4. Иллюстрация принципа действия низкомолекулярных индукторов синтеза шаперонов для защиты нейрональных клеток от окислительного стресса

шока и оказывать защитное действие на нейроны при болезни Альцгеймера или после черепно-мозговой травмы [11, 13, 23]. Кроме того, подтверждена способность производных пирролилазина индуцировать синтез шаперона Hsp70 как в молодых, так и в старых перепрограммированных нейронах человека MSCWJ-Neu. В представленном исследовании установлена способность производного пирролилазина PQ-29 предотвращать развитие старения, вызванного окислительным стрессом (рис. 4). В совокупности эти данные позволяют утверждать,

что подобные соединения обладают выраженной нейропротекторной активностью. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-74-10117 и проект № 22-13-00298 (синтез и очистка соединения PQ-29).*

*Авторы выражают благодарность А.М. Кольцовой за любезно предоставленные клетки MSC-DP, а также Т.В. Вонц за помощь с иллюстрациями.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hu Y., Shao Z., Cai X., Liu Y., Shen M., Yao Y., Yuan T., Wang W., Ding F., Xiong L. // *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 2019. V. 44. P. 585–595.
- Zhang S., Liu W., Wang P., Hu B., Lv X., Chen S., Wang B., Shao Z. // *Mol. Cell. Biochem.* 2021. V. 476. P. 1979–1994.
- Guo Z., Song T., Wang Z., Lin D., Cao K., Liu P., Feng Y., Zhang X., Wang P., Yin F., et al. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. P. 12900–12909.
- Kroemer G. // *Sci. World J.* 2001. V. 1. P. 590.
- Komarova E.Y., Afanasyeva E.A., Bulatova M.M., Cheetham M.E., Margulis B.A., Guzhova I.V. // *Cell Stress Chaperones*. 2004. V. 9. P. 265–275.
- Pandey P., Saleh A., Nakazawa A., Kumar S., Srinivasula S.M., Kumar V., Weichselbaum R., Nalin C., Alnemri E.S., Kufe D., Kharbanda S. // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 16. P. 4310–4322. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4310>.
- Paul S., Mahanta S. // *Mol. Cell. Biochem.* 2014. V. 386. P. 45–61.
- Fan C.Y., Lee S., Cyr D.M. // *Cell Stress Chaperones*. 2003. V. 8. P. 309.
- Ekimova I.V., Plaksina D.V., Pastukhov Y.F., Lapshina K.V., Lazarev V.F., Mikhaylova E.R., Polonik S.G., Pani B., Margulis B.A., Guzhova I.V., et al. // *Exp. Neurol.* 2018. V. 306. P. 199–208.
- Zhao Y., Zhao H., Lobo N., Guo X., Gentleman S.M., Ma D. // *J. Alzheimers. Dis.* 2014. V. 41. P. 835–844.
- Dutyshcheva E.A., Mikeladze M.A., Trestsova M.A., Aksenov N.D., Utepova I.A., Mikhaylova E.R., Suezov R.V., Charushin V.N., Chupakhin O.N., Guzhova I.V., et al. // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. № 5. P. 414.
- Adachi H., Katsuno M., Waza M., Minamiyama M., Tanaka F., Sobue G. // *Int. J. Hyperthermia*. 2009. V. 25. № 8. P. 647–654.
- Dutyshcheva E.A., Utepova I.A., Trestsova M.A., Anisimov A.S., Charushin V.N., Chupakhin O.N., Margulis B.A., Guzhova I.V., Lazarev V.F. // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. V. 222. P. 113577.
- Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. // *Tsitologiya*. 2018. V. 60. № 12. P. 955–968.
- Gingras M., Champigny M.F., Berthod F. // *J. Cell. Physiol.* 2007. V. 210. № 2. P. 498–506.
- Mature neuron markers. Abcam. <https://www.abcam.com/neuroscience/mature-neurons-markers-and-their-functions>.
- Lazarev V.F., Nikotina A.D., Mikhaylova E.R., Nudler E., Polonik S.G., Guzhova I.V., Margulis B.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 470. № 3. P. 766–771.
- Meshalkina D.A., Shevtsov M.A., Dobrodumov A.V., Komarova E.Y., Voronkina I.V., Lazarev V.F., Margulis B.A., Guzhova I.V. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. P. 7872.
- Mosmann T. // *J. Immunol. Methods*. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
- Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. // *Science*. 2016. V. 353. № 6294. P. 4354.
- Ulrich K. // *Biochem. Soc. Trans.* 2023. V. 51. № 3. P. 1169–1177.
- Kirkegaard T., Gray J., Priestman D.A., Wallom K.L., Atkins J., Olsen O.D., Klein A., Drndarski S., Petersen N.H.T., Ingemann L., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2016. V. 8. № 355. P. 355.
- Lazarev V.F., Dutyshcheva E.A., Mikhaylova E.R., Trestsova M.A., Utepova I.A., Chupakhin O.N., Margulis B.A., Guzhova I.V. // *Molecules*. 2022. V. 27. P. 8950.

УДК 616-006

# Активация молекулярных путей ERK1/2 и ее связь с патогенностью злокачественных опухолей человека

А. Г. Емельянова<sup>1,2\*</sup>, М. А. Золотовская<sup>1,2</sup>, Е. В. Поддубская<sup>2</sup>, А. А. Модестов<sup>1,2</sup>,  
В. С. Прасолов<sup>3</sup>, Д. В. Кузьмин<sup>1</sup>, А. А. Буздин<sup>1,2,4,5</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, 141701 Россия

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

<sup>4</sup>Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

<sup>5</sup>PathoBiology Group, European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), 1200 Brussels, Belgium

\*E-mail: emelyanova\_a\_g@staff.sechenov.ru

Поступила в редакцию 19.08.2024

Принята к печати 05.12.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27497

**РЕФЕРАТ** Митоген-активируемые протеинкиназы ERK1/2 (MAPK3/1) играют ключевую роль в регуляции клеточного роста, дифференцировки и апоптоза. Ранее мы представили данные, свидетельствующие о том, что активация путей ERK1/2 в опухолевых клетках, связанная с применением терапевтических препаратов, приводит к избыточной экспрессии рецепторов факторов роста и развитию лекарственной резистентности. Недавно нами была предложена новая биоинформатическая методика, которая позволяет конструировать молекулярные пути на основе интерактивных сетей интересующих генов, а также количественно оценивать уровни их активации, используя данные геномной экспрессии. В представленной работе впервые алгоритмически сконструированы молекулярные пути ERK1/2 и на основании транскриптомных данных рассмотрена связь уровней их активации с выживаемостью и ответом на таргетные препараты на уровне панопухолей. С целью оценки выживаемости и клинического ответа пациентов на 29 схем химио- и таргетной терапии изучены профили 11287 образцов 31 типа опухолей человека и 53 набора данных, ранее опубликованных нами или взятых из других источников. Обнаружено, что активация путей ERK1/2 имеет различную прогностическую значимость в зависимости от типа опухоли. При глиобластоме, саркоме, раке легкого, почки, мочевого пузыря, желудка, толстой кишки и некоторых других типах опухолей активация путей ERK ассоциировалась с низким уровнем выживаемости. При этом она была связана с лучшей выживаемостью при раке молочной железы (типы HER2+, люминальный А и люминальный В) и тела матки. Полученные данные согласуются с результатами анализа ответа на терапию. В то же время обнаружены существенно более слабые связи с экспрессией отдельных генов – MAPK1 и MAPK3. Таким образом, уровни активации путей ERK1/2 могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров для прогнозирования клинических исходов и подбора новых персонализированных стратегий лечения, таких как применение ингибиторов МАПК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ERK1 (MAPK3), ERK2 (MAPK1), экспрессия генов при раке, активация молекулярных путей ERK при онкогенезе, биомаркеры выживаемости при раке.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЗНО – злокачественное новообразование; МАПК – митоген-активируемая протеинкиназа; УАМП – уровень активации молекулярного пути; ОСН – отношение «случай/норма»; РАР – роль в качестве активатора или репрессора; ОБ – общая выживаемость; ВБП – выживаемость без прогрессирования; ОР – отношение рисков.

**ВВЕДЕНИЕ**

Злокачественные новообразования (ЗНО) – вторая по частоте причина смертности на глобальном уровне после сердечно-сосудистых заболеваний. По данным ВОЗ, в 2020 г. зарегистрировано 19.3 млн новых случаев ЗНО и 10 млн смертей от них, что составило приблизительно 16% от общей смертности в мировом масштабе [1]. Статистика демонстрирует непрерывный рост заболеваемости ЗНО на протяжении последних двух десятилетий. Согласно прогнозам, к 2040 г. количество заболевших достигнет 28.4 млн человек, что на 47% превышает уровень 2020 г. [2]. Эти тенденции подчеркивают необходимость усиления профилактики, ранней диагностики и эффективных стратегий лечения ЗНО.

Несмотря на достижения медицины в области диагностики и лечения ЗНО, включая повышение доступности таргетной терапии, ее эффективность остается ограниченной. В ряде случаев прогрессирующие опухоли или целые виды ЗНО плохо отвечают на клинически одобренные химиотерапевтические и таргетные препараты [3]. В то же время иногда, напротив, наблюдаются случаи успешного индивидуального ответа на препараты или их комбинации, не включенные в стандартные схемы [3]. Одной из причин этого является сложность молекулярных механизмов, активных в ЗНО, что затрудняет разработку эффективных универсальных стратегий лечения. Поэтому особое внимание привлекают ключевые молекулярные пути, регулирующие основные клеточные процессы в онкогенезе. В частности, такие сигнальные каскады, как EGFR, PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT, играют ключевую роль в регуляции клеточного роста и деления. Однако их сложное взаимодействие и наличие параллельных сигнальных путей затрудняют разработку эффективных стратегий таргетной терапии. Кроме того, аномальная регуляция данных путей часто связана с развитием резистентности к терапии и с прогрессированием опухолевого роста [4–6].

Особый интерес представляют митоген-активируемые протеинкиназы (МАПК) ERK1 и ERK2 (кодируемые генами *MAPK3* и *MAPK1* соответственно), которые активируются в ответ на стимуляцию сигнального каскада RAS-RAF-MEK-ERK, играющего ключевую роль в росте и пролиферации опухолевых клеток. Этот путь тесно связан с прогрессированием и метастазированием разных типов ЗНО человека. Активирующие мутации в генах вышележащих рецепторных тирозинкиназ или в генах, кодирующих белки RAS, RAF, MEK и ERK, могут приводить к aberrантной активации ERK1/2 и в совокупности составляют наиболее ча-

стую группу мутаций в опухолевых клетках человека. Считается, что от 30 до 96% всех опухолей характеризуются гиперактивацией этого сигнального каскада [7]. Являясь нижестоящим компонентом этой сигнальной оси, ERK1/2 может гиперактивироваться из-за неконтролируемой активации генов рецепторных тирозинкиназ или приводящих к бесконтрольной активации мутаций RAS, RAF и MEK [8]. Специфические ингибиторы белков EGFR, BRAF, KRAS и MEK включены в многочисленные стандарты противоопухолевой терапии и показали свою эффективность при лечении ЗНО с онкогенными мутациями в данном каскаде. Однако опухолевые клетки часто становятся устойчивыми к таким ингибиторам, и одной из причин резистентности считается реактивация ERK под действием параллельных регуляторных процессов [8, 9].

Онкогенная активность белков ERK1/2 осуществляется посредством аномального фосфорилирования многочисленных субстратов, что приводит к нарушению регуляции различных биологических процессов, связанных с развитием опухоли. Эти процессы включают клеточную пролиферацию, дифференцировку, миграцию и ангиогенез [10]. Киназы ERK1/2 вовлечены во множество сигнальных путей, они действуют как ключевой узел активации механизмов выживания опухолевых клеток после воздействия блокаторов рецепторных тирозинкиназ и стандартной химиотерапии [9].

Таким образом, киназы ERK1/2 представляют собой потенциально перспективные мишени для повышения эффективности противоопухолевых препаратов. В этой связи перспективным может быть применение специфических ингибиторов МАПК в группах пациентов с гиперактивацией соответствующих сигнальных путей в опухолях. Одним из подходов к выявлению таких пациентов является определение уровня экспрессии этих генов. Действительно, вариабельность экспрессии генов в опухолях разных больных уже давно позволяет применять индивидуальный подход к лечению [11]. Однако с появлением омиксных технологий стало возможным определять экспрессию сразу тысяч генов и других биомаркеров [12], а ряд инструментов для анализа результатов позволяет на основании опубликованных данных обобщать их и определять сигнальные или биохимические пути, в которых участвуют продукты этих генов (функциональное обогащение). Однако инструменты функционального обогащения (такие, как анализ перепредставленности, оценка функциональных классов (FCS), наиболее часто применяемые в анализе дифференциальной экспрессии генов) не учитывают тот факт, что гены действуют в составе сложных молеку-

лярных сетей и изменения их экспрессии при раке могут нарушать регуляцию сразу большого количества путей. Разные компоненты молекулярного пути могут выполнять разные функции, например, повышенная экспрессия ингибирующего компонента будет действовать в пользу подавления пути, и наоборот. Кроме того, пути могут регулироваться системами положительных и отрицательных обратных связей, которые также оказывают большое влияние на биологический результат, к которому приводит активация или ингибирование пути [13, 14]. В связи с этим предложен подход, основанный на количественной оценке уровня активации всего молекулярного пути, а не отдельных генов, учитывающий архитектуру этого пути и роли отдельных продуктов, входящих в его состав, в его активации или деактивации, а также создан алгоритм его автоматического подсчета [14]. Классический алгоритм подсчета уровня активации молекулярного пути (УАМП) заключается в рекурсивной аннотации роли активатора/репрессора каждого узла в данном пути в зависимости от его молекулярной архитектуры и природы каждого взаимодействия [14]. УАМП позволяет эффективно преодолевать искажения в данных, полученных на разных платформах, и нивелировать батч-эффекты [15]; на основании значения УАМП можно было отличить нормальную ткань от опухолевой [16], а также предсказать ответ на терапию при раке толстой кишки, раке почки, раке желудка [17–20]. Помимо классического способа подсчета УАМП, недавно предложили другой подход, который заключается в построении архитектуры молекулярного пути как сети взаимодействующих молекул вокруг центрального узла – центрального гена. Такие пути названы геноцентрическими, они построены на основании модели интерактома человека и включают максимальное количество взаимодействий, начинающихся в центральном узле и ведущих к каждому узлу пути. УАМП геноцентрических путей показали свою прогностическую и диагностическую ценность, а потому могут использоваться в качестве скрининговых, прогностических и предиктивных биомаркеров [21, 22].

В данном исследовании впервые алгоритмически сконструированы геноцентрические молекулярные пути белков ERK1 и ERK2 на основе интерактомной модели, ранее разработанной в нашей исследовательской группе [21]. Также проведен анализ взаимосвязи УАМП, выживаемости и ответа на таргетные препараты для широкого спектра онкопатологий.

Обнаружено, что прогностическая значимость активации путей ERK1/2 зависит от типа опухо-

ли. При глиобластоме, саркоме, раке легкого, почки, мочевого пузыря, желудка, толстой кишки и некоторых других типах рака активация путей ERK ассоциируется с низким уровнем выживаемости. При этом она связана с лучшей выживаемостью при раке молочной железы (типы HER2+, люминальный А и люминальный В) и тела матки. Полученные данные согласуются с результатами анализа ответа на терапию. В то же время обнаружены существенно более слабые связи с экспрессией отдельных генов *MAPK1* и *MAPK3*. Таким образом, уровни активации путей ERK1/2 могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров для прогнозирования клинических исходов и подбора новых персонализированных стратегий лечения с использованием ингибиторов МАПК.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Наборы транскриптомных данных

*Набор данных проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA)*. С портала NCI Genomic Data Commons [23, 24] были загружены данные РНК-секвенирования солидных опухолей (прочтения из программы STAR) и соответствующих нормальных тканей из проекта TCGA, а также связанные с ними метаданные с информацией о выживаемости, прогрессировании, применяемой терапии и ответе на терапию; оценивали только первичные образцы опухолей тех типов ЗНО, где количество доступных образцов составляло 100 и более. Кроме того, данные из проектов TCGA READ (аденокарцинома прямой кишки) и COAD (аденокарцинома толстой кишки) были объединены в группу колоректального рака; аналогично, данные из проектов KIRC (светлоклеточный почечно-клеточный рак) и KIRP (папиллярноклеточный рак почки) были объединены в группу почечно-клеточных карцином. Кроме того, глиомы и глиобластомы из проектов TCGA-GBM и TCGA-LGG были объединены и переклассифицированы в соответствии с обновленной классификацией ВОЗ согласно отредактированной базе Захаровой и соавт. [25]. Набор данных TCGA-BRCA по раку молочной железы был разделен на подгруппы в соответствии с подписью PAM50 [26] из-за высокой гетерогенности опухолей данной локализации. Выделено пять молекулярных подтипов: базальный, HER2+, люминальный А, люминальный В и нормоподобные опухоли молочной железы. Таким образом, в исследование включено 24 типа ЗНО, охватывающих в общей сложности 8427 образцов (табл. 1).

Параллельно оценивали данные общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без прогрессирова-

Таблица 1. Общее количество образцов по данным РНК-секвенирования из базы данных TCGA, включенных в анализ

Тип опухоли	Идентификатор проекта TCGA	Количество образцов	Количество образцов с данными о выживаемости (ОВ/ВВП)	Количество образцов с данными по ответу на терапию
Астроцитома, мутации в генах <i>IDH</i> . Степень злокачественности 2	Часть <i>LGG + GBM</i> (Astrocytoma, <i>IDH</i> -mutant. Grade 2)	110	110/110	22
Базальный тип рака молочной железы	Часть <i>BRCA</i> (Basal breast cancer)	198	198/198	0
Колоректальный рак	<i>COAD + READ</i> (Colorectal cancer)	624	619/624	120
Глиобластома, <i>IDH</i> -дикий тип	Часть <i>LGG + GBM</i> (Glioblastoma, <i>IDH</i> -wildtype)	206	204/206	24
HER2+ тип рака молочной железы	Часть <i>BRCA</i> (HER2+ breast cancer)	124	124/124	0
Люминальный А тип рака молочной железы	Часть <i>BRCA</i> (Luminal A breast cancer)	230	229/230	0
Люминальный В тип рака молочной железы	Часть <i>BRCA</i> (Luminal B breast cancer)	515	514/515	0
Почечно-клеточная карцинома	<i>KIRP + KIRC</i> (Renal cell carcinoma)	823	822/823	15
Уротелиальная карцинома мочевого пузыря	<i>BLCA</i> (Urothelial Bladder Carcinoma)	406	403/406	92
Плоскоклеточная карцинома шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома	<i>CESC</i> (Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma)	304	304/304	77
Карцинома пищевода	<i>ESCA</i> (Esophageal carcinoma)	184	184/184	32
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи	<i>HNSC</i> (Head-Neck Squamous Cell Carcinoma)	520	518/520	77
Гепатоцеллюлярная карцинома	<i>LIHC</i> (Hepatocellular carcinoma)	368	367/368	24
Аденокарцинома легкого	<i>LUAD</i> (Lung Adenocarcinoma)	516	507/516	98
Плоскоклеточная карцинома легкого	<i>LUSC</i> (Lung Squamous Cell Carcinoma)	501	495/501	61
Аденокарцинома поджелудочной железы	<i>PAAD</i> (Pancreatic Adenocarcinoma)	178	178/178	74
Феохромоцитома и параганглиома	<i>PCPG</i> (Pheochromocytoma and paraganglioma)	179	179/179	4
Аденокарцинома предстательной железы	<i>PRAD</i> (Prostate Adenocarcinoma)	497	495/497	40
Саркома	<i>SARC</i> (Sarcoma)	259	259/259	58
Меланома кожи	<i>SKCM</i> (Skin Cutaneous Melanoma)	103	103/105	14
Аденокарцинома желудка	<i>STAD</i> (Stomach Adenocarcinoma)	412	403/412	115
Рак щитовидной железы	<i>THCA</i> (Thyroid cancer)	505	505/505	12
Тимома	<i>THYM</i> (Thymoma)	120	119/120	3
Эндометриоидная карцинома тела матки	<i>UCEC</i> (Uterine Corpus Endometrial Carcinoma)	545	544/545	60

ния (ВВП). При возможности для изучения ответа на терапию в соответствии с критериями RECIST [27] также использовали данные из проекта TCGA (табл. 1). В целях обеспечения единообразия и совместимости применяли следующие критерии отбора данных из проекта TCGA. Во-первых, в анализ включали группы пациентов, получавших одинаковый тип терапии, и не менее 20 пациентов с каж-

дым типом ЗНО. Во-вторых, если один и тот же пациент получал несколько линий одной и той же терапии, то для дальнейшего анализа отбирали наилучший ответ по критериям RECIST. Некоторые пациенты проходили до восьми линий терапии, однако в анализ включали только ответы на первые 1–3 линии, поскольку к моменту назначения поздних линий терапии молекулярный профиль опухоли мог

**Таблица 2.** Группы злокачественных опухолей из базы данных TCGA с доступной информацией о результатах терапии по шкале RECIST

Тип опухоли	Химиотерапия <sup>1</sup>	Количество пациентов в группе ответа <sup>2</sup>
Астроцитомы, мутации в генах <i>IDH</i> . Степень злокачественности 2	Темозоломид	SD (n=12); R (n=3)
Колоректальный рак	5-фторурацил, лейковорин, оксалиплатин	NR (n=6); R (n=39)
Глиобластома, <i>IDH</i> -дикий тип	Темозоломид	SD (n=12); R (n=4)
Уротелиальная карцинома мочевого пузыря	Цисплатин, гемцитабин	SD (n=4); R (n=33); NR (n=12)
Плоскоклеточная карцинома шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома	Цисплатин	R (n=49); NR (n=6)
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи	Цисплатин	R (n=35); NR (n=3)
Рак щитовидной железы	Гемцитабин	SD (n=4); R (n=23); NR (n=25)
Саркома	Доцетаксел, гемцитабин	R (n=12); NR (n=9)
Аденокарцинома желудка	5-фторурацил	R (n=17); NR (n=16)
Эндометриоидная карцинома тела матки	Паклитаксел, карбоплатин	R (n=35); NR (n=5)

<sup>1</sup>Тип химиотерапии, применяемой в когорте пациентов.

<sup>2</sup>R – «ответчики» (общее количество пациентов с полным и частичным ответом на терапию по RECIST v1.1);

NR – «неответчики» (количество пациентов с прогрессирующим заболеванием по RECIST v1.1);

SD – пациенты со стабилизацией заболевания по классификации RECIST v1.1.

значительно измениться, что делает использование ранее полученных транскриптомных данных сомнительным. Наконец, для статистической значимости рассматривали только группы ответа по критериям RECIST, состоящие как минимум из трех пациентов. В результате в анализ вошли данные об ответе на терапию пациентов с 10 типами ЗНО (табл. 2).

*Наборы данных GEO (Gene Expression Omnibus) и TARGET (Tumor Alterations Relevant for GENomics-driven Therapy).* Включенные в исследование наборы данных были отобраны из предыдущей коллекции клинически аннотированных данных по экспрессии генов, обладающих подтвержденным качеством профилей экспрессии [28]. Данные РНК-секвенирования солидных опухолей (прочтения из программы STAR) из проекта TARGET были загружены с портала NCI Genomic Data Commons [29]. Наборы данных по экспрессии генов на микрочипах взяты с портала GEO [30, 31]. Набор данных TARGET-AML (острый миелоидный лейкоз) был разделен на две части в зависимости от наличия бусульфана и циклофосфида в терапии. Кроме того, в анализ были включены данные из проекта TCGA для LGG и UCEC и объединенный набор данных для опухоли легкого (LUSC + LUAD), где информация была извлечена из коллекции Борисова и со-

авт. [28]. Всего 26 дополнительных наборов данных по 9 типам ЗНО с общим количеством 2736 образцов опухолей (табл. 3).

*Экспериментальные наборы данных.* В исследование были также включены клинически аннотированные наборы данных РНК-секвенирования, ранее полученные в нашей лаборатории и опубликованные в других источниках. Результаты лечения, когда это было возможно, классифицированы в соответствии с критериями RECIST [27]. Включены следующие экспериментальные данные:

- 1) пациенты с глиобластомой, проходившие терапию темозоломидом, с аннотированными данными о выживаемости без прогрессирования ( $n = 49$ ) [32, 33];
- 2) пациенты с опухолью желудка из ранее опубликованного клинического исследования [18], получавшие рамуцирумаб в качестве монотерапии ( $n = 7$ ), в комбинации с паклитакселом ( $n = 6$ ) или схемой FOLFIRI ( $n = 2$ ). Оценивали ответ на терапию, а также выживаемость без прогрессирования;
- 3) пациенты с множественной миеломой ( $n = 60$ ), получавшие комплексную химиотерапию по нескольким схемам, каждая из которых включала бортезомиб. Регистрировали ответ на терапию [34].

Таблица 3. Наборы данных, добавленные из коллекции клинически аннотированных профилей экспрессии опухолей

Тип опухоли	Идентификатор набора данных	Терапия <sup>1</sup>	Количество образцов	Количество пациентов, ответивших и не ответивших на терапию, согласно [28] <sup>2</sup>
Рак молочной железы с различными гормональными и HER2-статусами	GSE18728	Доцетаксел, капецитабин	61	23R, 38NR
Рак молочной железы с различными гормональными и HER2-статусами	GSE20181	Летрозол	52	37R, 15NR
Рак молочной железы с различными гормональными и HER2-статусами	GSE20194	Паклитаксел, 5-фторурацил, циклофосфамид, доксорубин	52	11R, 41NR
Рак молочной железы с различными гормональными и HER2-статусами	GSE20271	Паклитаксел, 5-фторурацил, адриамицин, циклофосфамид	84	18R, 66NR
Рак молочной железы	GSE22358	Доцетаксел, капецитабин	122	116R, 6NR
Рак молочной железы	GSE23988	Доцетаксел, капецитабин	61	20R, 41NR
Рак молочной железы с различными гормональными и HER2-статусами	GSE25066	Неoadъювантная терапия таксанами и антрациклинами	508	118R, 389NR
Рак молочной железы	GSE32646	Паклитаксел, 5-фторурацил, эпирубицин, циклофосфамид	115	27R, 88NR
Рак молочной железы	GSE37946	Трастузумаб	50	27R, 23NR
Множественная миелома	GSE39754	Винкристин, адриамицин, дексаметазон с последующей аутологичной трансплантацией стволовых клеток	136	74R, 62NR
Рак молочной железы с различными гормональными и HER2-статусами	GSE41998	Неoadъювантная терапия доксорубицином, циклофосфамидом, паклитакселом	124	90R, 34NR
Рак молочной железы	GSE42822	Доцетаксел, 5-фторурацил, эпирубицин, циклофосфамид, капецитабин	91	38R, 53NR
Рак молочной железы с различными гормональными и HER2-статусами	GSE50948	Паклитаксел, доксорубин, циклофосфамид, метотрексат, трастузумаб	156	53R, 103NR
Острый миелоидный лейкоз	GSE5122	Типифарниб	57	13R, 44NR
Рак молочной железы	GSE59515	Летрозол	75	51R, 24NR
Множественная миелома	GSE68871	Бортезомиб, талидомид, дексаметазон	118	69R, 49NR
Рак молочной железы	GSE76360	Трастузумаб	48	42R, 6NR
Множественная миелома	GSE9782	Бортезомиб	169	85R, 84NR
Немелкоклеточный рак легкого (аденокарцинома легкого + плоскоклеточная карцинома легкого + другие типы)	GSE207422*	Анти-PD-1 иммунотерапия	24 (8 + 12 + 4)	9R, 15NR
В-клеточный острый лимфобластный лейкоз	TARGET10	Винкристина сульфат, карбоплатин, циклофосфамид, доксорубин	98	30R, 68NR
Детский острый миелоидный лейкоз	TARGET20_Busulfan	Полихимиотерапия** + бусульфан, циклофосфамид	54	31R, 23NR
Детский острый миелоидный лейкоз	TARGET20_NoBusulfan	Полихимиотерапия**	142	62R, 80NR
Рак Вильямса (нефробластома)	TARGET50	Винкристина сульфат, циклоспорин, цитарабин, даунорубин	122	36R, 86NR
Рак легкого	TCGA_LC	Паклитаксел, опционально: цисплатин/карбоплатин, реолизин	35	22R, 13NR
Глиома низкой степени злокачественности	TCGA_LGG	Темозоломид, опционально: мибефрадил	131	100R, 31NR
Эндометриоидная аденокарцинома	TCGA_UCEC	Паклитаксел, опционально: цисплатин/цисплатин, доксорубин	52	45R, 7NR

<sup>1</sup>Тип химиотерапии, таргетной терапии, иммунотерапии или гормональной терапии, применяемой в когорте пациентов.

<sup>2</sup>R означает ответивших на лечение, NR – не ответивших.

\* Данный набор данных не был аннотирован в [28]. Он включает информацию об ответе пациентов на иммунотерапию в соответствии с критериями RECIST, поэтому был добавлен в анализ.

\*\* Схема полихимиотерапии включала: аспарагиназу, цитарабин, даунорубин гидрохлорид, этопозид, гемтузумаб озогамин, митоксантрона гидрохлорид.

### Построение молекулярных путей ERK1/2 и оценка уровня активации молекулярных путей (УАМП)

Молекулярные пути ERK1 (MAPK3) и ERK2 (MAPK1) были алгоритмически реконструированы как представлено ранее [21]. Модель интерактома человека построена с использованием коллекции опубликованных молекулярных путей OncoboxPD [35] в качестве базы молекулярных взаимодействий: суммарно при построении модели интерактома использована архитектура 50178 различных молекулярных путей. Все графы путей были объединены на основе перекрывающихся генных продуктов. Все включенные гены формируют единую сеть, то есть между каждой парой генных продуктов существует хотя бы одна неориентированная связь. В результате получен направленный граф, в котором в качестве узлов представлены гены или метаболиты, а ребер – известные парные молекулярные взаимодействия, представленные в коллекции OncoboxPD. Модель интерактома визуализирована с помощью программы Gephi и алгоритма ForceAtlas2.

Для каждого из белков, ERK1 и ERK2, алгоритмически построены геноцентрические молекулярные пути, включающие центральные узлы (ERK1 и ERK2 соответственно) и генные продукты с взаимодействиями первого порядка с соответствующими центральными узлами. Рассматривали следующие типы взаимодействий: «активация», «сопряжение», «ингибирование», «фосфорилирование», «диссоциация», «репрессия», «дефосфорилирование», «связывание» и «убиквитинирование».

Уровень активации молекулярного пути (УАМП) – это совокупная количественная и качественная характеристика изменений в уровне экспрессии генов, участвующих в молекулярном пути [36]. Значения УАМП рассчитывали следующим образом:

$$\text{УАМП}_p = 100 \times \sum_n (\text{PAP}_{n,p} \times \lg(\text{OCH}_n)) / \sum_n |\text{PAP}_{n,p}|,$$

где  $\text{УАМП}_p$  – уровень активации пути  $p$ ,  $\text{OCH}_n$  – отношение экспрессии гена  $n$  в исследуемом образце к его среднему уровню в контрольной группе,  $\text{PAP}$  – роль (активатора или репрессора), которую данный генный продукт играет в пути  $p$ ;  $\text{PAP}$  может принимать следующие значения:

- 1, когда продукт гена  $n$  является репрессором пути  $p$ ;
- 0.5, когда продукт гена  $n$  является скорее репрессором пути  $p$ ;
- 0, когда роль продукта гена  $n$  в пути  $p$  нейтральна, неопределенна или неоднозначна;
- 0.5, когда продукт гена  $n$  является скорее активатором пути  $p$ ;
- 1, когда продукт гена  $n$  является активатором.

Значения  $\text{PAP}$  устанавливались алгоритмически на основе архитектуры путей и положения центрального узла [14], а значения УАМП рассчитывали с помощью библиотеки Python «oncoboxlib» [14].

Если данные были загружены в ненормализованном виде, то нормализацию экспрессии генов проводили с использованием метода DeSeq2 [37]. В качестве референсного (контрольного) профиля экспрессии генов для каждого набора данных использовали искусственный профиль, полученный путем усреднения всех данных об экспрессии генов в исследуемой когорте.

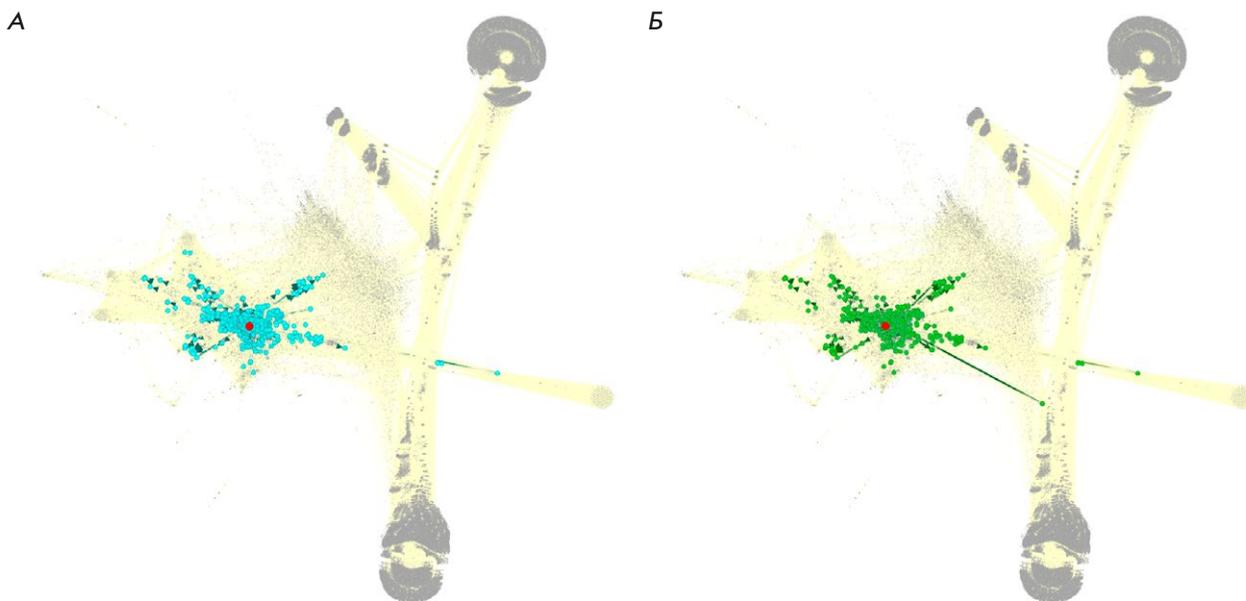
### Статистические тесты

Статистический анализ проводили в R, версия 3.4.2 [38]. Уровни экспрессии центрального гена или УАМП были разделены на группы с высоким и низким уровнем УАМП/экспрессии гена в зависимости от того, превышает ли данное значение оптимальный уровень, соответствующий минимальному  $p$ -значению  $\log$ -rank-теста, рассчитанному с использованием функций «surv\_cutpoint» пакета R «survminer» [39].

Связь с выживаемостью оценивали с использованием метода Каплана–Мейера и  $\log$ -rank-теста для определения статистической значимости различий между двумя группами. Отношение рисков (ОР) с 95% доверительным интервалом было рассчитано с помощью модели регрессии Кокса для оценки различий в выживаемости между сравниваемыми группами с использованием пакетов R «survival» [40] и «survminer» [39]. Общую выживаемость (ОВ) рассчитывали до даты смерти или до даты последнего наблюдения; пациентов, которые были живы на момент последнего наблюдения, считали цензурированными. Выживаемость без прогрессирования (ВВП) рассчитывали до даты прогрессирования, смерти или последнего наблюдения. Выживших пациентов, а также пациентов без прогрессирования на дату последнего наблюдения считали цензурированными. Отношения рисков с  $p < 0.05$  и 95% доверительным интервалом, не включающим 1, считали статистически значимыми.

В анализе ответа на терапию, когда в наборе данных отсутствовали отметки «ответчик» и «неответчик», пациенты с *полным ответом* и *частичным ответом* по RECIST считались *ответчиками*, пациенты с *прогрессирующим заболеванием* – *неответчиками*, а пациенты со *стабильным заболеванием* рассматривались отдельно.

Нормальность распределения оценивали с помощью теста Шапиро–Уилка, однородность дисперсий – тестом Левена. Если число сравниваемых групп превышало 2, то в зависимости от выпол-



**Рис. 1.** Схема состава алгоритмически сконструированных молекулярных путей, сосредоточенных вокруг белков ERK1 (А) и ERK2 (Б). Генные продукты, участвующие в молекулярных путях ERK1 и ERK2, выделены на основе модели интерактома человека, включающей 361654 взаимодействия между 64095 молекулярными участниками [35]. Красными точками обозначены центральные узлы путей (ERK1 или ERK2), проекции участников пути показаны голубым и зеленым цветом для молекулярных путей ERK1 и ERK2 соответственно. Другие узлы показаны серым цветом, остальная часть интерактомного графа показана как фон. Визуализировано с помощью программы Gephi и алгоритма ForceAtlas2 [35]

нения критериев нормального распределения применяли тест ANOVA или Краскела–Уоллиса с последующим post-hoc сравнением по критериям Стьюдента или Данна, соответственно, и поправкой на множественные сравнения по методам Бенджамини–Хохберга или Холма соответственно. При сравнении двух групп анализ проводили с использованием критериев Стьюдента или Уилкоксона в зависимости от нормальности распределения. Сравнения между группами осуществляли с использованием пакетов R «FSA» [41] и «car» [42].

Визуализацию данных выполняли с помощью пакетов R «ggplot2» [43] и «ComplexHeatmap» [44]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Алгоритмическая реконструкция геноцентрических молекулярных путей ERK1 и ERK2

Оба пути были реконструированы на основе ранее построенной модели интерактома человека, представленной в виде графа, включающего 361654 взаимодействия между 64095 молекулярными участниками. Пути включали элементы, которые

напрямую взаимодействуют с центральным узлом (ERK1/MAPK3 или ERK2/MAPK1 соответственно). Аннотация функциональных ролей компонентов путей выполнена алгоритмически согласно [14]. Полученные пути (рис. 1) содержали 447 и 443 молекулярных участника соответственно. Функционально аннотированный список участников путей приведен в *дополнительной табл. 1*. 428 участников данных путей (95.7 и 96.6% соответственно) были общими, что свидетельствует о высоком уровне их структурного сходства.

### Прогностическая значимость активации путей ERK1/2 и экспрессии генов для выживаемости пациентов на основе наборов данных проекта TCGA

Чтобы определить связь выживаемости пациентов с экспрессией генов *MAPK3* и *MAPK1*, а также с YAMP новых реконструированных путей ERK1 и ERK2 были проанализированы данные РНК-секвенирования, полученные из репозитория TCGA. Нами показано в целом сходное распределение значений YAMP для путей ERK1 и ERK2 в разных типах опухолей. На данном этапе, учитывая ключевую роль продуктов генов семейства RAS в активации каскада RAS-RAF-MEK-ERK,

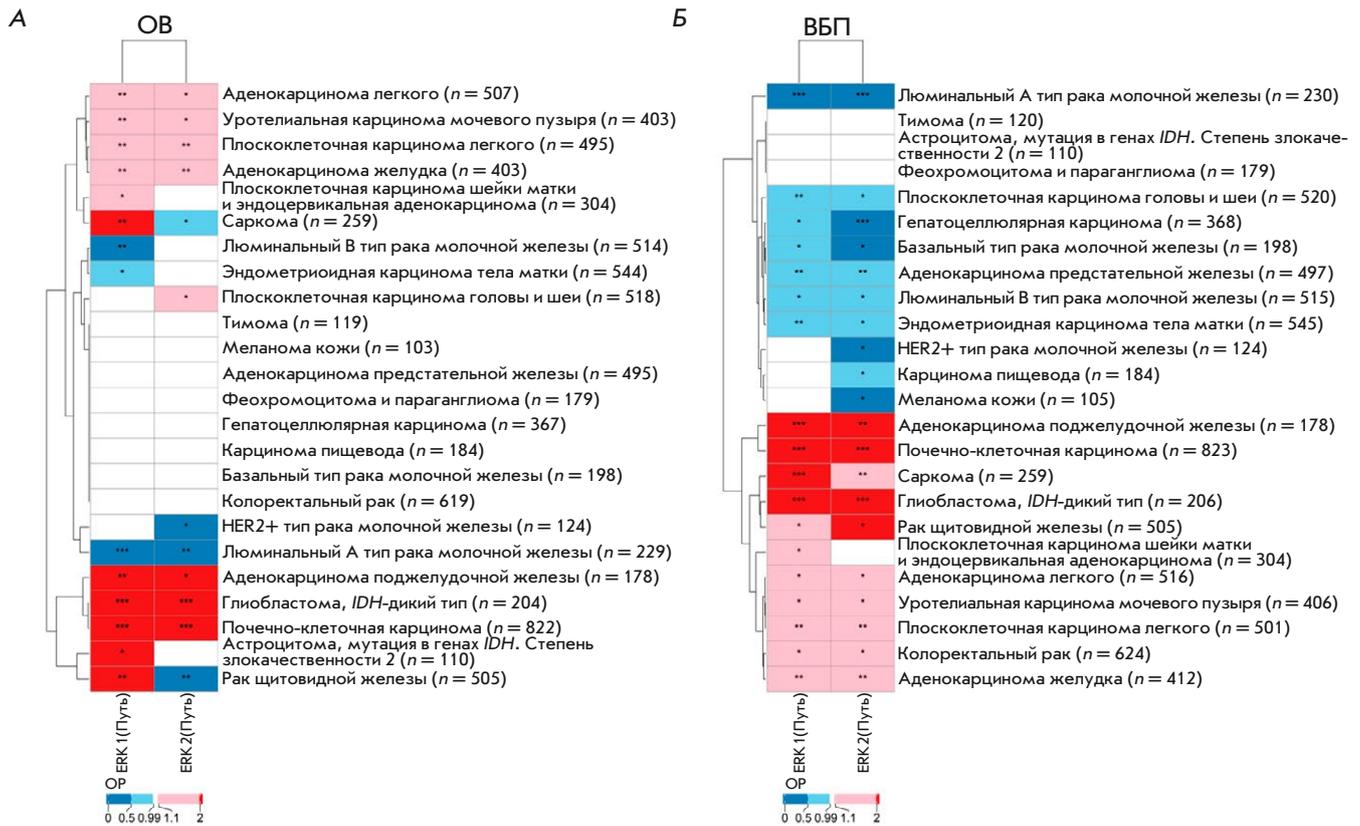


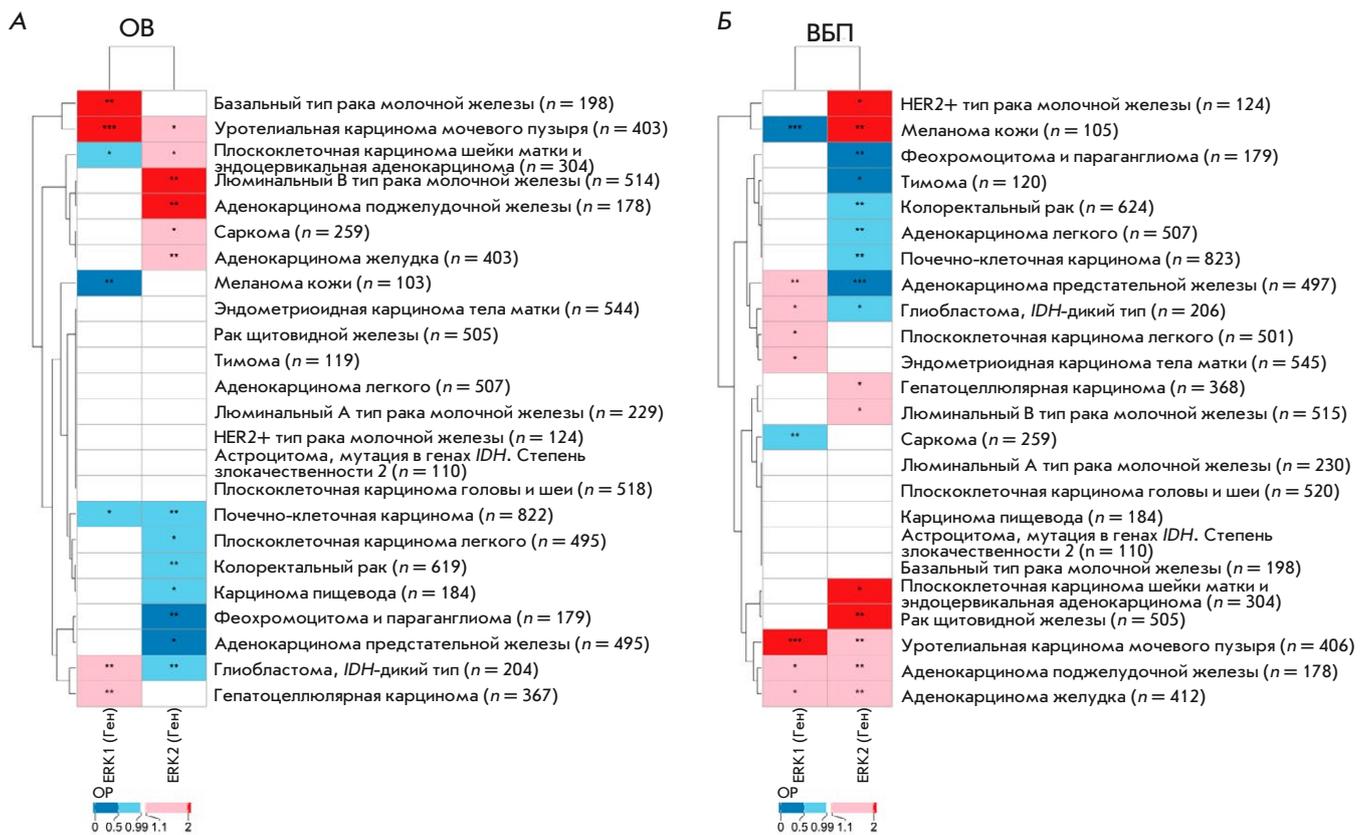
Рис. 2. Тепловая карта значений отношения рисков, рассчитанных для активации молекулярных путей ERK 1 и ERK2 на основе данных TCGA по общей выживаемости (ОВ) (А) и выживаемости без прогрессирования (ВБП) (Б). ОР – отношение рисков, \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$

в анализ дополнительно включили также геноцентрический путь KRAS (дополнительный рис. 1А). Оказалось, что путь KRAS в большинстве случаев имеет более широкое распределение и более низкие значения УАМП (за исключением феохромоцитомы и параганглиомы, где его медианное значение выше), чем пути ERK1/2, однако, в целом тренды по вариабельности УАМП по данным молекулярным путям совпадают (дополнительный рис. 1Б). Активация пути KRAS напрямую связана с активацией ERK1/2, поэтому позволяет оценить взаимодействие этих сигнальных путей и выявить различия в их активности в различных типах опухолей. В данном случае при сходных тенденциях в значениях УАМП всех трех путей внутри различных типов опухолей более низкие УАМП пути KRAS могут свидетельствовать о том, что активация ERK-путей в этих опухолях может происходить посредством альтернативных механизмов, не связанных напрямую с активностью KRAS.

На следующем этапе пациенты с каждым типом ЗНО и каждым предполагаемым биомаркером были разделены на две группы в зависимости от того,

превышает ли значение УАМП или экспрессии гена оптимальную точку отсечения или находится ниже ее. Выживаемость оценивали с использованием метода Каплана–Мейера, а статистическую значимость различий между двумя группами определяли с помощью log-rank-теста. Кроме того, вычисляли коэффициент отношения рисков (ОР) и его 95% доверительный интервал. Данные были сгруппированы в соответствии со значением ОР и его статистической значимостью, а результаты представлены в виде тепловой карты с иерархической кластеризацией (рис. 2).

В данных по общей выживаемости (ОВ) для путей ERK1/2 различные типы ЗНО кластеризовались по-разному на основе значений ОР (рис. 2А). Оба пути демонстрировали общие тенденции. В частности, в глиобластомах, опухолях почки, поджелудочной железы, желудка, мочевого пузыря, в аденокарциноме легкого и плоскоклеточной карциноме легкого активация обоих молекулярных путей ERK1/2 была связана со значительным снижением общей выживаемости. В противоположность этому, в группе пол-специфичных опухолей (под-



**Рис. 3.** Тепловая карта значений отношения рисков, рассчитанных для уровней экспрессии отдельных генов ERK1 и ERK2 на основе данных TCGA по общей выживаемости (ОВ) (А) и выживаемости без прогрессирования (ВБП) (Б). OP – отношение рисков, \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$

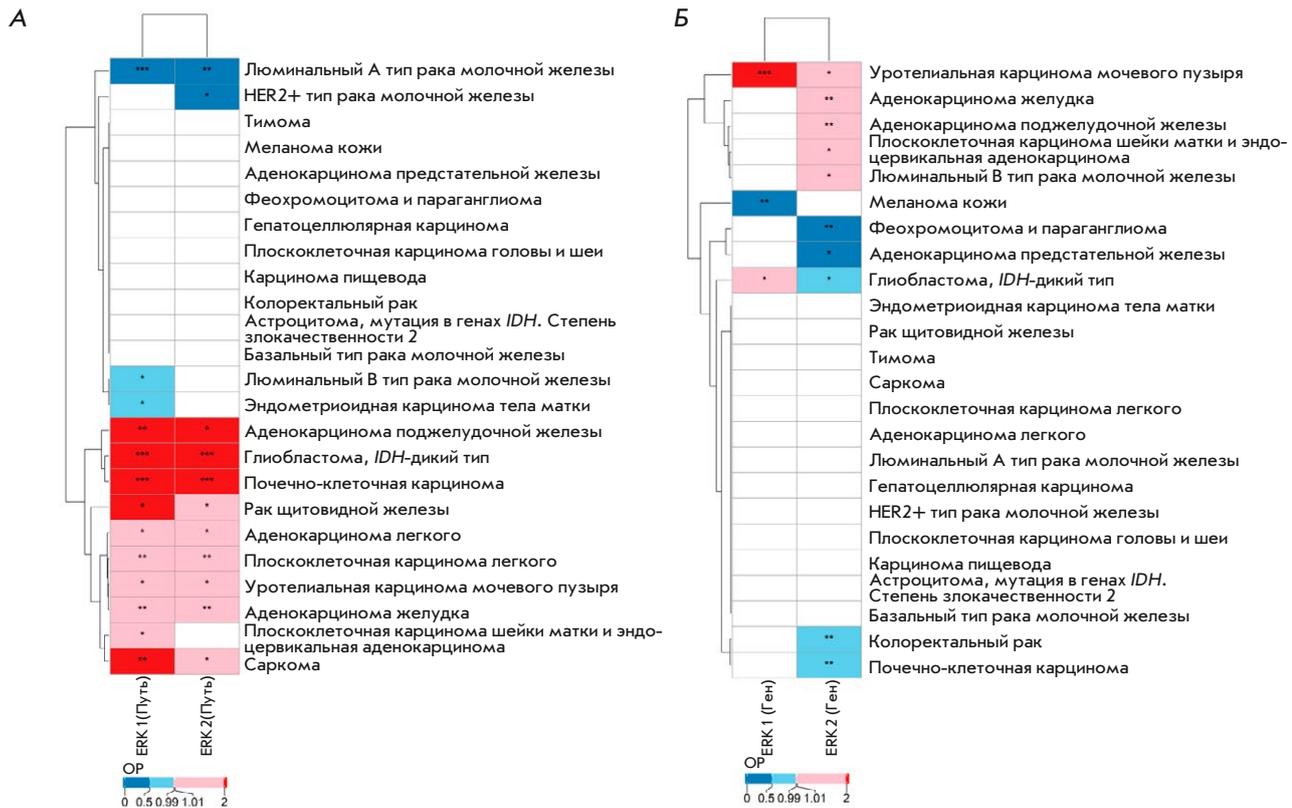
типы рака молочной железы и эндометриоидная карцинома тела матки) активация обоих путей была положительным прогностическим биомаркером ОВ (рис. 2А). Интересно отметить противоположные тенденции прогностической значимости активации путей ERK1 и ERK2 при саркоме и раке щитовидной железы. Поскольку данные пути обладают высоким сходством, различия в прогнозе могут быть обусловлены разными значениями показателя PAR, который также учитывается при расчете УАМП и обозначает функциональную роль продукта данного гена в изучаемом пути (дополнительный рис. 2, дополнительная табл. 1).

Данные по выживаемости без прогрессирования (ВБП) в целом подтвердили наблюдения, полученные для общей выживаемости (рис. 2Б). Активация пути ERK1/2 вновь оказалась отрицательным биомаркером ВБП пациентов с глиобластомой, аденокарциномой почки, поджелудочной железы, желудка, мочевого пузыря, аденокарциномой легкого и плоскоклеточной карциномой легкого. Кроме того, она также была отрицательным биомаркером ВБП (но не ОВ) при саркоме, раке щитовидной железы

и колоректальном раке. Как и в случае ОВ, активация путей ERK1/2 была положительным биомаркером для нескольких подтипов рака молочной железы и эндометриоидной карциномы тела матки. Кроме того (в отличие от ОВ), она также оказалась положительным биомаркером для рака головы и шеи, печени и предстательной железы (рис. 2Б).

Параллельно был проведен аналогичный анализ уровней экспрессии соответствующих центральных генов исследуемых путей – *MAPK3* и *MAPK1* (рис. 3). На уровне отдельных генов оба гена продемонстрировали общую тенденцию только в случае карциномы мочевого пузыря (были отрицательными биомаркерами) как для ОВ, так и ВБП.

Затем были усреднены значения OP данных ОВ и ВБП для анализа УАМП и экспрессии отдельных генов (рис. 4). При усреднении OP по УАМП наблюдалось четкое разделение типов ЗНО на два кластера (рис. 4А), в то время как анализ уровней экспрессии отдельных генов не выявил четкой кластеризации (рис. 4Б). Таким образом, анализ активации путей ERK1/2 привел к получению более последовательных и устойчивых результатов,



**Рис. 4.** Тепловая карта усредненных значений отношения рисков для общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без прогрессирования (ВБП), рассчитанных для уровней активации молекулярных путей ERK 1 и ERK 2 (А) и экспрессии отдельных генов ERK 1 и ERK 2 (Б) по данным TCGA. ОР – отношение рисков, \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$ . Если порядки уровней значимости  $p$ -значений различались для данных ОВ и ВБП, указывался более низкий уровень значимости

чем оценка уровней экспрессии отдельных генов. Наблюдаемое явление, вероятно, связано с большей стабильностью агрегированных данных экспрессии генов на основе путей, что теоретически и экспериментально подтверждено в предыдущих исследованиях [3, 15, 22].

Также был рассчитан процент типов ЗНО, при которых отдельные гены (*MAPK3* и *MAPK1*) и соответствующие геноцентрические молекулярные пути могли служить статистически значимыми потенциальными прогностическими биомаркерами по наборам данных из проекта TCGA (табл. 4). Таким образом, активация молекулярных путей являлась потенциальным прогностическим биомаркером чаще, чем экспрессия центральных генов соответствующих путей.

Затем была построена дендрограмма, иллюстрирующая структуру полученных кластеров типов ЗНО в зависимости от значений ОР, рассчитанных для данных активации молекулярных путей (рис. 5).

Дендрограмма демонстрирует два кластера, включающих 10 и 12 типов ЗНО, соответственно, в пределах которых активация молекулярных путей

ERK1 и ERK2 имеет схожее прогностическое значение. В первый кластер из 10 типов ЗНО входят рак желудка, поджелудочной железы, легких, почек, мочевого пузыря, щитовидной железы, шейки матки, саркома и глиобластома, где активация путей ERK1/2 является скорее отрицательным прогностическим биомаркером (для 90–100% типов ЗНО из кластера 1). Во второй кластер включены 12 других типов рака, для которых активация данных путей либо является положительным прогностическим биомаркером (HER2+, люминальный А и люминальный В типы рака молочной железы, рак тела матки; всего 17–25% типов ЗНО из кластера 2), либо не обладает прогностической значимостью (базальный тип рака молочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, меланома и др.; всего ~75% типов ЗНО из кластера 2).

#### Прогностическая значимость активации путей ERK1/2 по транскриптомным данным из литературных источников

В данном исследовании была изучена прогностическая значимость уровней активации путей ERK1/2

**Таблица 4.** Доля типов ЗНО, при которых гены ERK1/2 и соответствующие им геноцентрические молекулярные пути могут служить потенциальными прогностическими биомаркерами на основе данных TCGA

Тип анализа	Тип биомаркера	ERK1, %	ERK2, %
Молекулярный путь	Отрицательный	42	42
	Положительный	12.5	8
Отдельный ген	Отрицательный	8	21
	Положительный	4	21

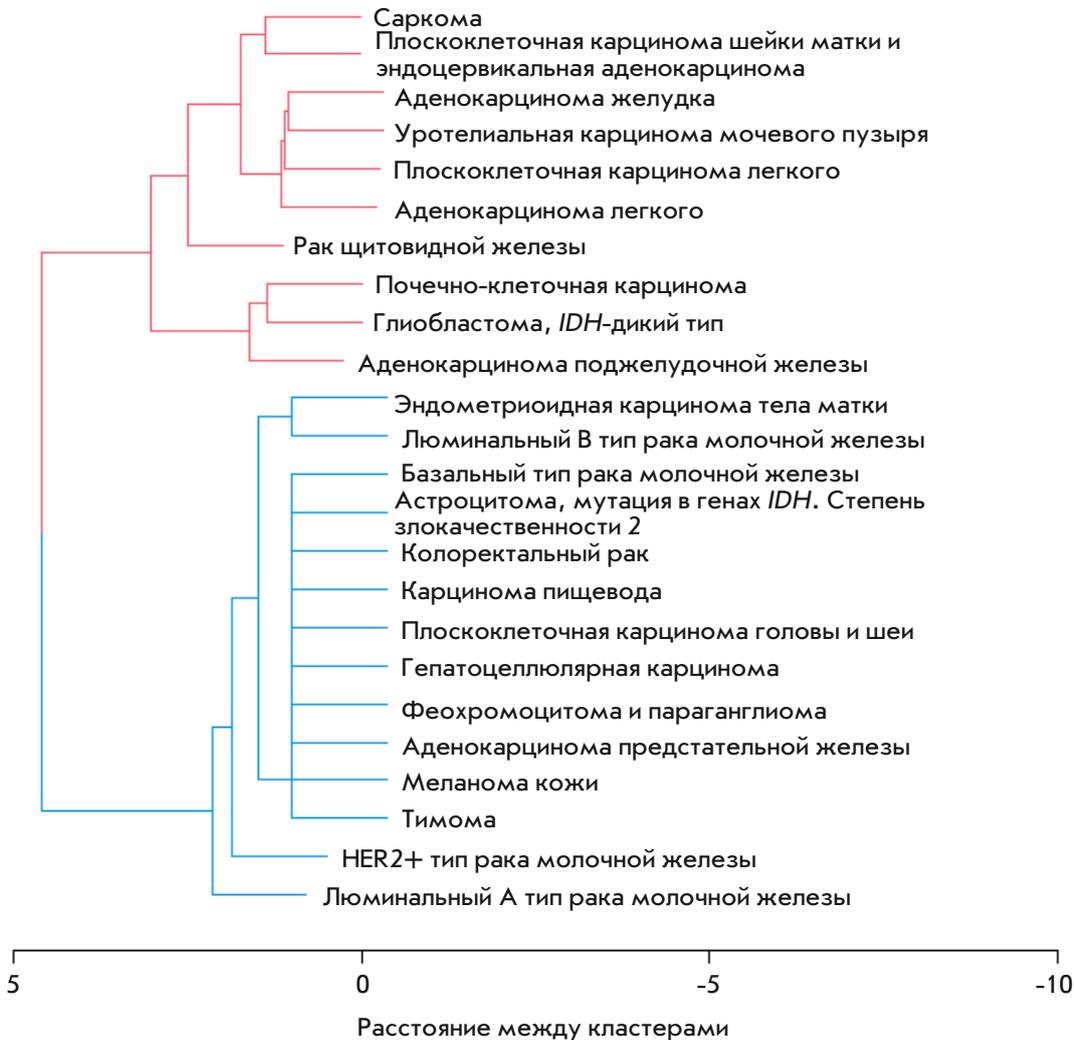
и отдельных генов, используя дополнительный набор ранее опубликованных клинически аннотированных профилей экспрессии генов, собранных Борисовым и соавт. [28]. На основании опубликованных данных ответ пациентов на терапию оценивали в соответствии с критериями RECIST [27].

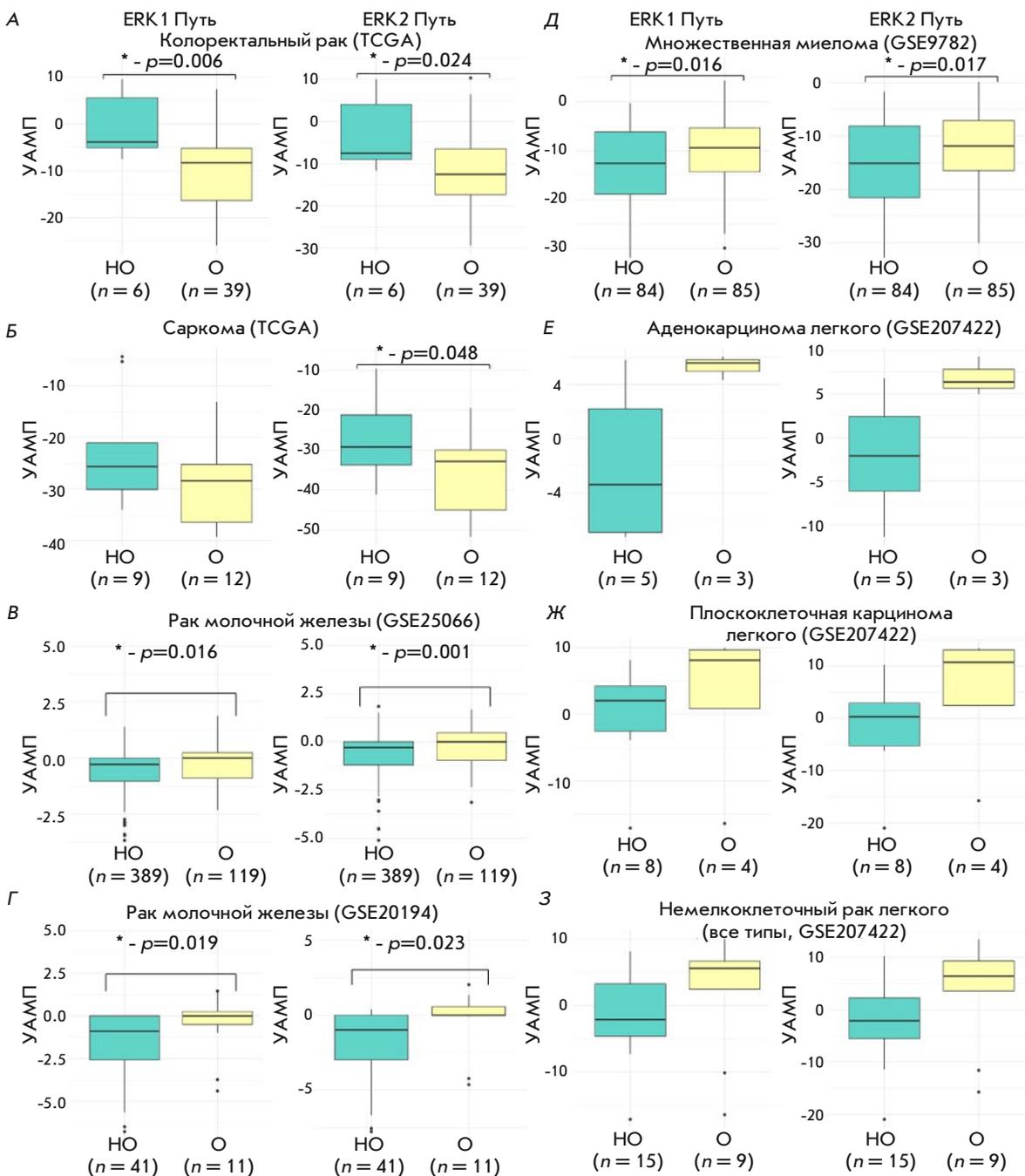
Наш анализ выявил статистически значимые различия в значениях УАМП между группами ответа для пациентов со следующими видами ЗНО: колоректальный рак, саркома, опухоль молочной железы, аденокарцинома легкого и множественная миелома.

Примечательно, что результаты изучения ответа на терапию для пациентов с колоректальным раком (рис. 6А) и саркомой (рис. 6Б) из проекта TCGA согласуются с результатами анализа ОР и прогностической значимостью изучаемых молекулярных путей для выживаемости пациентов из тех же наборов данных TCGA в более крупной выборке. В обоих типах ЗНО пациенты с более низкой активацией одного или обоих анализируемых молекулярных путей продемонстрировали лучший ответ на терапию.

При этом ранее сообщалось о положительной прогностической значимости активации путей ERK1/2 при опухоли молочной железы, что было

**Рис. 5.** Дендрограмма с кластеризацией опухолей по значениям отношения рисков, рассчитанных на основе данных об активации ERK1- и ERK2-центрических путей с использованием профилей экспрессии генов из базы данных TCGA





**Рис. 6.** Различия в УАМП исследуемых молекулярных путей в зависимости от ответа на терапию: А – комбинацией 5-фторурацила, лейковорина и оксалиплатина у пациентов с колоректальным раком из проекта TCGA; Б – комбинацией доцетаксела и гемцитабина у пациентов с саркомой из проекта TCGA; В – таксанами и антрациклином у пациентов с раком молочной железы из набора данных GSE25066; Г – с таксанами и антрациклином у пациентов с раком молочной железы из набора данных GSE20194; Д – с бортезомибом у пациентов с множественной миеломой из набора данных GSE9782; Е – с иммунотерапией у пациентов с аденокарциномой легкого из набора данных GSE207422; Ж – с иммунотерапией у пациентов с плоскоклеточной карциномой легкого из набора данных GSE207422; З – с иммунотерапией у пациентов с раком легкого (все гистологические типы) из набора данных GSE207422. Результаты анализа ответа по RECIST представлены в виде диаграмм размаха, где горизонтальная линия представляет медиану, первый и третий квартили – нижнюю и верхнюю границы прямоугольника, минимальные и максимальные наблюдаемые значения обозначены концами вертикальных линий, а возможные выбросы показаны отдельными точками. Статистически значимые различия отмечены \* с указанием точного  $p$ -значения. «О» означает ответивших на лечение, «НО» – не ответивших

подтверждено в двух наборах данных экспрессии генов у пациентов, получавших комбинированное лечение таксанами и антрациклинами: GSE25066 (паклитаксел, 5-фторурацил, циклофосфамид, доксорубин или эпирубин в адъювантной и неоадъювантной схемах) и GSE20194 (паклитаксел, 5-фторурацил, циклофосфамид, доксорубин в комбинации в неоадъювантной схеме) (рис. 6B,Г).

Кроме того, в данном исследовании была рассмотрена связь УАМП с ответом на терапию при ЗНО крови. Статистически значимые связи были обнаружены для набора данных по множественной миеломе у пациентов, получавших монотерапию бортезомибом (GSE9782). Хотя этот тип ЗНО не был включен в предыдущий анализ TCGA, полученные результаты позволяют предположить, что активация путей ERK1/2 может иметь положительный прогностический эффект на выживаемость (рис. 6Д).

Более того, была изучена связь между УАМП путей ERK1/2 и ответом на анти-PD1-иммунотерапию у пациентов с раком легкого с использованием набора данных GSE207422. Этот набор данных включал данные РНК-секвенирования для 24 пациентов с опухолью легкого, из которых у 12 была диагностирована плоскоклеточная карцинома легкого, у 8 – аденокарцинома легкого, а у остальных – другие диагнозы. Как для всей выборки, так и для отдельных групп плоскоклеточной карциномы легкого и аденокарциномы легкого наблюдалась тенденция к тому, что у пациентов, ответивших на иммунотерапию, в опухолевых образцах наблюдались более высокие значения УАМП для путей ERK1/2 (рис. 6E–З). Однако из-за небольшой выборки и того, что наблюдаемые различия не достигли статистической значимости, данное наблюдение требует повторного анализа на более крупной независимой когорте пациентов.

Таким образом, анализ наборов клинических данных подтвердил, что активация молекулярных путей ERK1/2 может быть существенно связана с ответом на некоторые типы противоопухолевой терапии, например, при опухоли молочной железы, колоректальном раке и саркоме.

### Прогностическая значимость активации путей ERK1/2 по транскриптомным данным из экспериментальной базы

Полученные результаты были дополнены данными, полученными с использованием ранее опубликованных нашей исследовательской группой собственных наборов данных экспрессии генов для онкологических пациентов, аннотированных с учетом ответа на терапию. В данном исследовании рассматри-

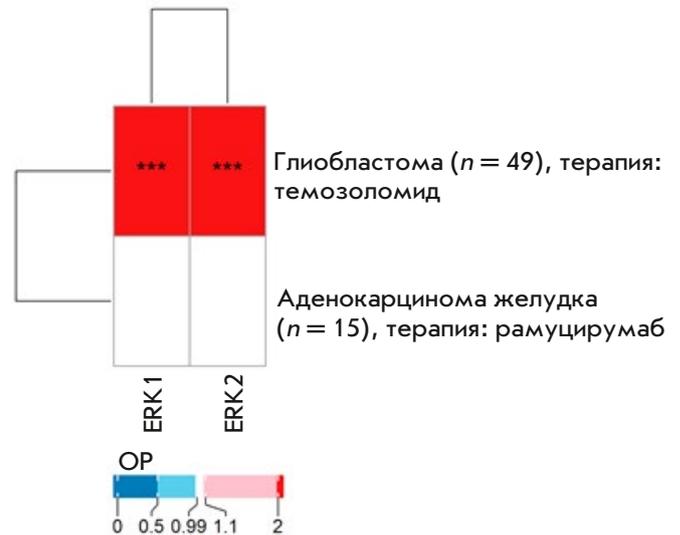


Рис. 7. Тепловая карта значений отношения рисков, рассчитанных для активации молекулярных путей ERK1 и ERK2 на основе активации молекулярных путей в зависимости от ответа на противоопухолевую химиотерапию по показателю выживаемости без прогрессирования (ВБП). ОР – отношение рисков, \*\*\* –  $p < 0.001$

вались три клинические выборки: глиобластома ( $n = 49$ ), опухоль желудка ( $n = 15$ ) и множественная миелома ( $n = 60$ ), получавшие противоопухолевую терапию. Ответ на терапию оценивался либо только по ВБП (глиобластома), либо только по критериям RECIST (множественная миелома), либо как по ВБП, так и по критериям RECIST (опухоль желудка).

Анализ данных ВБП выявил резко отрицательный прогноз при активации ERK1/2 в ответ на терапию темозоломидом при глиобластоме и отсутствие значимой связи при таргетной терапии рамуцирумабом пациентов с раком желудка (рис. 7). Также не было обнаружено статистически значимых различий в активации путей ERK1/2 между пациентами, ответившими на терапию по критериям RECIST и не ответившими на нее.

В наборе данных по множественной миеломе также не было обнаружено статистически значимых различий в значениях УАМП путей ERK1/2 между пациентами вне зависимости от ответа на терапию, содержащую бортезомиб.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании были впервые алгоритмически реконструированы молекулярные пути для регуляторных протеинкиназ ERK1 и ERK2 с помощью модели интерактома. Затем была изучена связь

уровней активации данных путей с имеющимися данными о выживаемости пациентов и чувствительности к различным терапевтическим стратегиям для разных типов ЗНО.

Полученные результаты позволяют разделить типы ЗНО на три класса, в которых активация путей ERK1/2 может служить как отрицательным, так и положительным прогностическим биомаркером или не иметь статистической значимости. В частности, к первому классу относятся рак желудка, два различных гистологических типа опухоли легкого, глиобластома, саркома, рак почки и некоторые другие виды ЗНО (рис. 4). Наши результаты также согласуются с литературными данными: например, экспериментальная связь между активацией ERK и отрицательным прогнозом известна для опухоли желудка [45, 46], аденокарциномы почки, мочевого пузыря и легкого [47]. Было продемонстрировано, что для глиобластом ангиогенные факторы и рецепторы играют одну из ключевых ролей в их развитии, в частности, активируя каскад RAS-RAF-MEK-ERK и способствуя пролиферации, миграции и выживанию злокачественных клеток [48]. В данном исследовании активация пути ERK ассоциировалась с более низким показателем ВБП для пациентов с глиобластомой после терапии алкилирующим агентом темозоломидом. Таким образом, активация пути ERK1/2 при глиобластоме потенциально может быть не только прогностическим биомаркером выживаемости, но и биомаркером ответа на данный вид терапии.

Ко второму классу относятся те виды ЗНО, при которых активация ERK1/2 являлась положительным прогностическим биомаркером (HER2+, люминальный А и люминальный В типы рака молочной железы и рак тела матки). Ранее было доказано, что активация ERK1 ассоциируется с лучшим прогнозом для пациентов с раком молочной железы, поскольку приводит к блокаде сигнального пути Hippo и одной из его последующих мишеней – белка YAP1; однако в том же исследовании активация ERK2 была связана с отрицательным прогнозом [49]. При этом недавно было продемонстрировано, что HER2+ тип опухоли молочной железы устойчив к таргетной терапии при низкой активности киназы ERK1/2, а высокая активность киназы является прогностическим биомаркером чувствительности опухо-

ли к терапии [50]. Это соответствует нашим результатам, где также была обнаружена положительная связь между активацией пути ERK1/2 и чувствительностью опухоли молочной железы к таксанам и антрациклинам, тогда как экспрессия отдельных соответствующих центральных генов этих путей являлась гораздо менее точным биомаркером.

Для третьего класса, включающего базальный тип рака молочной железы, гепатоцеллюлярную карциному, меланому и некоторые другие виды ЗНО, не удалось выявить статистически значимой связи с активацией пути ERK1/2 в качестве прогностического биомаркера. Мы считаем, что в совокупности полученные результаты могут быть полезны для учета клинически значимых изменений внутриклеточной сигнализации в ЗНО и для разработки комбинированных методов терапии опухолей, которые могут включать таргетные ингибиторы ERK1/2. Также целесообразно разработать адекватные модели для тестирования различных комбинаций препаратов, поскольку активация путей ERK1/2 может оказывать разнонаправленное влияние на результат терапии различных типов ЗНО человека.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании мы показали, что уровень активации алгоритмически реконструированных сигнальных путей ERK1/2 может быть эффективным прогностическим биомаркером ЗНО, при этом его прогностическая значимость сильно зависит от типа ЗНО и вида терапии. ●

*Построение геноцентрических молекулярных путей выполнено при финансовой поддержке проекта «Digital technologies for quantitative medicine solutions» FSMG-2021-0006 (соглашение № 075-03-2024-117 от 17.01.2024 г.).*

*Дифференциальный анализ молекулярных путей и данных об экспрессии генов, а также их связи с клиническими исходами у онкологических пациентов поддержаны Российским научным фондом (грант № 22-14-00074).*

*Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27497>.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <https://www.iarc.who.int/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa>. (Accessed June 13, 2024)
2. Wild C.P., Weiderpass E., Stewart B.W. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. // 2020 (Accessed June 15, 2024). <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-Cancer-Research-For-Cancer-Prevention-2020>. (Accessed June 15, 2024)
3. Buzdin A., Sorokin M., Garazha A., Sekacheva M., Kim E., Zhukov N., Wang Y., Li X., Kar S., Hartmann C., et al. // Semin Cancer Biol. 2018. V. 53. P. 110–124.

4. Chappell W.H., Steelman L.S., Long J.M., Kempf R.C., Abrams S.L., Franklin R.A., Bäsecke J., Stivala F., Donia M., Fagone P., et al. // *Oncotarget*. 2011. V. 2. № 3. P. 135–164.
5. Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Kempf C.R., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazzarino M.C., et al. // *Aging (Albany NY)*. 2011. V. 3. № 3. P. 192–222.
6. Stefani C., Miricescu D., Stanescu-Spinu I.-I., Nica R.I., Greabu M., Totan A.R., Jinga M. // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. № 19. P. 10260.
7. Sanchez-Vega F., Mina M., Armenia J., Chatila W.K., Luna A., La K.C., Dimitriadoy S., Liu D.L., Kantheti H.S., Saghafinia S., et al. // *Cell*. 2018. V. 173. № 2. P. 321–337.e10.
8. Liu F., Yang X., Geng M., Huang M. // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018. V. 8. № 4. P. 552–562.
9. Lebedev T., Buzdin A., Khabusheva E., Spirin P., Suntsova M., Sorokin M., Popenko V., Rubtsov P., Prassolov V. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. № 14. P. 7724.
10. Fu L., Chen S., He G., Chen Y., Liu B. // *J. Med. Chem*. 2022. V. 65. № 20. P. 13561–13573.
11. Mass R.D., Press M.F., Anderson S., Cobleigh M.A., Vogel C.L., Dybdal N., Leiberman G., Slamon D.J. // *Clinical Breast Cancer*. 2005. V. 6. № 3. P. 240–246.
12. Kamel H.F.M., Al-Amodi H.S.A.B. // *Genomics. Proteomics & Bioinformatics*. 2017. V. 15. № 4. P. 220–235.
13. Ozerov I.V., Lezhnina K.V., Izumchenko E., Artemov A.V., Medintsev S., Vanhaelen Q., Aliper A., Vijj J., Osipov A.N., Labat I., et al. // *Nat. Commun*. 2016. V. 7. P. 13427.
14. Sorokin M., Borisov N., Kuzmin D., Gudkov A., Zolotovskaia M., Garazha A., Buzdin A. // *Front Genet*. 2021. V. 12. P. 617059.
15. Borisov N., Suntsova M., Sorokin M., Garazha A., Kovalchuk O., Aliper A., Ilnitskaya E., Lezhnina K., Korzinkin M., Tkachev V., et al. // *Cell Cycle*. 2017. V. 16. № 19. P. 1810–1823.
16. Lezhnina K., Kovalchuk O., Zhavoronkov A.A., Korzinkin M.B., Zabolotneva A.A., Shegay P.V., Sokov D.G., Gaifullin N.M., Rusakov I.G., Aliper A.M., et al. // *Oncotarget*. 2014. V. 5. № 19. P. 9022–9032.
17. Gudkov A., Shirokorad V., Kashintsev K., Sokov D., Nikitin D., Anisenko A., Borisov N., Sekacheva M., Gaifullin N., Garazha A., et al. // *Front Mol. Biosci*. 2022. V. 9. P. 753318.
18. Sorokin M., Poddubskaya E., Baranova M., Glusker A., Kogoniya L., Markarova E., Allina D., Suntsova M., Tkachev V., Garazha A., et al. // *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud*. 2020. V. 6. № 2. P. a004945.
19. Sorokin M., Zolotovskaia M., Nikitin D., Suntsova M., Poddubskaya E., Glusker A., Garazha A., Moisseev A., Li X., Sekacheva M., et al. // *BMC Cancer*. 2022. V. 22. P. 1113.
20. Zhu Q., Izumchenko E., Aliper A.M., Makarev E., Paz K., Buzdin A.A., Zhavoronkov A.A., Sidransky D. // *Hum. Genome Var*. 2015. V. 2. P. 15009.
21. Zolotovskaia M., Tkachev V., Sorokin M., Garazha A., Kim E., Kantelhardt S.R., Bikar S.-E., Zottel A., Šamec N., Kuzmin D., et al. // *Cancers (Basel)*. 2021. V. 13. № 16. P. 4117.
22. Zolotovskaia M., Kovalenko M., Pugacheva P., Tkachev V., Simonov A., Sorokin M., Seryakov A., Garazha A., Gaifullin N., Sekacheva M., et al. // *Proteomes*. 2023. V. 11. № 3. P. 26. <https://portal.gdc.cancer.gov/>. (Accessed June 4, 2024)
24. Tomczak K., Czerwińska P., Wiznerowicz M. // *Contemp Oncol (Pozn)*. 2015. V. 19. № 1A. P. A68–77.
25. Zakharova G., Efimov V., Raevskiy M., Rumiantsev P., Gudkov A., Belogurova-Ovchinnikova O., Sorokin M., Buzdin A. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 24. № 1. P. 157.
26. Netanelly D., Avraham A., Ben-Baruch A., Evron E., Shamir R. // *Breast Cancer Research*. 2016. V. 18. № 1. P. 74.
27. Eisenhauer E.A., Therasse P., Bogaerts J., Schwartz L.H., Sargent D., Ford R., Dancey J., Arbuck S., Gwyther S., Mooney M., et al. // *European Journal of Cancer*. 2009. V. 45. № 2. P. 228–247.
28. Borisov N., Sorokin M., Tkachev V., Garazha A., Buzdin A. // *BMC Med Genomics*. 2020. V. 13. № Suppl 8. P. 111.
29. Goldman M., Craft B., Swatloski T., Cline M., Morozova O., Diekhans M., Haussler D., Zhu J. // *Nucleic Acids Res*. 2015. V. 43. № Database issue. P. D812–D817.
30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. (Accessed June 5, 2024)
31. Edgar R., Domrachev M., Lash A.E. // *Nucleic Acids Res*. 2002. V. 30. № 1. P. 207–210.
32. Kim E.L., Sorokin M., Kantelhardt S.R., Kalasauskas D., Sprang B., Fauss J., Ringel F., Garazha A., Albert E., Gaifullin N., et al. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 2. P. 520.
33. Sorokin M., Raevskiy M., Zottel A., Šamec N., Skoblar Vidmar M., Matjašič A., Zupan A., Mlakar J., Suntsova M., Kuzmin D.V., et al. // *Cancers (Basel)*. 2021. V. 13. № 14. P. 3419.
34. Borisov N., Sergeeva A., Suntsova M., Raevskiy M., Gaifullin N., Mendeleeva L., Gudkov A., Nareiko M., Garazha A., Tkachev V., et al. // *Front Oncol*. 2021. V. 11. P. 652063.
35. Zolotovskaia M.A., Tkachev V.S., Guryanova A.A., Simonov A.M., Raevskiy M.M., Efimov V.V., Wang Y., Sekacheva M.I., Garazha A.V., Borisov N.M., et al. // *Comput Struct Biotechnol J*. 2022. V. 20. P. 2280–2291.
36. Buzdin A., Tkachev V., Zolotovskaia M., Garazha A., Moshkovskii S., Borisov N., Gaifullin N., Sorokin M., Suntsova M. // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol*. 2021. V. 127. P. 1–53.
37. Love M.I., Huber W., Anders S. // *Genome Biology*. 2014. V. 15. № 12. P. 550.
38. <https://www.r-project.org/>. (Accessed June 6, 2024)
39. Kassambara A., Kosinski M., Biecek P., Fabian S. 2021. <https://cran.r-project.org/web/packages/survminer/index.html>. (Accessed June 6, 2024)
40. Therneau T.M., Lumley T., Elizabeth A., Cynthia C. 2024. <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/index.html>. (Accessed June 6, 2024)
41. Ogle D.H., Doll J.C., Wheeler A.P., Dinno A. 2023. <https://cran.r-project.org/web/packages/FSA/citation.html>. (Accessed June 6, 2024)
42. Fox J, Weisberg S. 2019. <https://cran.r-project.org/web/packages/car/citation.html>. (Accessed June 6, 2024)
43. Wickham H. 2016. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-98141-3>. (Accessed June 6, 2024)
44. Gu Z., Eils R., Schlesner M. // *Bioinformatics*. 2016. V. 32. № 18. P. 2847–2849.
45. Gao J., Pan H., Zhu Z., Yu T., Huang B., Zhou Y. // *ABBS*. 2020. V. 52. № 9. P. 975–987.
46. Tseng P.-C., Chen C.-L., Shan Y.-S., Chang W.-T., Liu H.-S., Hong T.-M., Hsieh C.-Y., Lin S.-H., Lin C.-F. // *Cell Communication and Signaling*. 2014. V. 12. № 1. P. 69.
47. Kawano T., Inokuchi J., Eto M., Murata M., Kang J.-H. // *Cancers*. 2022. V. 14. № 21. P. 5425.
48. Ahir B.K., Engelhard H.H., Lakka S.S. // *Mol. Neurobiol*. 2020. V. 57. № 5. P. 2461–2478.
49. Yu S., Zhang M., Huang L., Ma Z., Gong X., Liu W., Zhang J., Chen L., Yu Z., Zhao W., et al. // *Aging (Albany NY)*. 2019. V. 11. № 24. P. 12295–12314.
50. Debets D.O., Graaf E.L. de, Liefwaard M.C., Sonke G.S., Lips E.H., Ressa A., Altelaar M. // *iScience*. 2024. V. 27. № 6. [https://www.cell.com/iscience/abstract/S2589-0042\(24\)01080-0](https://www.cell.com/iscience/abstract/S2589-0042(24)01080-0). (Accessed June 11, 2024)

УДК 616-097.3

# Показатели гуморального иммунитета после введения «Спутник Лайт» на длительных сроках у неинфицированных и инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев

Ф. М. Ижаева<sup>1</sup>, А. И. Тухватулин<sup>1\*</sup>, А. Ш. Джаруллаева<sup>1</sup>, И. В. Должикова<sup>1</sup>, О. В. Зубкова<sup>1</sup>, Д. В. Щебляков<sup>1</sup>, Н. Л. Лубенец<sup>1</sup>, Е. А. Смолярчук<sup>2</sup>, Т. Г. Зубкова<sup>3</sup>, А. С. Ерохова<sup>1</sup>, И. М. Черенкова<sup>1</sup>, К. М. Бухтин<sup>1</sup>, О. Попова<sup>1</sup>, Н. М. Тухватулина<sup>1</sup>, Б. С. Народицкий<sup>1</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>1,2</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Общество с ограниченной ответственностью «Медицинский центр Эко-безопасность», Санкт-Петербург, 191119 Россия

\*E-mail: Amir\_tukhvatulina@gamaleya.org

Поступила в редакцию 03.10.2024

Принята к печати 24.12.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27529

**РЕФЕРАТ** Несмотря на активное исследование иммуногенности вакцин против COVID-19, введенных в клиническую практику, сохраняется дефицит данных о показателях поствакцинального иммунитета, особенно на длительных сроках наблюдения. В данной работе впервые представлены показатели гуморального иммунитета, определенные в рамках открытого клинического исследования 1–2 фазы вакцины «Спутник Лайт», включая поздние сроки наблюдения (90 и 180 дни). Для наиболее точной оценки параметров гуморального поствакцинального иммунитета (титр и индекс avidности антигенспецифических антител против RBD-домена SARS-CoV-2) проведен дополнительный анализ, позволивший отобрать добровольцев с иммунитетом, сформированным только в ответ на проведенную вакцинацию, выделив также две группы добровольцев с гибридным иммунитетом: инфицированных SARS-CoV-2 до и после вакцинации. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении (сероконверсия 73%) и созревании гуморального иммунитета у добровольцев через 180 дней после однократной вакцинации «Спутник Лайт». Естественная иммунизация в результате инфекции SARS-CoV-2 приводит к выраженному изменению регистрируемых показателей поствакцинального иммунитета.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** COVID-19, SARS-CoV-2, вакцины, «Спутник Лайт», поствакцинальный иммунитет, созревание сыворотки, гибридный иммунитет.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** Ad26 – дефектный по репликации рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26; IgG – иммуноглобулин класса G; IgM – иммуноглобулин класса M; OD – оптическая плотность; RBD – рецепторсвязывающий домен; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; КИ – клиническое исследование; ИФА – иммуноферментный анализ; КП – коэффициент позитивности; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СГТ – средний геометрический титр; ТМБ – тетраметилбензидин.

**ВВЕДЕНИЕ**

Пандемия COVID-19 в 2019 году, вызванная внезапным распространением нового вида коронавируса, получившего название SARS-CoV-2, оказала существенное влияние на национальные системы здравоохранения [1]. В короткие сроки была развернута масштабная разработка средств специфической терапии и профилактики COVID-19. Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 3 года проведено более 180 клинических исследований, в результате которых 50 вакцин получили разрешение на применение в разных странах [2].

После введения вакцин в клиническую практику необходимо продолжение исследований, направленных на определение их иммуногенности. Получаемые при этом данные нужны не только для детализации принципов функционирования иммунной системы человека в целом, но и для того, чтобы определить, а также сравнить иммуногенность современных вакцин против COVID-19 как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе. При этом следует отметить сложность проведения и анализа результатов долгосрочных клинических исследований. Примером может стать противоречивость результатов длительных клинических исследований вакцины, созданной на платформе дефектного по репликации рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26 (Ad26) – Ad26.COV2.S (Janssen Vaccines). Сравнивая показатели гуморального иммунного ответа между пиковыми значениями на 4-й неделе и через 8 месяцев после однократного введения вакцины Ad26.COV2.S, A.Y. Collier и соавт. регистрировали повышение титров вирус-нейтрализующих антител (со среднего геометрического титра (СГТ) 1 : 146 до 1 : 629) при снижении титра IgG-антител против рецепторсвязывающего домена (RBD) поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2 (с 1 : 1361 до 1 : 843) [3]. В другой работе, напротив, зарегистрировано повышение анти-RBD IgG-антител (с 1 : 645 на 29 день до 1 : 1306 на 239 день исследования) совместно со снижением титра нейтрализующих псевдотипированные вирусные частицы антител (с 1 : 272 до 1 : 192) через 8 месяцев после однократной иммунизации Ad26.COV2.S [4]. Наконец, результаты третьего длительного клинического исследования показали снижение титра нейтрализующих псевдотипированные вирусные частицы антител (с СГТ 1 : 105 до 1 : 41) со статистически незначимым снижением титра анти-RBD IgG-антител (с СГТ 1 : 20447 до 1 : 15379) у однократно вакцинированных Ad26.COV2.S добровольцев в период между 1,5 и 6 месяцами наблюдения [5].

Причиной подобной разницы в результатах может быть влияние незарегистрированной инфекции COVID-19 в поствакцинальный период, которая, как известно, способна значительно изменить параметры напряженности иммунного ответа [6, 7]. Поскольку все вакцины, зарегистрированные на сегодняшний день, не обеспечивают 100% защиты от заражения SARS-CoV-2, очевидно, что длительность клинического исследования пропорциональна риску инфицирования коронавирусом [8]. В долгосрочном исследовании невозможно изолировать добровольцев на все время наблюдения. Поэтому при анализе результатов крайне важно отделить инфицированных добровольцев от неинфицированных SARS-CoV-2 в поствакцинальный период. Дополнительные сложности также могут возникнуть при включении небольшого числа добровольцев в исследование. В этой ситуации объем выборки неинфицированных SARS-CoV-2 индивидов может быть недостаточным для получения статистически значимых результатов.

Ранее нами были представлены результаты безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины «Спутник Лайт», созданной на основе Ad26-вектора, содержащего ген полноразмерного белка S SARS-CoV-2, до 42 дня наблюдения [9]. В новой работе предстояло определить изменение показателей гуморального поствакцинального иммунитета на длительных сроках (90 и 180 дни) у вакцинированных добровольцев. Для получения данных о собственной иммуногенности вакцины мы провели дополнительный анализ сывороток добровольцев (определение антител против N-белка SARS-CoV-2 на всем протяжении исследования), выделив группу из 59 индивидов, не инфицированных вирусом SARS-CoV-2 до вакцинации и на всем протяжении клинического исследования.

Представленные результаты позволяют определить собственную иммуногенность вакцины «Спутник Лайт» на длительных сроках, а также сравнить эволюцию реакций поствакцинального гуморального иммунитета с двумя группами добровольцев с гибридным иммунитетом: инфицированных SARS-CoV-2 до (группа 2) или после (группа 3) вакцинации.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ****Дизайн клинического исследования и процедуры**

Клиническое исследование 1–2 фазы «Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Спутник Лайт» в профилактике коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2» (Протокол

№ 06-Спутник Лайт-2020) проводилось в 2020 году на базе одного медицинского учреждения «Эко-безопасность» (Санкт-Петербург, Россия). Исследование получило разрешение локального этического комитета и проведено на основании разрешения Министерства здравоохранения РФ. Номер регистрации в ClinicalTrials.gov – NCT04713488.

Процедура скрининга начиналась с момента получения письменного информированного согласия и длилась не более 7 дней до момента включения в исследование.

В результате проведенного скрининга из 150 добровольцев в исследование было включено 110 без предварительной рандомизации и стратификации. Все участники КИ удовлетворяли следующим требованиям: наличие информированного согласия добровольца на участие в исследовании; возраст старше 18 лет; отсутствие хронических инфекционных (ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис) и онкологических заболеваний, не вакцинированные против COVID-19 любыми другими препаратами, отсутствие терапии иммуноглобулинами и иммуносупрессивными препаратами за 30 дней до включения в исследование; отсутствие COVID-19, подтвержденное отрицательным результатом ПЦР-теста на наличие РНК SARS-CoV-2 на скрининге (набор Ингифика Алкор-Био, Россия) и отрицательным результатом анализа на наличие антител IgM и IgG к SARS-CoV-2 методом полуколичественного иммуноферментного анализа (набор Mindray, КНР); отсутствие в анамнезе сведений о перенесенном ранее COVID-19.

После процедуры скрининга было организовано шесть амбулаторных визитов (1, 10, 28, 42, 90, 180 дни после вакцинации) со сдачей крови. На первом визите (1 день) проводилось однократное внутримышечное введение вакцины «Спутник Лайт» в жидкой форме, разработанной и полученной в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России согласно требованиям надлежащей производственной практики. Вакцина представляет собой рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26, содержащий в своем геноме ген полноразмерного S белка SARS-CoV-2 ( $10^{11}$  вч на 0.5 мл/доза). ПЦР-тест на наличие РНК SARS-CoV-2 проводился дополнительно на 1, 10 и 28 дни исследования.

#### Определение титра суммарных IgG-антител и их субтипов к RBD S гликопротеина SARS-CoV-2

Из крови добровольцев получали образцы сыворотки центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин. Сыворотку разводили с двукратным шагом, начиная с 1 : 50 до 1 : 102400. Титр антигенспецифических антител определяли с помощью набор

ра реагентов для иммуноферментного выявления анти-RBD IgG «SARS-COV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (РУ № РЗН 2020/10393). Разведенные образцы сыворотки вносили в планшет с сорбированным антигеном (100 нг RBD на лунку), инкубировали при перемешивании (300 об/мин, 37°C) в течение 1 ч. После отмывки фосфатно-солевым буфером с 0.05% Tween-20 в планшет добавляли антитела к тотальным IgG человека (NA933-1ML, Cytiva, США) или субтипам IgG1 и IgG4 (A10648 и A10654, Invitrogen, США), конъюгированные с пероксидазой хрена, и снова инкубировали при перемешивании (300 об/мин, 37°C) в течение 1 ч. После отмывки добавляли раствор тетраметилбензидингидрохлорида (ТМБ), инкубировали в темноте 15 мин и останавливали реакцию, добавляя 1 М серную кислоту. Измеряли оптическую плотность на длине волны 450 нм ( $OD_{450}$ ). Титром IgG считали наибольшее разведение сыворотки, в котором значение  $OD_{450}$  исследуемого образца превышало значение  $OD_{450}$  контрольной сыворотки в том же разведении более чем в 2 раза (в качестве контроля для каждого отдельного добровольца использовали его собственную сыворотку, полученную до вакцинации). Если в образце сыворотки в разведении 1 : 50 не было превышения  $OD_{450}$  относительно контроля, то этому образцу присваивали титр 1 : 25. Все образцы анализировали в двух повторах и определяли среднее значение.

#### Определение индекса avidности IgG-антител к RBD гликопротеина S SARS-CoV-2

В планшеты для выявления анти-RBD-IgG «SARS-COV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» вносили образцы сыворотки в двукратных разведениях. Через 1 ч в лунки добавляли равный объем фосфатно-солевого буфера или 8 М мочевины (100 мкл) на 10 мин. Далее поступали как при определении титра анти-RBD-IgG. Индекс avidности для каждого образца сыворотки рассчитывали как соотношение  $OD_{450}$  лунки с денатурирующим агентом (в предпоследнем разведении, двукратно превышающем  $OD_{450}$  контрольной сыворотки в том же разведении), к  $OD_{450}$  лунки с фосфатно-солевым буфером в том же разведении [10]. Все образцы анализировали в двойных повторах; результат определяли как среднее значение двух повторов.

#### Определение антител к нуклеопротеину (N-белку) SARS-CoV-2

Проводили дополнительное определение антител к N-белку SARS-CoV-2, используя набор для *in vitro* ИФА диагностики «K153NG» («ХЕМА», Россия)

в соответствии с инструкцией производителя. Сыворотки разводили в 100 раз в буфере для разведения, затем вносили в 96-луночный планшет с сорбированным антигеном по 100 мкл в двух повторах, также в три дополнительные лунки вносили контрольные образцы (отрицательные и положительные, прилагаются в наборе); инкубировали планшет при 37°C в течение 30 мин без перемешивания, после чего отмывали промывочным раствором 5 раз, и вносили в лунки по 100 мкл конъюгата вторичных антител. После инкубации и отмывки, как описано выше, вносили по 100 мкл раствора ТМБ и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 25 мин. После этого реакцию останавливали, добавляя по 100 мкл 1 М серной кислоты в лунку, и немедленно измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Для интерпретации результатов находили значение Cut-off по следующей формуле:  $Cut\ off = X + 0,2$ , где X – среднее значение  $OD_{450}$ , полученное для Отрицательных контролей 1, 2. Далее для каждого образца находили коэффициент позитивности (КП) по формуле  $КП = OD_{450}\text{ Образца}/cut-off$ . Полученный результат интерпретировали следующим образом:  $КП < 0,9$  – отрицательный,  $КП > 1,1$  – положительный. Для образцов  $1,1 < КП < 0,9$  повторяли анализ с меньшим разведением сыворотки.

#### Статистическая обработка данных

Динамику показателей внутри одной группы сравнивали с применением критерия Фридмана с поправкой Данна. Для сравнения показателей в одну и ту же временную точку, но между разными группами, использовали критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна. Корреляцию оценивали по критерию Пирсона. Анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad 8 и Microsoft Office Excel 2019.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения динамики (в том числе индивидуальной) развития поствакцинального иммунитета, сформированного до 180 дня наблюдения, были отобраны 97 добровольцев, прошедших все запланированные визиты с отбором крови (на 1, 42, 90, 180 дни после вакцинации) (рис. 1).

Сыворотку добровольцев использовали для определения IgG-антител против RBD и N-белка SARS-CoV-2 до и после вакцинации. При том, что все добровольцы были негативными как по наличию РНК SARS-CoV-2, так и по результатам ИФА на IgM и IgG к SARS-CoV-2 на этапе скрининга, в опубликованной ранее работе, представляющей результаты до 42 дня исследования, была

определена группа из 14 серопозитивных добровольцев с анти-RBD IgG-антителами до вакцинации [9]. В представленной работе, используя сыворотки, полученные на 90 и 180 дни, у другой части добровольцев были обнаружены антитела против N-белка SARS-CoV-2. Таким образом, для получения данных об иммуногенности вакцины «Спутник Лайт» в представленном исследовании 97 добровольцев разделили на три группы. Первая группа включает добровольцев, не инфицированных SARS-CoV-2 как до, так и после вакцинации, т.е. тех, параметры гуморального иммунитета у которых определяются исключительно проведенной вакцинацией (59 человек). Иммунитет добровольцев второй группы был праймирован инфекцией SARS-CoV-2 (14 человек), предшествующей введению «Спутник Лайт». Добровольцы третьей группы (24 человека) не имели иммунитета к SARS-CoV-2 до вакцинации, однако получили гибридный иммунитет после инфекции SARS-CoV-2 между 42 и 180 днем (трое участников контактировали с вирусом в период между 42 и 90 днем, оставшиеся 21 – между 90 и 180 днем).

#### Динамика титра RBD-специфичных антител класса G в сыворотке крови неинфицированных и инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев в поствакцинальный период

Анализ уровней RBD-специфичных IgG-антител показал, что у добровольцев без предсуществующего иммунитета (группа 1) вакцинация «Спутник Лайт» вызвала резкий подъем среднегеометрического титра (СГТ) до 1 : 1697 на 42 день, который затем начал выражено снижаться, достигая 1 : 461 к 90 дню и 1 : 141 на 180 день (рис. 2). Добровольцы второй группы с предсформированным иммунитетом к SARS-CoV-2 имели СГТ 1 : 594 на момент вакцинации. Введение вакцины в этой группе вызвало наибольший подъем титра антигенспецифичных антител на 42 день (СГТ 1 : 19986), который затем начал снижение в темпе, близком с первой группой (СГТ 1 : 6400 на 90 день, СГТ 1 : 2758 на 180 день). Добровольцы третьей группы, не имевшие предсуществующего иммунитета к SARS-CoV-2 (подпороговый СГТ 1 : 25 на 1 день), показали сходный с первой группой подъем напряженности гуморального иммунного ответа на 42 день (СГТ 1 : 1695). Однако затем, после статистически значимого падения на 90 день до 1 : 673, наблюдался резкий скачок до СГТ 1 : 12435 на 180 день. Повышение СГТ на 180 день связано с бустированием иммунитета прошедшей инфекцией SARS-CoV-2 у всех добровольцев данной группы (согласно появлению антител против N-белка SARS-CoV-2). Тогда как на 90 день у 3 из 24 инфицированных (между

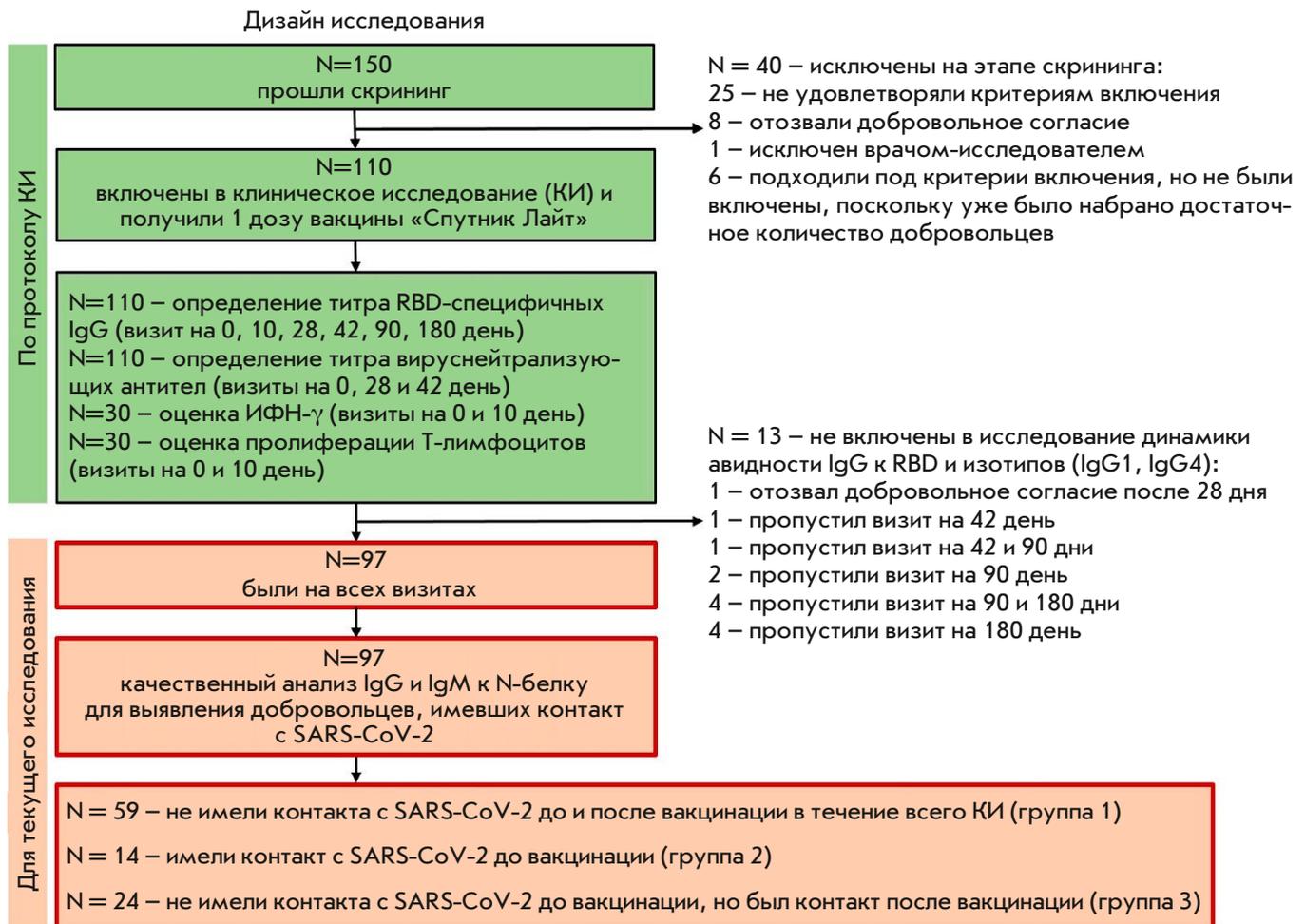
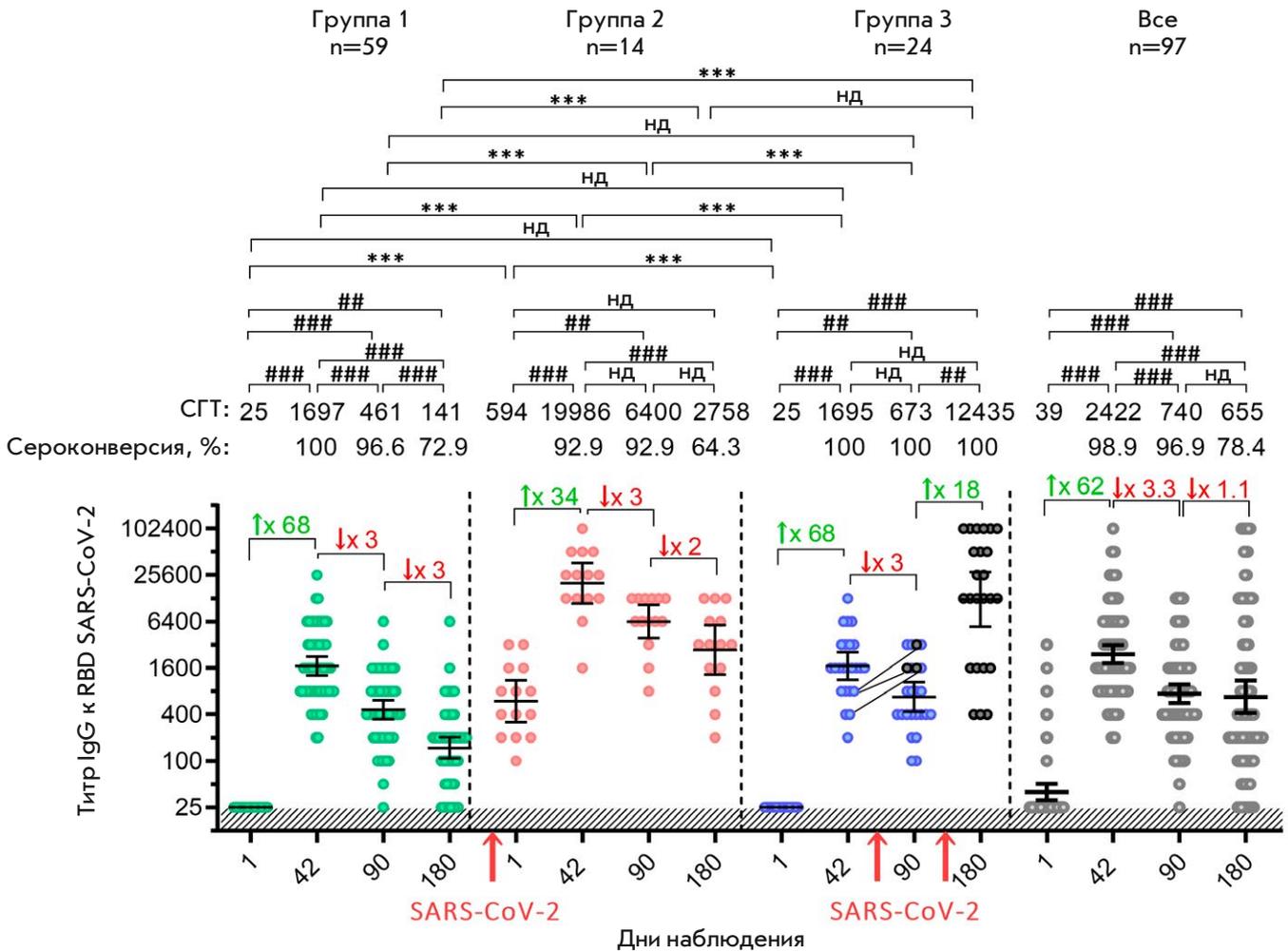


Рис. 1. Структура исследования и стратификация добровольцев по группам

42 и 90 днями) SARS-CoV-2 добровольцев не произошло значимого изменения СГТ анти-RBD IgG на фоне снижения уровня антител после вакцинации. Оценивая результаты, полученные во всей группе из 97 добровольцев, можно отметить сходство кривой антительного ответа с ответом в первой группе, где после проведенной вакцинации наблюдается максимум напряженности на 42 день с последующим падением. Однако значения титров антител в общей группе были больше, чем в первой группе во всех точках отбора крови, достигая статистически значимых различий на 180 день ( $p < 0.002$ ). Кроме того, падение титра в поздних временных точках в общей группе было более плавным, чем в первой группе. В целом, представленные результаты наглядно показывают зависимость изменения напряженности гуморального ответа от анализируемой выборки добровольцев.

Обнаружив выраженный подъем титра суммарных IgG-антител после вакцинации «Спутник Лайт»,

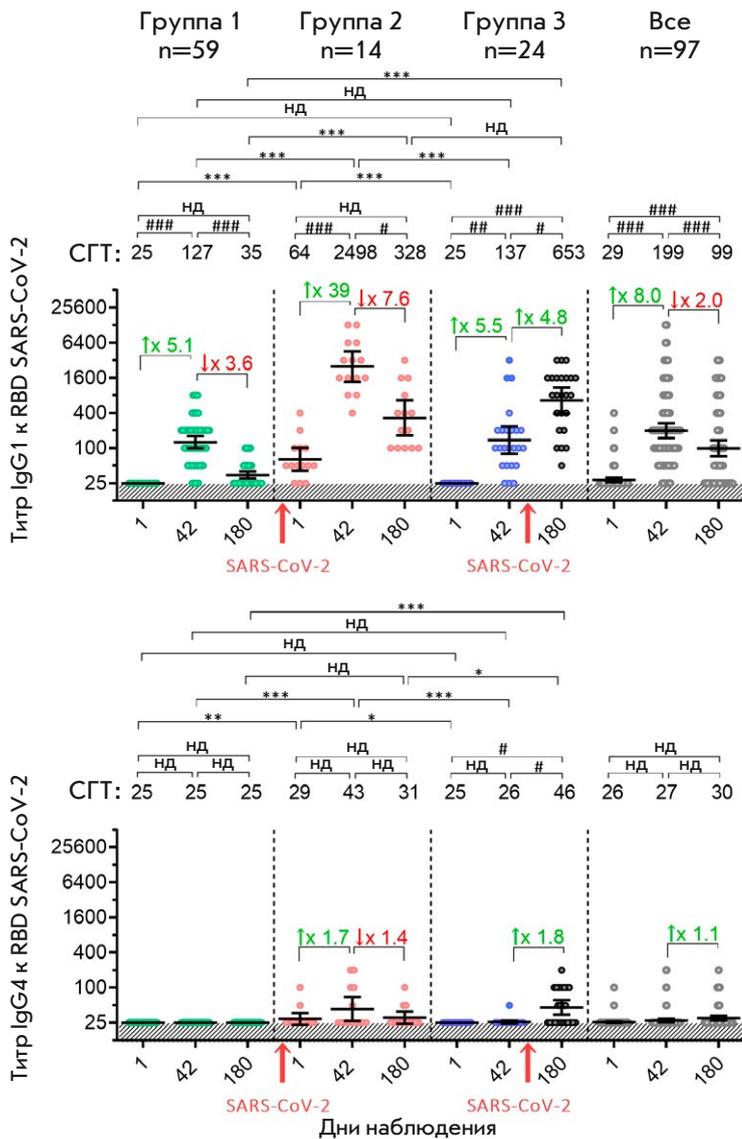
мы охарактеризовали изменение титра антител подтипов IgG1 и IgG4 в анализируемых группах, взяв образцы сыворотки в начале клинического исследования (день 1), на пике напряженности гуморального иммунитета в группе 1 (42 день) и на наиболее поздней точке наблюдения (180 день) (рис. 3). Выбор подтипов 1 и 4 IgG-антител определялся различиями в их функциях и прогностической значимости. IgG1 составляют основную долю в общем титре IgG-антител после вакцинации, они активно выполняют протективные функции: антителозависимую цитотоксичность, фагоцитоз, активацию комплемента и нейтрализацию вируса [11, 12]. В то же время у инфицированных SARS-CoV-2 наблюдается выраженный подъем титра низкофункциональных IgG4, что позволяет вирусу избегать протективных реакций адаптивного иммунитета [13]. Анализ титров IgG1-антител выявил сходную кинетику общих IgG-антител. Группа 1 с недетектируемыми значениями IgG1-антител в точке 1 день имела выражен-



**Рис. 2.** Титр RBD-специфичных IgG-антител у добровольцев, вакцинированных «Спутник Лайт». Приведены данные до (1 день) и на 42, 90, 180 дни после вакцинации для всех исследованных участников (серые точки), а также после стратификации в зависимости от наличия/отсутствия дополнительной иммунизации вследствие инфекции SARS-CoV-2: группа 1 – не инфицированные SARS-CoV-2 (зеленые точки); группа 2 – инфекция SARS-CoV-2 до вакцинации (красные точки); группа 3 – инфекция SARS-CoV-2 после вакцинации (синие точки). Черными точками обозначены инфицированные SARS-CoV-2 добровольцы в группе 3. Линии между точками связывают значения у одного и того же добровольца до заражения (42 день) и после (90 день). N – число добровольцев в каждой группе. Точки – индивидуальные данные. Горизонтальные линии представляют среднегеометрические титры (СГТ); значения приведены над графиком. Доля участников (%) с сероконверсией в разные временные точки определена как значимое увеличение титра антител в 4 раза и более в сравнении с уровнем до вакцинации (1 день). Т-образные линии ограничивают 95% доверительный интервал (ДИ). Цветные цифры и стрелки над квадратными скобками означают кратность увеличения или уменьшения СГТ в сравнении с предыдущей временной точкой. Под горизонтальной осью графика красными стрелками обозначен период инфицирования добровольцев вирусом SARS-CoV-2. Статистически значимые различия в результатах между разными временными точками внутри одной группы обозначены решетками: ##  $p < 0.005$ , ###  $p < 0.0001$  (критерий Фридмана с поправкой Данна). Статистически значимые различия между разными группами добровольцев обозначены звездочками: или \*\*\*  $p < 0.0001$  (критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна). нд – отсутствие статистической значимости

ный пик (СГТ 1 : 127) на 42 день после вакцинации с последующим снижением на 180 день (СГТ 1 : 35). Группа 2 имела сходную с группой 1 кривую IgG1-ответа с максимальным среди всех групп значением на 42 день (СГТ 1 : 2498) и дальнейшим падением

на 180 день (СГТ 1 : 328). В группе 3 наблюдался последовательный рост титра IgG1: с недетектируемых значений на 1 день титр IgG1 на 42 день вырос до близкого с группой 1 (СГТ 1:137), но на 180 день после получения гибридного иммунитета под-

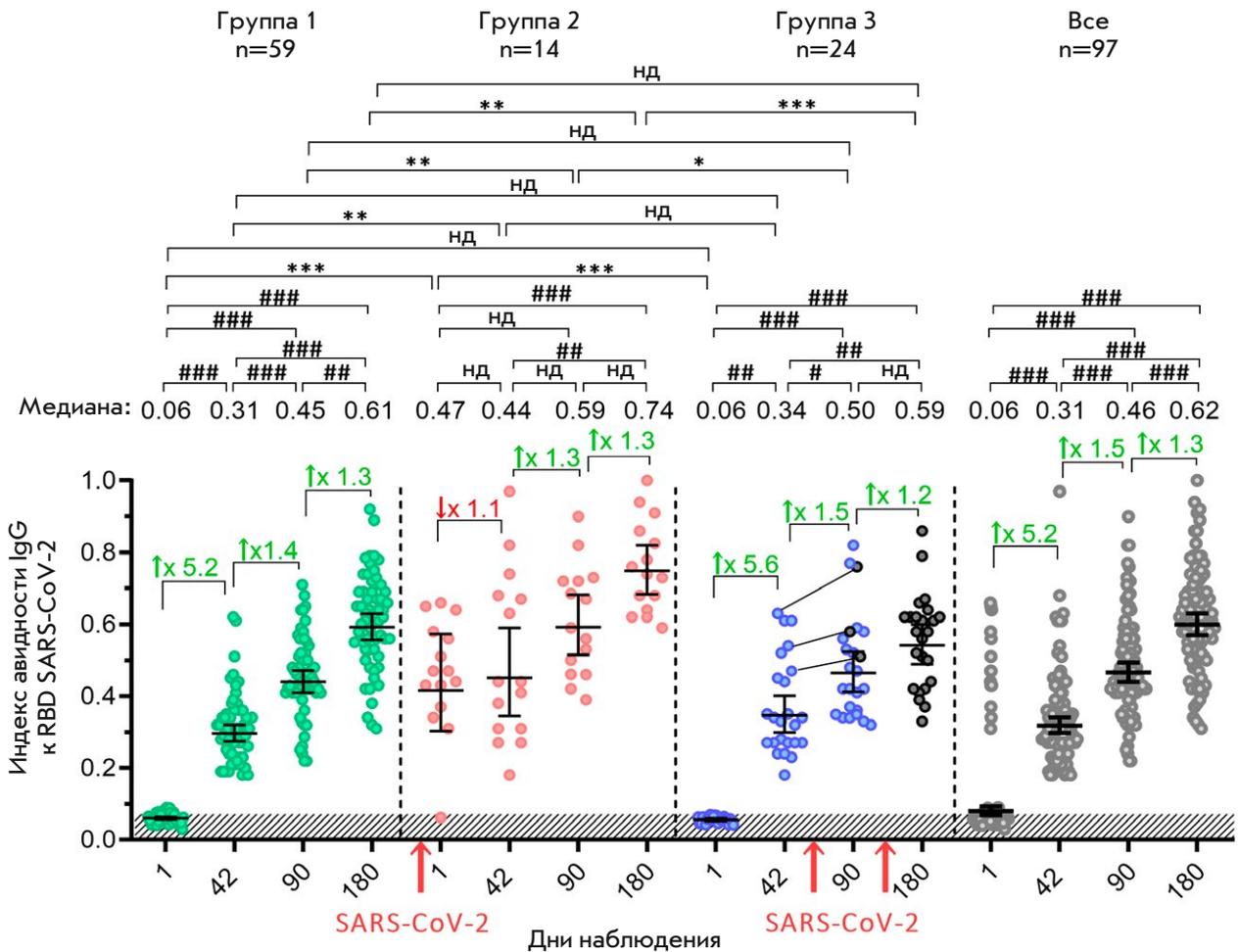


**Рис. 3.** Титр RBD-специфичных IgG1- и IgG4-антител у вакцинированных «Спутник Лайт» добровольцев. Приведены данные до (1 день) и на 42, 180 дни после вакцинации для всех исследованных участников (серые точки), а также после стратификации в зависимости от наличия/отсутствия дополнительной иммунизации вследствие инфекции SARS-CoV-2: группа 1 – не инфицированные SARS-CoV-2 (зеленые точки); группа 2 – инфекция SARS-CoV-2 до вакцинации (красные точки); группа 3 – инфекция SARS-CoV-2 после вакцинации (синие точки). Черными точками обозначены инфицированные SARS-CoV-2 добровольцы в группе 3. N – число добровольцев в каждой группе. Точки отражают индивидуальные данные. Горизонтальные линии представляют среднегеометрические титры (СГТ); значения приведены над графиком. Т-образные линии ограничивают 95% доверительный интервал (ДИ). Цветные цифры и стрелки над квадратными скобками означают кратность увеличения или уменьшения СГТ в сравнении с предыдущей временной точкой. Под горизонтальной осью графика красными стрелками обозначен период инфицирования добровольцев вирусом SARS-CoV-2. Статистически значимые различия в результатах между разными временными точками внутри одной группы обозначены решетками: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.005$ , ### $p < 0.0001$  (критерий Фридмана с поправкой Данна). Статистически значимые различия между разными группами добровольцев обозначены звездочками: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  или \*\*\* $p < 0.0001$  (критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна). нд – отсутствие статистической значимости

нимался до СГТ 1:653. В обобщенной выборке титры IgG1-антител на 42 (СГТ 1 : 199) и 180 (СГТ 1 : 99) дни были выше, чем в группе 1, что также показывает искажение данных при включении в анализируемую группу лиц с гибридным иммунитетом. Интерпретируя значения титров IgG4, стоит отметить отсутствие антител данного класса в группе 1. В то же время у лиц с гибридным иммунитетом (группы 2 и 3) IgG4 формировались, однако достоверное повышение наблюдалось только в группе 3 на 180 день исследования. Полученные результаты подтверждают выводы о способности SARS-CoV-2 формировать IgG4-антитела и характеризуют неспособность вакцины «Спутник Лайт» индуцировать повышение IgG4-антител после однократного применения.

**Динамика индекса avidности RBD-специфичных IgG-антител в сыворотке крови неинфицированных и инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев в поствакцинальный период**

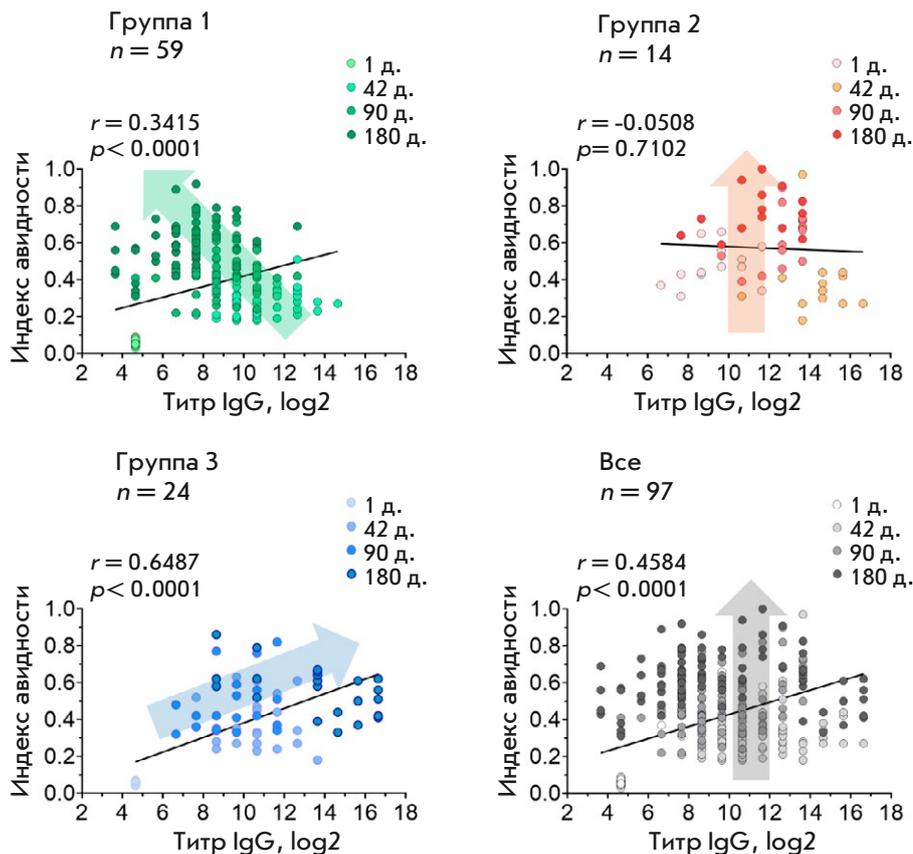
Определение avidности RBD-специфичных IgG-антител показало постепенное увеличение данного показателя в течение всего времени наблюдения в первой группе добровольцев с минимальных значений (0.06) на 1 день до 0.61 на 180 день (рис. 4). Добровольцы второй группы с предсуществующим иммунитетом характеризовались выраженными значениями avidности RBD-специфичных IgG-антител на 1 день (0.47), которые не показали подъема на 42 день, но выражено повышались, начиная с 90 дня, достигнув на 180 день более вы-



**Рис. 4.** Индекс avidности RBD-специфичных IgG-антител у вакцинированных «Спутник Лайт» добровольцев. Приведены данные до (1 день) и на 42, 90, 180 дни после вакцинации всех участников (серые точки), а также после стратификации в зависимости от наличия/отсутствия дополнительной иммунизации вследствие инфекции SARS-CoV-2: группа 1 – не инфицированные SARS-CoV-2 (зеленые точки); группа 2 – инфекция SARS-CoV-2 до вакцинации (красные точки); группа 3 – инфекция SARS-CoV-2 после вакцинации (синие точки). Черными точками обозначены инфицированные SARS-CoV-2 добровольцы в группе 3. Линии между точками связывают значения одного и того же добровольца до заражения (42 день) и после (90 день). N – число добровольцев в каждой группе. Точки отражают индивидуальные данные. Горизонтальные линии представляют среднегеометрические титры (СГТ); значения указаны черными цифрами над графиком. Т-образные линии ограничивают 95% доверительный интервал (ДИ). Цветные цифры и стрелки над квадратными скобками означают кратность увеличения или уменьшения медианного значения индекса avidности в сравнении с предыдущей временной точкой. Под горизонтальной осью графика красными стрелками обозначено время инфекции добровольцев вирусом SARS-CoV-2. Статистически значимые различия в результатах между разными временными точками внутри одной группы обозначены решетками: #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.005$ , ###  $p < 0.0001$  (критерий Фридмана с поправкой Данна). Статистически значимые различия между разными группами добровольцев обозначены звездочками: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  или \*\*\*  $p < 0.0001$  (критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна). нд – отсутствие статистической значимости

сокого значения по сравнению с первой группой (0.74). Добровольцы третьей и первой группы имели близкие значения avidности RBD-специфичных IgG-антител, несмотря на инфекцию SARS-CoV-2 в период с 42 до 180 дня наблюдения. Этот факт может свидетельствовать о недостаточности времени,

прошедшего от праймирующей иммунитет вакцинации до бустирующей коронавирусной инфекции [14]. Интересно, что при анализе всей выборки медиана индекса avidности антител не отличалась значительно от первой группы (в отличие от титров RBD-специфичных IgG-антител) в силу разновекторных



**Рис. 5.** Корреляционная зависимость титра и индекса avidности RBD-специфичных IgG-антител. На каждом графике представлены обобщенные данные до (1 день) и на 42, 90, 180 дни после вакцинации всех участников (серые точки), а также после стратификации в зависимости от наличия/отсутствия дополнительной иммунизации вследствие инфекции SARS-CoV-2: группа 1 – не инфицированные SARS-CoV-2 (зеленые точки); группа 2 – инфекция SARS-CoV-2 до вакцинации (красные точки); группа 3 – инфекция SARS-CoV-2 после вакцинации (синие точки). N – число добровольцев в каждой группе. Точки отражают индивидуальные данные. Интенсивность цвета отражает день исследования. Стрелки на каждом графике отражают общую тенденцию изменения показателей со временем. Для каждого графика приведено значение коэффициента корреляции Пирсона ( $r$ ) и уровень значимости ( $p$ ) после построения линейной линии тренда

изменений в группах 2 и 3. При этом общая выборка характеризовалась большим разбросом индивидуальных данных.

**Корреляционная зависимость титра и индекса avidности RBD-специфичных IgG-антител у инфицированных и не инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев в поствакцинальный период**

Определив изменение количественных (титр) и качественных (avidность) показателей антигенспецифичных антител у добровольцев после вакцинации «Спутник Лайт», мы провели корреляционный анализ в группах, маркировав время отбора крови (рис. 5). Было обнаружено, что взаимосвязь исследуемых параметров отличалась с учетом времени отбора крови во всех трех исследуемых группах. Так, в группе 1 в целом наблюдалась слабая корреляция между титром и индексом avidности RBD-специфичных IgG-антител ( $r = 0.34$ ); при этом важно отметить, что со временем индекс avidности сыворотки прогрессировал, в то время как титр антигенспецифичных антител снижался. Интересно, что у добровольцев с предсуществующим иммунитетом (группа 2) отсутствовала корреляция между титром антител и их avidностью ( $r = -0.05$ ,

$p = 0.7102$ ). По всей видимости, перенесенный добровольцами второй группой COVID-19, не вызывающий увеличения avidности антител, оказывает также негативное действие и в поствакцинальном периоде [15]. Повышение индекса avidности к 180 дню в группе 2 сопровождалось менее выраженным снижением титра антител по сравнению с группой 1. У добровольцев третьей группы, инфицированных SARS-CoV-2 после проведенной вакцинации, выявлена сильная корреляция между титром и индексом avidности RBD-специфичных IgG-антител ( $r = 0.65$ ), обусловленная одновременным повышением обоих показателей со временем, прошедшим с момента вакцинации. Стоит подчеркнуть, что инфекция SARS-CoV-2, а также время данного события относительно проведенной вакцинации, принципиально меняют прогрессию параметров гуморального иммунитета со временем. На общем фоне повышения avidности анти-RBD IgG-антител все три группы характеризовались различной динамикой титров анти-RBD IgG (отмечено стрелками на рис. 5). Анализ обобщенной выборки добровольцев показал результирующую умеренную корреляцию ( $r = 0.46$ ) между двумя параметрами, демонстрирующую увеличение avidности антител

без заметного изменения их титра с течением времени.

Таким образом, полученные данные показывают, что естественная иммунизация оказывает существенное влияние на напряженность гуморального иммунитета и его созревание во времени, искажая собственную иммуногенность исследуемого вакцинного препарата.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 создала целый ряд прецедентов для мировой науки и медицины. За короткое время был создан арсенал вакцин на основе различных платформ (мРНК, рекомбинантные вирусные векторы, инактивированные, субъединичные и др.), обеспечивающих эффективную защиту человека от развития тяжелых форм заболевания и смерти [16]. Новизна патогена и вакцинных препаратов требует продолжения исследований, направленных на детализацию иммунных реакций, играющих важную роль в формировании и сохранении протективного иммунитета у вакцинированных. В частности, полученные знания позволяют: 1) провести сравнительный анализ иммуногенности вакцин, созданных на различных платформах; 2) определить оптимальные интервалы ревакцинации различных групп населения, в том числе с учетом новых вариантов SARS-CoV-2; 3) своевременно адаптировать антигенный состав в вакцинных препаратах в соответствии с актуальными циркулирующими вариантами SARS-CoV-2; 4) определить, как изменяется сформированный иммунный ответ со временем после вакцинации; 5) определить особенности формируемого иммунитета у различных групп населения и многое др. Решение перечисленных задач осложняется продолжающимся активным присутствием SARS-CoV-2 в популяции человека. Необнаруженный контакт с патогеном может значительно изменить исследуемые параметры иммуногенности вакцинных препаратов [17]. В этих условиях определение иммуногенности вакцин в рамках клинических исследований, особенно с длительным периодом наблюдения, требует повышенной тщательности при анализе полученных результатов.

В настоящей работе мы представляем результаты определения иммуногенности вакцины «Спутник Лайт» до 180 дня наблюдения, полученные в рамках клинического исследования 1–2 фазы. По завершении клинического исследования мы дополнительно определили наличие IgG-антител против N-белка SARS-CoV-2 во всех исследуемых временных точках, выделив группу добровольцев, не инфицированных SARS-CoV-2 как до вакцинации, так и на всем протяжении исследования (группа 1),

а также инфицированных до (группа 2) или после вакцинации (группа 3). Важно отметить, что на момент начала исследования (17 июня 2020 года) SARS-CoV-2 был инфицирован небольшой процент (около 0.5%) населения России, что в нашем исследовании выразилось в виде преобладания доли неинфицированных добровольцев (группа 1) относительно количества всех участников (60%) [18]. Таким образом, примененные критерии и объем выборки позволяют с использованием методов статистического анализа определить результаты собственной иммуногенности вакцины «Спутник Лайт».

Зарегистрированное в нашей работе значимое падение титра RBD-специфических антител в группе 1 к 180 дню исследования, по всей видимости, отражает объективную кинетику антительного ответа после однократного введения вакцин на основе Ad26-S, наблюдаемую также другими авторами [3, 19]. Показанные в других работах титры антигенсвязывающих антител, сохраняющиеся после однократной вакцинации Ad26.COVS.2 на поздних сроках, могут быть результатом влияния дополнительных стимулов [20, 21]. Так, например, резкое повышение титров анти-RBD IgG относительно медленно снижающегося общего уровня было наглядно продемонстрировано у инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев после вакцинации Ad26.COVS.2 [4]. Таким образом, отсутствие тщательной селекции добровольцев при анализе иммуногенности вакцин против SARS-CoV-2 может привести к существенному завышению исследуемых показателей.

Нами, как и рядом других авторов, показано, что лица с гибридным иммунитетом (группы 2 и 3) отличаются достоверно большими титрами антигенсвязывающих антител по сравнению с вакцинированными добровольцами, не контактировавшими с SARS-CoV-2 [22]. В условиях постоянного контакта населения с SARS-CoV-2 вакцина «Спутник Лайт» показывает себя в качестве эффективного средства для праймирования, а затем и для поддержания напряженности иммунитета у перенесших COVID-19 лиц. Кроме того, прайм-буст-ревакцинация не имеет преимуществ в иммуногенности перед однократным введением вакцины [23].

Динамика титров антигенсвязывающих антител у добровольцев с гибридным иммунитетом указывает на важность момента инфицирования SARS-CoV-2. Так, в группе добровольцев (группа 2), инфицированных до вакцинации (согласно титрам антител против N и S на 1 день), титр анти-RBD IgG резко повысился с 594 на 1 день до 19985 уже на 42 день (в 34 раза). Добровольцы группы 3, инфицированные после вакцинации, показали менее выраженный подъем титра анти-RBD IgG между

90 и 180 днями (в 18 раз). Полученные результаты указывают на то, что интервал и/или очередность вакцинации и инфекции играют существенную роль в напряженности гуморального иммунитета. Действительно, ряд исследований подтверждает, что эффективность бустрирующего стимула растет с увеличением времени между иммунизациями [6, 24]. Однако внесение дополнительной третьей вакцинации в промежуток между первой и последней не приводит к значимому повышению напряженности иммунитета [25]. Влияние очередности инфекции и вакцинации на напряженность иммунитета до настоящего момента не была детально определена. Проведение клинических исследований иммуногенности SARS-CoV-2-вакцин, в которых лабораторными методами (ПЦР-тесты) подтверждалось точное время инфицирования SARS-CoV-2 добровольцев до или после вакцинации, позволило бы получить более убедительные данные.

Проведенный анализ подтипов IgG-антител показал, что у добровольцев, однократно вакцинированных «Спутник Лайт», отсутствуют IgG4-антитела до 180 дня наблюдения, тогда как у лиц с гибридным иммунитетом, особенно в группе 3, антитела данного подкласса детектируются. Это свойство определяет отличие в противокоронавирусном иммунитете, формируемом в ответ на вакцинацию и инфекцию SARS-CoV-2. Интересно отметить, что многократная иммунизация мРНК вакцинами (BNT162b2 и mRNA-1273) способна приводить к формированию IgG4-антител в отличие от применения вакцины AZD1222, полученной на основе аденовируса обезьян [26]. В этой связи представляется важным определить, распространяется ли обнаруженный эффект на вакцины, созданные на основе других аденовирусных платформ. Анализ титров IgG4 у добровольцев, прошедших курс многократной иммунизации «Спутник Лайт» или «Спутник V», позволил бы получить ответ.

Авидность антител является важным индикатором созревания противоинфекционного иммунитета. Рост авидности антител связан с появлением в результате соматической гипермутации В-лимфоцитов с более аффинными антителами в том случае, если презентация антигена достаточна по длительности и интенсивности [27]. Известно, что инфекция SARS-CoV-2 приводит к слабому повышению авид-

ности антигенсвязывающих антител [28]. В то же время в данной работе показано, что однократная вакцинация «Спутник Лайт» вызывает выраженный подъем индекса авидности после иммунизации.

Наравне с повышением напряженности гуморального поствакцинального иммунитета, инфекция SARS-CoV-2 существенно влияет также и на его созревание. В соответствии с ранее опубликованными результатами, гибридный иммунитет у лиц, инфицированных SARS-CoV-2 задолго до вакцинации, характеризуется более высоким индексом авидности по сравнению с вакцинированными добровольцами [29]. Однако если инфекция SARS-CoV-2 происходит вскоре после проведенной вакцинации (группа 3), то созревание сыворотки замедляется. Этот феномен можно объяснить включением новых клонов наивных В-клеток в пролиферативный ответ после инфицирования (с увеличением титров антиген-специфичных антител), что уменьшает вклад в общий индекс авидности высокоаффинных В-клеток, уже прошедших этап соматической гипермутации (рис. 4). Данное предположение находит отражение в отличающихся корреляционных зависимостях титра и индекса авидности RBD-специфичных IgG-антител между группами добровольцев.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа впервые демонстрирует «собственную» иммуногенность вакцины «Спутник Лайт» на протяжении 180 дней наблюдения в рамках клинического исследования, а также определяет влияние предшествующей и последующей инфекции SARS-CoV-2 на параметры гуморального поствакцинального иммунитета. Полученные результаты более точно характеризуют иммуногенные свойства вакцины «Спутник Лайт», используемой в клинической практике с 2020 года. ●

*Проведение клинического исследования финансировалось из средств Российского фонда прямых инвестиций. Дополнительные исследования (определение авидности анти-RBD IgG-антител, IgG-антител против N-белка SARS-CoV-2 на всех визитах добровольцев) финансировались также из средств ПАО «Сбербанк России» (грант № 682), ООО «Вакцина человека».*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – March 2020 // официальный сайт Всемирной организации здравоохранения. 2020. [электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-21-august-2020> (дата обращения: 25.09.2024).
2. «COVID19 Vaccine Tracker» // «COVID19 Vaccine Tracker» (США). 2022. [электронный ресурс] URL: <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/approved/> (дата обращения: 25.09.2024).

3. Collier A.Y., Yu J., McMahan K., Liu J., Chandrashekar A., Maron J.S., Atyeo C., Martinez D.R., Ansel J.L., Aguayo R., Rowe M., Jacob-Dolan C., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 385. № 21. P. 2010–2012. doi:10.1056/NEJMc2115596
4. Barouch D.H., Stephenson K.E., Sadoff J., Yu J., Chang A., Gebre M., McMahan K., Liu J., Chandrashekar A., Patel S., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 385. № 10. P. 951–953. doi: 10.1056/NEJMc2108829
5. Cho A., Muecksch F., Wang Z., Ben Tanfous T., DaSilva J., Raspe R., Johnson B., Bednarski E., Ramos V., Schaefer-Babajew D., et al. // *J. Exp. Med.* 2022. V. 219. № 8. P. e20220732. doi: 10.1084/jem.20220732
6. Bates T.A., Leier H.C., McBride S.K., Schoen D., Lyski Z.L., Lee D.X., Messer W.B., Curlin M.E., Tafesse F.G. // *JCI Insight.* 2023. V. 8. № 5. P. e165265. doi: 10.1172/jci.insight.165265
7. Edelstein M., Wiegler Beiruti K., Ben-Amram H., Beer N., Sussan C., Batya P., Zarka S., Abu Jabal K. // *Int. J. Infect. Dis.* 2023. V. 135. P. 57–62. doi: 10.1016/j.ijid.2023.08.009
8. Wu N., Joyal-Desmarais K., Ribeiro P.A.B., Vieira A.M., Stojanovic J., Sanuade C., Yip D., Bacon S.L. // *Lancet. Respir. Med.* 2023. V. 11. P. 439–452. doi: 10.1016/S2213-2600(23)00015-2
9. Tukhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., et al. // *Lancet Reg. Health Eur.* 2021. V. 11. P. 100241. doi: 10.1016/j.lanepe.2021.100241
10. Nurmi V., Hedman L., Perdomo M.F., Weseslindtner L., Hedman K. // *Int. J. Infect. Dis.* 2021. V. 110. P. 479–487. doi: 10.1016/j.ijid.2021.05.047
11. Klingler J., Weiss S., Itri V., Liu X., Oguntuyo K.Y., Stevens C., Ikegame S., Hung C.T., Enyindah-Asonye G., Amanat F. // *J. Infect. Dis.* 2021. V. 223. P. 957–970. doi: 10.1093/infdis/jiaa784
12. Lapuente D., Winkler T.H., Tenbusch M. // *Cell Mol. Immunol.* 2024. V. 21. P. 144–158. doi: 10.1038/s41423-023-01095-w
13. Rubio-Casillas A., Redwan E.M., Uversky V.N. // *Biomolecules.* 2023. V. 13. P. 1338. doi: 10.3390/biom13091338
14. Tazuin A., Gong S.Y., Beaudoin-Bussièrès G., Vézina D., Gasser R., Nault L., Marchitto L., Benlarbi M., Chatterjee D., Nayrac M., Laumaea A., et al. // *Cell Host Microbe.* 2022. V. 30. № 1. P. 97–109. doi: 10.1016/j.chom.2021.12.004
15. Chia W.N., Zhu F., Ong S.W.X., Young B.E., Fong S.W., Le Bert N., Tan C.W., Tiu C., Zhang J., Tan S.Y., et al. // *Lancet Microbe.* 2021. V. 2. № 6. P. e240–e249. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00025-2
16. Rahman M.M., Masum M.H.U., Wajed S., Talukder A. // *Virusdisease.* 2022. V. 33. № 1. P. 1–22. doi: 10.1007/s13337-022-00755-1
17. Bates T.A., McBride S.K., Leier H.C., Guzman G., Lyski Z.L., Schoen D., Winders B., Lee J.Y., Lee D.X., Messer W.B., et al. // *Sci. Immunol.* 2022. V. 7. № 68. P. eabn8014. doi: 10.1126/sciimmunol.abn8014
18. Mathieu E., Ritchie H., Rodés-Guirao L., Appel C., Giattino C., Hasell J., Macdonald B., Dattani S., Beltekian D., Ortiz-Ospina E., et al. // *Our World in Data (Великобритания).* 2020. [электронный ресурс] URL: <https://ourworldindata.org/covid-deaths> (дата обращения: 25.09.2024).
19. Sheikh-Mohamed S., Isho B., Chao G.Y.C., Zuo M., Cohen C., Lustig Y., Nahass G.R., Salomon-Shulman R.E., Blacker G., Fazel-Zarandi M., et al. // *Mucosal. Immunol.* 2022. V. 15. № 5. P. 799–808. doi: 10.1038/s41385-022-00511-0
20. Liu J., Chandrashekar A., Sellers D., Barrett J., Jacob-Dolan C., Lifton M., McMahan K., Sciacca M., VanWyk H., Wu C., et al. // *Nature.* 2022. V. 603. № 7901. P. 493–496. doi: 10.1038/s41586-022-04465-y
21. Sadoff J., Le Gars M., Brandenburg B., Cárdenas V., Shukarev G., Vaissiere N., Heerwegh D., Truyers C., de Groot A.M., Jongeneelen M., et al. // *Vaccine.* 2022. V. 40. № 32. P. 4403–4411. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.05.047
22. Andreano E., Paciello I., Piccini G., Manganaro N., Pileri P., Hyseni I., Leonardi M., Pantano E., Abbiento V., Benincasa L., et al. // *Nature.* 2021. V. 600. № 7889. P. 530–535. doi: 10.1038/s41586-021-04117-7
23. Focosi D., Baj A., Maggi F. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021. V. 17. № 9. P. 2959–2961. doi: 10.1080/21645515.2021.1917238
24. Le Gars M., Hendriks J., Sadoff J., Ryser M., Struyf F., Douoguih M., Schuitemaker H. // *Immunol. Rev.* 2022. V. 310. № 1. P. 47–60. doi: 10.1111/imr.13088
25. Cárdenas V., Le Gars M., Truyers C., Ruiz-Guiñazú J., Struyf F., Colfer A., Bonten M., Borobia A., Reisinger E.C., Kamberling I.M.C., et al. // *Vaccine.* 2024. V. 42. № 16. P. 3536–3546. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.04.059
26. Buhre J.S., Pongracz T., Künsting I., Lixenfeld A.S., Wang W., Nouta J., Lehrian S., Schmelter F., Lunding H.B., Dühring L. // *Front. Immunol.* 2023. V. 13. P. 1020844. doi: 10.3389/fimmu.2022.1020844
27. Victora G.D., Nussenzweig M.C. // *Annu. Rev. Immunol.* 2022. V. 40. P. 413–442. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075032
28. Struck F., Schreiner P., Staschik E., Wochinz-Richter K., Schulz S., Soutschek E., Motz M., Bauer G. // *J. Med. Virol.* 2021. V. 93. № 12. P. 6765–6777. doi: 10.1002/jmv.27270
29. Bellusci L., Grubbs G., Zahra F.T., Forgacs D., Golding H., Ross T.M., Khurana S. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 4617. doi: 10.1038/s41467-022-32298-w

УДК 577.29

# Изменение экспрессии генов пробелокконвертаз в плоскоклеточных карциномах пищевода человека

А. А. Комиссаров<sup>1</sup>, М. В. Зиновьева<sup>2</sup>, А. В. Сасс<sup>2</sup>, Т. В. Виноградова<sup>2</sup>, С. И. Кошечкин<sup>1</sup>, В. В. Демкин<sup>1</sup>, И. Б. Зборовская<sup>3</sup>, С. В. Костров<sup>1</sup>, И. В. Демидюк<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182 Россия

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

\*E-mail: [ilyaduk@yandex.ru](mailto:ilyaduk@yandex.ru)

Поступила в редакцию 28.05.2024

Принята к печати 07.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27437

**РЕФЕРАТ** Пробелокконвертазы (ПБК) – это семейство белков, включающее девять высокоспецифичных субтилизинподобных сериновых эндопептидаз человека. Известно, что уровни мРНК генов ПБК изменяются в опухолях, а сами ферменты участвуют в канцерогенезе, что позволяет рассматривать их как потенциальные маркеры для типирования и прогнозирования течения заболевания, а также как потенциальные терапевтические мишени. С использованием количественной ПЦР в реальном времени проанализированы уровни экспрессии генов ПБК в парных образцах опухолевой и окружающей нормальной ткани, полученных от 19 пациентов с диагнозом плоскоклеточная карцинома пищевода. Обнаружено достоверное повышение представленности мРНК генов *PCSK6*, *PCSK9*, *MBTPS1* и *FURIN* в опухолевой ткани, что может указывать на вовлеченность данных ПБК в формирование и прогрессию злокачественных новообразований пищевода. С использованием кластерного анализа паттернов изменений экспрессии генов ПБК в опухолевой ткани по сравнению с окружающей нормальной (образцы пищевода и ранее проанализированные образцы легкого) было установлено, что эти изменения имеют ограниченный набор сценариев. Такие сценарии реализуются при злокачественной трансформации как клеток легкого, так и пищевода, а также, возможно, клеток других органов. Полученные данные указывают на то, что гены ПБК могут быть важными маркерами онкологических заболеваний человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** пробелокконвертаза, сериновая протеаза, рак, экспрессия генов, количественная ПЦР. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** IGF-1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (insulin-like growth factor 1 receptor); ПБК – пробелокконвертазы.

## ВВЕДЕНИЕ

Пробелокконвертазы (ПБК) – семейство высокоспецифичных субтилизинподобных сериновых эндопептидаз млекопитающих, ключевой функцией которых является процессинг различных белков и пептидов [1, 2]. У человека идентифицировано девять генов ПБК, эндогенными субстратами этих протеаз являются многочисленные белки и пептиды, в том числе предшественники нейропептидов, пептидные гормоны, факторы роста и дифференцировки, рецепторы и ферменты. Как следствие, ПБК регулируют широкий круг физиологических процессов как в норме, так и при патологиях. В частности, накоплены обширные данные об ассоциации ПБК с возникновением и развитием онкологических заболеваний.

Среди субстратов ПБК обнаружен целый ряд белков, вовлеченных в прогрессию злокачественных опухолей: цитокины, факторы роста и их рецепторы, матриксные металлопротеиназы, молекулы адгезии (подробно обсуждается в [3–5]). Существует достаточно большой объем информации, указывающей на принципиальную роль ПБК в прогрессии и метастазировании опухолей, а также на связь уровней экспрессии ПБК с выживаемостью пациентов [6–12]. Все это позволяет предположить, что данные об уровнях экспрессии генов ПБК могут быть использованы для типирования и прогнозирования течения онкологических заболеваний, а сами ПБК могут служить терапевтическими мишенями для терапии.

Ранее методом количественной ПЦР мы показали, что экспрессия генов ПБК в злокачественных опухолях легкого человека изменена по сравнению с окружающей нормальной тканью. При этом мы впервые обнаружили, что изменение экспрессии происходит по ограниченному числу сценариев: 80% проанализированных образцов распределялись по трем группам, в каждой из которых была значительно изменена экспрессия одного из трех генов – *FURIN*, *PCSK1* или *PCSK6* (здесь и далее использовали символы генов, представленные в рекомендациях комитета по номенклатуре генов человека HGNC, <https://www.genenames.org>, табл. 1). Мы не нашли корреляций между выявленными группами и доступными клиническими данными пациентов [13]. Тем не менее, полученные данные могут указывать на существование неустановленных свойств опухолей легкого человека, ассоциированных с одним из трех выявленных сценариев изменения экспрессии генов ПБК.

В настоящей работе мы провели аналогичное описанному выше исследование злокачественных опухолей пищевода. Методом ПЦР в реальном времени были проанализированы уровни мРНК в опухолевой ткани и окружающей ткани без признаков патологии в образцах, полученных от 19 пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак пищевода. Обнаружено значительное повышение экспрессии генов *PCSK6*, *PCSK9*, *MBTPS1* и *FURIN* в опухолевой ткани, что потенциально может указывать на вовлеченность данных ПБК в процессы формирования и прогрессии злокачественных новообразований пищевода. Также мы провели кластерный анализ паттернов изменения экспрессии генов ПБК в образцах рака пищевода и ранее проанализированных образцах рака легкого. В результате был выявлен ограниченный набор сценариев изменения экспрессии генов ПБК при злокачественной трансформации клеток легкого и пищевода, а также, вероятно, клеток других органов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Забор образцов проводили в соответствии с федеральным законом № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах» (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 11.08.2017 № 517н, приложение 2). Протокол исследования был утвержден этическим комитетом Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина).

Образцы опухолевых и прилегающих нормальных тканей пищевода были получены при проведении

хирургических операций пациентов с плоскоклеточной карциномой пищевода (стадии II–III). Пациенты наблюдались в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. От каждого пациента получены письменные информированные согласия. До хирургического вмешательства пациентов не подвергали химио- и радиотерапии. Часть материала из полученных образцов замораживали в жидком азоте для последующего выделения РНК, остальную часть образцов подвергали гистологической верификации в Отделе патологической анатомии опухолей человека НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и характеризовали в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза [14]. Все образцы тканей злокачественных опухолей по результатам гистологического исследования содержали не менее 70–80% опухолевых клеток. Для получения контрольных образцов («условная норма») в ходе операции у каждого пациента брали образцы ткани пораженного органа вне зоны патологического роста.

Суммарную РНК выделяли из замороженных и измельченных в жидком азоте образцов нормальных и опухолевых тканей. Очистку РНК проводили с использованием гуанидинизотиоцианата и фенола [15], а затем с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя, после чего обрабатывали ДНКазой I (Promega, США). Концентрацию выделенной РНК определяли по поглощению при 260 нм. Синтез первых цепей кДНК проводили, используя гексануклеотидный праймер (Promega) и обратную транскриптазу Powerscript (Clontech, США).

Количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, США) с использованием коммерческих наборов праймеров и зондов (Applied Biosystems, США) (табл. 1). Программа ПЦР: 2 мин – 50°C; 10 мин – 95°C; далее 40 циклов: 15 с – 95°C, 60 с – 60°C. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл (6 мкл деионизованной воды, 4 мкл готовой смеси реагентов для ПЦР 5X qPCRmix-HS («Евроген», Россия), 5 мкл раствора праймеров и зондов, 5 мкл образца). Каждый образец анализировали в двух независимых повторях в дубликатах. Обработку результатов ПЦР и определение порогового цикла *Ct* осуществляли с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США).

Уровни мРНК генов ПБК нормировали по уровням мРНК референсного гена *GAPDH* по формуле:

$$\text{нормированная\_экспрессия\_гена\_ПБК} = 2^{Ct(GAPDH) - Ct(ПБК)}$$

В тех случаях, когда экспрессия гена ПБК детектировалась только в опухолевой или нормальной ткани,

Таблица 1. Гены и наборы для ПЦР, использованные в работе

Белок	Ген, символ по HGNC*	Альтернативные обозначения белка	Набор для детекции мРНК гена
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 (Пробелокконвертаза субтилизин-кексинового типа 1)	<i>PCSK1</i>	PC1/3, NEC1	Rn00567266_m1
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 2 (Пробелокконвертаза субтилизин-кексинового типа 2)	<i>PCSK2</i>	PC2, NEC2	Rn00562543_m1
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 (Пробелокконвертаза субтилизин-кексинового типа 4)	<i>PCSK4</i>	PC4	Rn00592006_m1
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 (Пробелокконвертаза субтилизин-кексинового типа 5)	<i>PCSK5</i>	PC5/6	Rn01450819_m1
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 (Пробелокконвертаза субтилизин-кексинового типа 6)	<i>PCSK6</i>	PACE4, SPC4	Rn00564475_m1
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 (Пробелокконвертаза субтилизин-кексинового типа 7)	<i>PCSK7</i>	PC7	Rn00570376_m1
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (Пробелокконвертаза субтилизин-кексинового типа 9)	<i>PCSK9</i>	PC9, NARC-1	Rn01416753_m1
Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1 (Связанная с мембраной протеаза сайта-1 фактора транскрипции)	<i>MBTPS1</i>	SKI-1/S1P	Rn00585707_m1
Furin (Фурин)	<i>FURIN</i>	PACE	Rn00570970_m1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа)	<i>GAPDH</i>	G3PD	Rn01775763_g1

\*HGNC – комитет по номенклатуре генов человека, <https://www.genenames.org>

для расчета нормированной экспрессии гена значение Ct в отсутствующем образце принимали за 42.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью языка программирования R (R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>) и программного обеспечения RStudio (Posit team (2023). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>). Разницу в уровнях экспрессии генов ПБК определяли с помощью парного критерия Уилкоксона. Кластерный анализ образцов выполняли методом Уорда с использованием Евклидова расстояния в качестве меры различия.

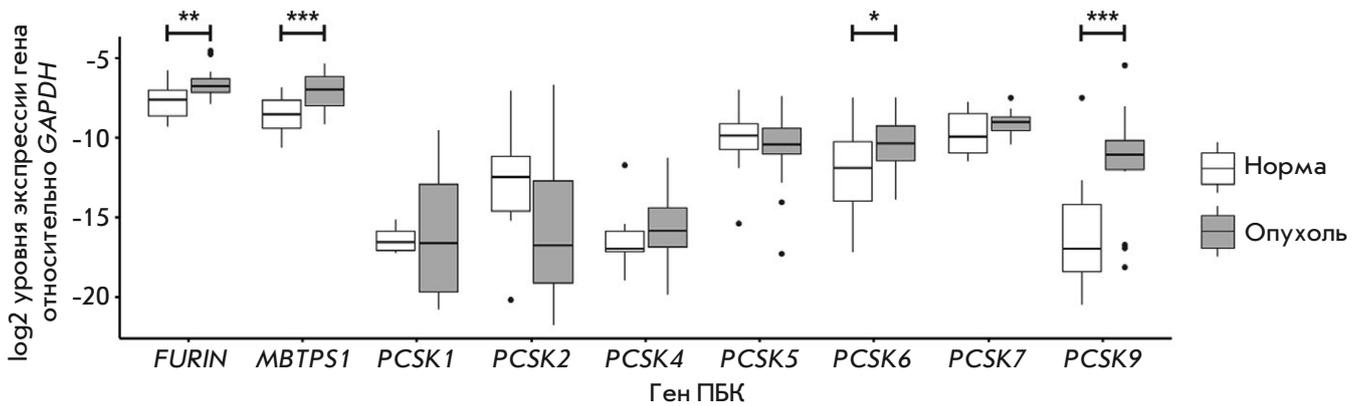
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе методом количественной ПЦР в реальном времени проанализировали представленность мРНК всех девяти генов пробелокконвертаз (ПБК) в 19 парах образцов злокачественных опухолей пищевода человека и окружающей ткани без признаков патологии (рис. 1, Приложение табл. П1). Как и ожидалось, экспрессию генов *FURIN*, *PCSK5*, *PCSK6*, *PCSK7* и *MBTPS1*, кодирующих убиквитарные ферменты, мы обнаружили во всех или в подавляющем большинстве образцов как опухолевой, так и нормальной ткани. Экспрессия же генов *PCSK1*, *PCSK2*, *PCSK4* и *PCSK9* считается тканеспецифичной и нехарак-

терной для тканей пищевода [16–18]. Действительно, мРНК *PCSK1* выявлена лишь в двух образцах опухолевой и двух образцах нормальной ткани, а мРНК *PCSK4* – в четырех образцах опухолевой и двух образцах нормальной ткани. В то же время экспрессия гена *PCSK2*, обычно наблюдаемая в нейроэндокринных клетках, показана нами в пяти образцах опухолевой и 11 образцах нормальной ткани. Причины отклонения паттерна экспрессии гена *PCSK2* от общепринятого в тканях пищевода неясны. Также мы детектировали экспрессию гена *PCSK9*, которая в норме наблюдается преимущественно в клетках печени, почек, мозжечка и тонкого кишечника, в 15 образцах опухолевой и 9 образцах нормальной ткани пищевода. Такой результат, однако, не является неожиданным, поскольку экспрессию *PCSK9* в опухолях пищевода обнаруживали и ранее [19]. Возможные причины этого феномена будут обсуждены ниже.

Сравнение уровней экспрессии генов ПБК позволило установить, что экспрессия генов *PCSK6*, *PCSK9*, *MBTPS1* и *FURIN* в ткани опухоли пищевода статистически значимо выше, чем в окружающей опухоль нормальной ткани (рис. 2). При этом наиболее значительным было повышение экспрессии генов *PCSK9* и *PCSK6* – в среднем примерно в 175 и 10 раз соответственно. Повышение экспрессии генов *MBTPS1* и *FURIN* было менее выражено и составляло в среднем примерно 4 и 3 раза. Значительное повышение экспрессии *PCSK9*





**Рис. 2.** Экспрессия генов ПБК в нормальных и опухолевых тканях пищевода. Уровни мРНК генов ПБК определяли с помощью ПЦР в реальном времени как указано в «Экспериментальной части», после чего нормировали по уровню мРНК референсного гена *GAPDH*. Статистическую значимость различий в относительных уровнях мРНК генов ПБК в опухолевой и окружающей нормальной ткани оценивали с помощью парного критерия Уилкоксона. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

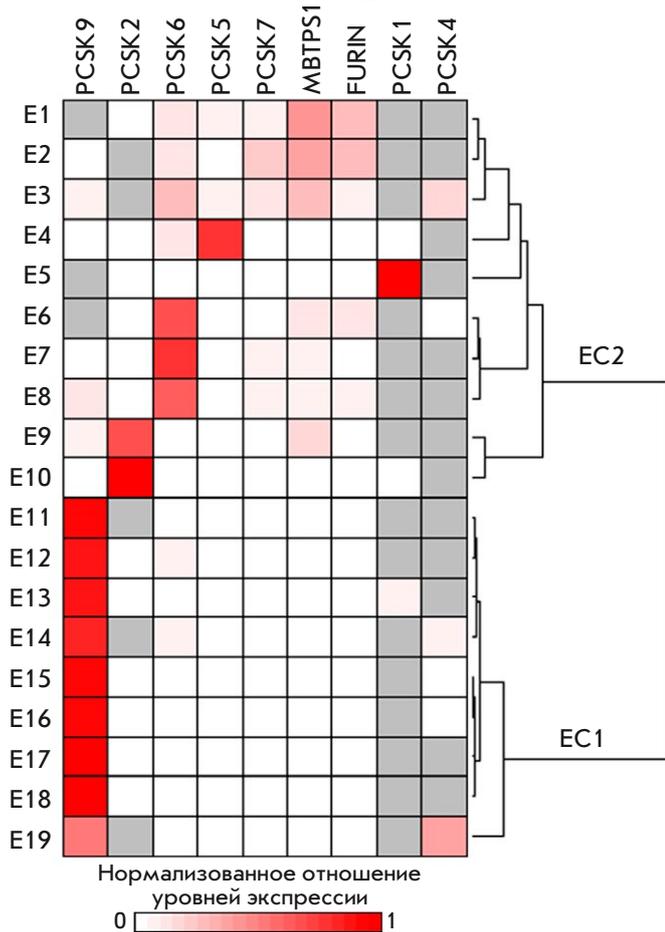
личаются от выявленных нами в опухолях легкого [13]. Так, в опухолях пищевода отсутствуют кластеры с преобладающим изменением экспрессии генов *FURIN* и *PCSK1*, в которые входило большинство образцов опухолей легкого (18 из 30, 60%). А в опухолях легкого отсутствует наиболее представленный в опухолях пищевода кластер с преобладающим изменением экспрессии гена *PCSK9*. При этом образцы с измененной экспрессией гена *PCSK6* выявляются в обеих нозологиях. Полученные данные указывают на то, что паттерны изменения экспрессии генов ПБК в опухолевой ткани по сравнению с окружающей ее нормальной тканью различаются между разными типами опухолей, однако в каждом конкретном случае выявляется ограниченный набор сценариев изменения экспрессии генов ПБК.

В результате изучения функций ПБК, в том числе с использованием грызунов с нокаутом генов, установлено, что большинство ферментов этой группы имеют перекрывающуюся субстратную специфичность. Показано, что *PCSK1* и *PCSK2* могут действовать на общие субстраты, а субстратная специфичность белков *FURIN*, *PCSK5*, *PCSK6* и *PCSK7* перекрывается настолько, что они могут частично компенсировать отсутствие друг друга в тканях [32, 33]. В то же время ферменты *PCSK4*, *PCSK9* и *MBTPS1* действуют на узкий спектр достаточно специфичных субстратов. В этой связи функционирование шести ПБК – *PCSK1*, *PCSK2*, *PCSK5*, *PCSK6*, *PCSK7* и *FURIN* – потенциально можно рассматривать как единую процессирующую систему. Кластерный анализ паттернов изменения экспрессии генов этих шести ПБК на общей выборке опухолей легкого и пищевода выявил четыре группы образцов (рис. 4). Три группы включали в себя почти три четверти образцов ( $n = 36$ , 73.5%) и характеризовались преобладающим изменением экспрессии одного

гена ПБК – *PCSK6*, *PCSK1* или *FURIN* (группы соответствуют кластерам С1, С2 и С3 на рис. 4). Группа С3 состояла исключительно из образцов опухолей легкого, в то время как в С1 и С2 входили образцы обеих нозологий. Четвертая группа, соответствующая кластеру С4 на рис. 4, была более гетерогенной и включала в себя оставшуюся четверть образцов ( $n = 13$ , 26.5%). В этой группе можно выделить три подгруппы, две из которых включают пять образцов со значительно измененной экспрессией генов *PCSK2* или *PCSK5*. Однако большинство образцов (8 из 13) составляют третью подгруппу, которая характеризовалась одновременным повышением экспрессии генов *PCSK6*, *PCSK7* и *FURIN* на фоне отсутствия экспрессии *PCSK1*.

Мы не обнаружили статистически значимых корреляций между выявленными группами образцов и доступными нам клиническими данными пациентов. Для выявления таких корреляций необходимо более подробное исследование на расширенной выборке образцов, вероятно, разных нозологий, включающее анализ дополнительных клинических характеристик, в частности, резистентности пациентов к лекарственным препаратам, частоты рецидивов и выживаемости пациентов. Тем не менее, полученные данные могут указывать на существование ограниченного количества сценариев изменения экспрессии генов ПБК при злокачественной трансформации клеток и формировании опухолей легкого и пищевода, а также, возможно, опухолей других нозологий.

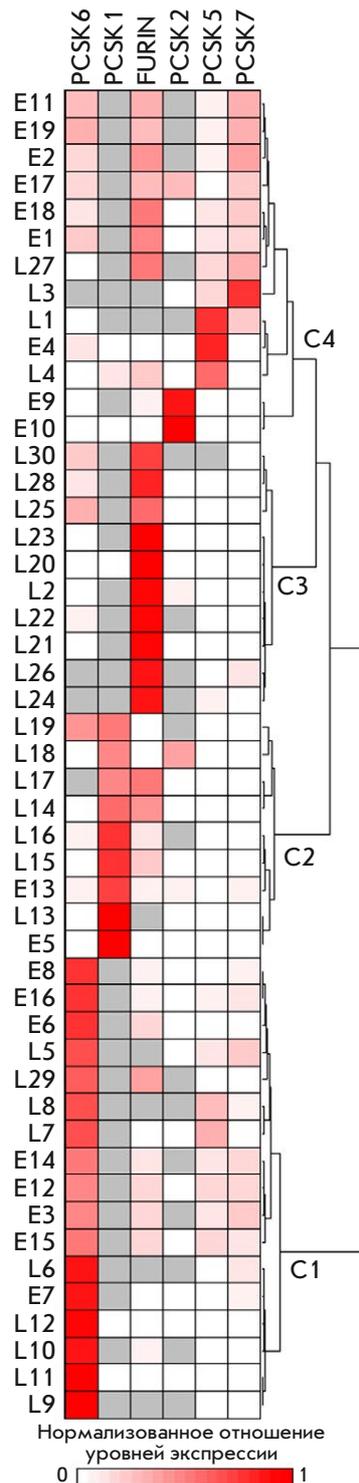
К сожалению, имеющаяся на сегодняшний день информация позволяет лишь предположить природу различий между выявленными группами образцов. Например, высокая экспрессия гена *PCSK6* в группе С1 может указывать на активную перестройку опухолевого микроокружения и тем самым коррелировать с инвазивностью и/или метастатической ак-



**Рис. 3.** Анализ паттернов изменения экспрессии генов ПБК при раке пищевода. Отношения уровней мРНК генов ПБК в опухолевой ткани пищевода и в окружающей нормальной ткани были нормированы в каждом образце и представлены как доля от единицы на тепловой карте. Серым обозначены образцы, в которых мРНК гена не детектировалась ни в опухолевой, ни в нормальной ткани. Нормированные данные были кластеризованы как указано в разделе «Экспериментальная часть», дендрограмма показывает расстояния между образцами. Выявленные кластеры обозначены как EC1 и EC2

тивностью опухоли [25, 26]. Увеличенная экспрессия гена *PCSK1* в группе C2 может быть следствием возможного происхождения опухоли из нейроэндокринных клеток [34, 35]. А повышенный уровень мРНК гена *FURIN* в группе C3 может быть ассоциирован с активной экспрессией и процессингом рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) в опухолях, указывая на их повышенную агрессивность [36]. Очевидно, выяснение причин формирования выявленных сценариев изменения экспрессии генов ПБК требует дополнительных исследований.

Необходимо отметить, что настоящее исследование проведено на относительно небольшом количе-



**Рис. 4.** Анализ паттернов изменения экспрессии шести ключевых генов ПБК при раке легкого и пищевода. Отношения уровней мРНК генов ПБК в ткани опухолей легкого и пищевода и в окружающей нормальной ткани были нормированы в каждом образце и представлены как доля от единицы на тепловой карте. Образцы легкого обозначены как L1–L30, образцы пищевода – E1–E19. Серым обозначены образцы, в которых мРНК гена не детектировалась ни в опухолевой, ни в нормальной ткани. Нормированные данные были кластеризованы как указано в разделе «Экспериментальная часть», дендрограмма показывает расстояния между образцами. Выявленные кластеры обозначены C1–C4

стве образцов. В связи с этим выявленные изменения в экспрессии генов ПБК, а также обнаруженные при проведении кластерного анализа группы образцов, следует уточнить на расширенной выборке. Тем не менее, проанализированные образцы, полученные от пациентов с опухолями легкого и пищевода, представляют собой две независимые и достаточно

разнородные выборки, при анализе которых, однако, обнаружены схожие закономерности. Это позволяет предполагать, что данные закономерности являются достаточно ярко выраженными и потому могут быть выявлены даже на относительно небольшой выборке.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный нами анализ показал, что в опухолях пищевода человека повышена экспрессия генов *PCSK6*, *PCSK9*, *MBTPS1* и *FURIN*. Это указывает на потенциальную вовлеченность данных ПБК в формирование и прогрессию злокачественных новообразований пищевода. При этом роль *PCSK9* и *MBTPS1* в патологическом процессе, вероятно, связана с участием белковых продуктов этих ге-

нов в метаболизме липидов и/или с избеганием иммунного ответа опухолевыми клетками. Нами обнаружено, что изменение экспрессии генов ПБК в опухолях пищевода и легкого имеет ограниченный набор сходных сценариев. Это может указывать на существование общих механизмов злокачественной трансформации клеток легкого и пищевода, а также, возможно, опухолей другой локализации. ●

*Исследование выполнено в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».*

*Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27437>.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Seidah N.G., Prat A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012. V. 11. № 5. P. 367–383.
- Garten W. Characterization of Proprotein Convertases and Their Involvement in Virus Propagation. Cham.: Springer Internat. Publ., 2018. P. 205–248.
- He Z., Khatib A.M., Creemers J.W.M. // *Oncogene.* 2022. V. 41. № 9. P. 1252–1262.
- Khatib A.M., Siegfried G., Chretien M., Metrakos P., Seidah N.G. // *Am. J. Pathol.* 2002. V. 160. № 6. P. 1921–1935.
- Cendron L., Rothenberger S., Cassari L., Dettin M., Pasquato A. // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2023. V. 133. P. 1–54.
- Zaafour A., Seeneevassen L., Nguyen T.L., Genevois C., Nicolas N., Sifre E., Giese A., Porcheron C., Descarpentrie J., Dubus P., et al. // *Gastric Cancer.* 2024. V. 27. № 2. P. 292–307.
- Poyil P.K., Siraj A.K., Padmaja D., Parvathareddy S.K., Diaz R., Thangavel S., Begum R., Haqawi W., Al-Mohanna F.H., Al-Sobhi S.S., et al. // *Mol. Oncol.* 2023. V. 17. № 7. P. 1324–1342.
- Lin Y., Long H., Tan X., Zhang D., Jiang L. // *Cancer Manag. Res.* 2020. V. 12. P. 8623–8629.
- Page R.E., Klein-Szanto A.J., Litwin S., Nicolas E., Al-Jumaily R., Alexander P., Godwin A.K., Ross E.A., Schilder R.J., Bassi D.E. // *Cell Oncol.* 2007. V. 29. № 4. P. 289–299.
- Lopez de Cicco R., Watson J.C., Bassi D.E., Litwin S., Klein-Szanto A.J. // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. № 13. P. 4480–4488.
- Bassi D.E., Mahloogi H., Al-Saleem L., Lopez De Cicco R., Ridge J.A., Klein-Szanto A.J. // *Mol-Carcinog.* 2001. V. 31. № 4. P. 224–232.
- Righi A., Faustini-Fustini M., Morandi L., Monti V., Asioli S., Mazzatenta D., Bacci A., Foschini M.P. // *Endocrine.* 2017. V. 56. № 2. P. 286–297.
- Demidyuk I.V., Shubin A.V., Gasanov E.V., Kurinov A.M., Demkin V.V., Vinogradova T.V., Zinovyeva M.V., Sass A.V., Zborovskaya I.B., Kostrov S.V. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. P. e55752.
- O’Sullivan B., Brierley J., Byrd D., Bosman F., Kehoe S., Kossary C., Pineros M., van Eycken E., Weir H.K., Gospodarowicz M. // *Lancet Oncol.* 2017. V. 18. № 7. P. 849–851.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* NY.: Cold Spring Harbor Lab., 1989. 1659 p.
- Hoshino A., Lindberg I. *Peptide Biosynthesis: Prohormone Convertases 1/3 and 2.* CA.: Morgan & Claypool Life Sciences, 2012. 112 p.
- Gyamera-Acheampong C., Mbikay M. // *Hum. Reprod. Update.* 2009. V. 15. № 2. P. 237–247.
- Seidah N.G., Benjannet S., Wickham L., Marcinkiewicz J., Jasmin S.B., Stifani S., Basak A., Prat A., Chretien M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 3. P. 928–933.
- Wang H., Guo Q., Wang M., Liu C., Tian Z. // *Oncol. Lett.* 2023. V. 26. № 5. P. 500.
- Ito M., Hiwasa T., Oshima Y., Yajima S., Suzuki T., Nanami T., Sumazaki M., Shiratori F., Funahashi K., Li S.Y., et al. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. P. 708039.
- Panet F., Couture F., Kwiatkowska A., Desjardins R., Guerin B., Day R. // *Eur. J. Cell. Biol.* 2017. V. 96. № 5. P. 469–475.
- Lin Y.E., Wu Q.N., Lin X.D., Li G.Q., Zhang Y.J. // *J. Thorac. Dis.* 2015. V. 7. № 5. P. 850–860.
- Couture F., Wang L., Dufour F., Chabot-Maheux K., Ekindi Ndongo N., Sabbagh R., Day R. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 6066.
- Weishaupt C., Mastrofrancesco A., Metze D., Kemper B., Stegemann A., Picardo M., Klein-Szanto A.J.P., Bohm M. // *Acta Derm. Venereol.* 2020. V. 100. № 10. P. adv00157.
- Rydzkowska U., Suur B.E., Rohl S., Razuvaev A., Lengquist M., Sabater-Lleal M., van der Laan S.W., Miller C.L., Wirka R.C., Kronqvist M., et al. // *Circ. Res.* 2020. V. 126. № 5. P. 571–585.
- Jiang H., Wang L., Wang F., Pan J. // *Mol. Med. Rep.* 2017. V. 16. № 6. P. 8477–8484.
- Fu Y., Zou T., Shen X., Nelson P.J., Li J., Wu C., Yang J., Zhang Y., Bruns C., Zhao Y., et al. // *MedComm.* 2021. V. 2. № 1. P. 27–59.
- Bao X., Liang Y., Chang H., Cai T., Feng B., Gordon K., Zhu Y., Shi H., He Y., Xie L. // *Signal Transduct. Target Ther.* 2024. V. 9. № 1. P. 13.
- Kelly R.J., Ajani J.A., Kuzdzal J., Zander T., Van Cutsem E., Piessen G., Mendez G., Feliciano J., Motoyama S., Lievre A., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 384. № 13. P. 1191–1203.
- Han Y., Liu D., Li L. // *Am. J. Cancer Res.* 2020. V. 10. № 3. P. 727–742.
- Wang R., Liu H., He P., An D., Guo X., Zhang X., Feng M. // *Front Immunol.* 2022. V. 13. P. 947756.
- Seidah N.G., Sadr M.S., Chretien M., Mbikay M. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 30. P. 21473–21481.
- Creemers J.W., Khatib A.M. // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 4960–4971.
- Segawa Y., Takata S., Fujii M., Oze I., Fujiwara Y., Kato Y., Ogino A., Komori E., Sawada S., Yamashita M., et al. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2009. V. 135. № 8. P. 1055–1059.
- Geng Z.-H., Liu Y.-L., Xu C., Zhu Y., Zhou P.-H., Cai M.-Y. // *Clin. Cancer Bull.* 2023. V. 2. № 1. P. 5.
- Bassi D.E., Zhang J., Renner C., Klein-Szanto A.J. // *Mol. Carcinog.* 2017. V. 56. № 3. P. 1182–1188.

УДК 577.2

# Гетерологическая продукция антимикробных пептидов в дрожжах позволяет проводить массированную оценку активности ДНК-кодируемых антимикробных агентов *in situ*

С. О. Пипия<sup>1</sup>, А. О. Иванова<sup>1</sup>, Ю. А. Мокрушина<sup>1,2</sup>, И. Е. Елисеев<sup>1</sup>, А. Г. Габибов<sup>1,2</sup>,  
И. В. Смирнов<sup>1,2</sup>, С. С. Терехов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*E-mail: sterekhoff@mail.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023

Принята к печати 07.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27355

**РЕФЕРАТ** Кризис антибиотикорезистентности бросает вызов глобальной системе здравоохранения. Классические антибиотики все чаще становятся неэффективными в клинической практике. Более того, введение в клиническую практику новых антимикробных агентов в горизонте всего нескольких лет приводит к возникновению антибиотикорезистентных штаммов патогенов. Таким образом, разработка платформ массированного создания и поиска новых антимикробных агентов представляет особую значимость в условиях возникновения антибиотикорезистентных штаммов патогенов и частой неэффективности классических антибиотиков. Массированный поиск позволит многократно сократить время, необходимое для идентификации наиболее перспективных лекарственных кандидатов. ДНК-кодируемые антимикробные агенты, в свою очередь, открывают уникальные возможности для широкомасштабного создания новых антибиотиков. В данной работе клетки дрожжей *Pichia pastoris* были генетически модифицированы с целью продукции панели антимикробных пептидов (АМП) и последующего высокопроизводительного отбора продуцентов АМП, подавляющих рост бактерий *in situ*. Наибольшей антимикробной активностью обладали дрожжевые клоны-продуценты танатина и протегрина-1. При этом уровень продукции рекомбинантного танатина был значительно выше, чем протегрина-1, что коррелирует с данными о его низкой токсичности. Разработанные методы массированной оценки активности ДНК-кодируемых антимикробных агентов позволяют идентифицировать лекарственные кандидаты с повышенным терапевтическим индексом. Развитие методов направленного создания искусственного разнообразия АМП и использование технологий глубокого функционального профилирования антимикробной активности позволяют разработать новые АМП с улучшенными терапевтическими характеристиками.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антимикробные пептиды, дрожжи *Pichia pastoris*, гетерологическая продукция, поиск матриц, протегрин-1, танатин.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АМП – антимикробные пептиды; GAP – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; GFP – зеленый флуоресцентный белок; NGS – секвенирование нового поколения.

## ВВЕДЕНИЕ

Распространение антибиотикорезистентности приводит к снижению эффективности традиционных антибиотиков широкого спектра, что ограничивает возможности лечения бактериальных инфекций [1]. Также увеличивается обеспокоенность по поводу развития перекрестной резистентности [2, 3]. Все

это делает необходимым расширение спектра и масштаба скрининга потенциальных антибиотиков, чтобы противостоять быстрым темпам адаптации микроорганизмов к лекарственным средствам [4, 5].

Природные источники являются обширным ресурсом веществ, обладающих антимикробной активностью, однако поиск и наработка таких соединений

часто ограничены культивируемыми и высокопредставленными штаммами микроорганизмов [6]. Это, в свою очередь, порождает проблему переоткрытия уже известных антибиотиков. Одним из способов решения данной проблемы является применение ультравысокопроизводительного скрининга образцов из разнообразных источников [7]. Такой подход позволяет находить вещества разной химической природы. Однако дальнейшее изменение свойств таких антибиотиков требует привлечения химического синтеза или культивирования продуцента и разработки целевого вещества для последующих экспериментов, связанных с его модификацией.

Перспективным классом альтернативных антибиотиков являются антимикробные пептиды (АМП) [8]. Природные антимикробные пептиды, активные в отношении грамотрицательных бактерий, представляют исключительный интерес в рамках борьбы с распространением внутрибольничных инфекций и антибиотикорезистентности [9]. Одним из преимуществ АМП является их генетически кодируемая природа и простой биосинтетический путь, который можно адаптировать к продукции в гетерологичном продуценте. Это позволяет легко вносить изменения в структуру и упрощает процедуру скрининга и улучшения фармакологических свойств АМП. Анализ баз данных пептидов позволяет проводить поиск новых АМП в природных источниках [10]. С этой целью используют также анализ метагеномных и протеомных данных, из которых вычлениают потенциальные АМП и затем проверяют их антимикробную активность [11, 12].

Другой подход – использование искусственного разнообразия молекул на основе рационального дизайна и *de novo* подходов. Созданные библиотеки вариантов АМП получают и проверяют с использованием технологий химического синтеза [13], фагового [14] или дрожжевого дисплея [15]. Широкое развитие в последние годы получили технологии *de novo* дизайна АМП с использованием искусственного интеллекта и нейросетей [16]. Многие подобные подходы опираются на методы направленной эволюции, имитируя природный процесс при создании новых молекул. Выбор стартовой точки для генерирования новой молекулы крайне важен для навигации по поверхности эволюционного ландшафта (рис. 1). Это позволит анализировать разнообразные пути направленной эволюции и находить наиболее подходящие варианты. При такой постановке начальных условий сокращается вероятность следования по тупиковой, единообразной эволюционной ветви.

В настоящее время цитотоксичность, а также механизмы действия АМП оценивают на искусственных системах, использующих в качестве модель-

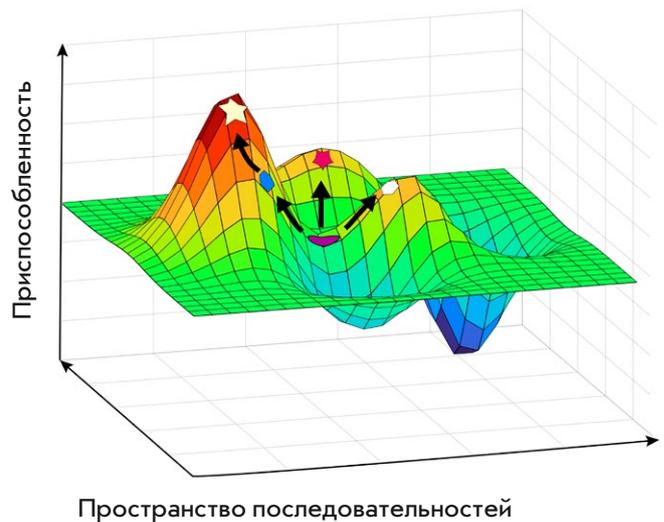


Рис. 1. Схематическое представление процесса направленной эволюции в координатах пространства последовательностей и приспособленности

ных мембран везикулы, липосомы и искусственные мембраны [17]. Данные методы позволяют приближенно оценить, как происходят взаимодействия пептидов с бактериальными или эукариотическими мембранами, однако они проводятся уже после этапов первичного скрининга антимикробной активности и отбора активных пептидов. Чтобы сократить количество этапов проверки и увеличить пропускную способность исследований, можно использовать продукцию АМП в эукариотической клетке, и напрямую оценивать антимикробную активность продуцента. В подобной гетерологической системе потенциально цитотоксические пептиды не будут иметь высокий выход или будут существенно влиять на рост популяции продуцента. Таким образом можно сократить число вариантов для дальнейшего более тщательного исследования свойств отобранных АМП. Подобный подход может значительно ускорить время анализа.

В качестве подобного гетерологического продуцента интерес представляют дрожжи *Pichia pastoris*, которые совмещают все особенности эукариотической клетки, включая способность к посттрансляционным модификациям, со скоростью роста, сопоставимой с бактериальной, и высоким уровнем продукции рекомбинантных белков [18].

Данная работа направлена на исследование особенностей гетерологической продукции АМП в дрожжах и применение рекомбинантных технологий к поиску матриц для создания новых антимикробных пептидов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Бактериальные и дрожжевые штаммы

Использовали метилотрофные дрожжи *P. pastoris* GS115 (Invitrogen, США), клонирование и наработку плазмид осуществляли в клетках *Escherichia coli* XL-Blue («Евроген», Россия), в качестве таргетной бактерии использовали *E. coli*  $\Delta$ lptD (любезно предоставлена И.А. Остерманом).

### Клонирование генов АМП

Экспрессионный вектор pGAP4 получен путем замены промотора  $P_{AOX1}$  в векторе pPIC9k (Invitrogen) последовательностью промотора  $P_{GAP}$  из вектора pGAPZa (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с помощью набора HiFi DNA assembly kit (New England Biolabs, Великобритания).

Нуклеотидные последовательности генов АМП оптимизировали с использованием программы GeneArt GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific Inc.) для продукции в клетках *P. pastoris*. Гены синтезировали методом ПЦР с взаимно перекрывающимися праймерами и клонировали в экспрессионный вектор pGAP4 с помощью набора HiFi DNA assembly kit (New England Biolabs). Клонированные гены АМП располагались в единой рамке считывания с геном альфа-фактора дрожжей, обеспечивающим секрецию пептидных молекул в культуральную среду. В процессе транспорта последовательность альфа-фактора процессируется эндопептидазой KEX2, и в культуральную среду выделяется пептид в активной форме. Библиотека АМП в векторе pGAP\_AMP была линейаризована по сайту рестрикции AvrII для дальнейшей трансформации в клетки дрожжей.

### Трансформация дрожжевых клеток

Клетки дрожжей *P. pastoris* GS115 трансформировали линейаризованной библиотекой плазмид pGAP\_AMP согласно протоколу [19]. Трансформированные клетки дрожжей отбирали на агаризованной среде RDB (1 М сорбитол, глюкоза 20 г/л, YNB 13.4 г/л, биотин 0.4 мг/л, 0.005 г/л незаменимых аминокислот (L-глутаминовая кислота, L-метионин, L-лизин, L-лейцин и L-изолейцин), агар 18 г/л) и растили в воздушном термостате при 30°C в течение 72 ч.

### Анализ антимикробной активности

Трансформированные клоны дрожжевой библиотеки высевали на чашки с питательной средой YPD-агар (2% пептона, 1% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы, 100 мМ калий-фосфатного буфера pH 6.0, 1.8% агар-агара) и инкубировали при 30°C в течение

48 ч. Бактерию-мишень *E. coli*  $\Delta$ lptD GFP высевали в ночную культуру. Мягкий агар (0.8% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 0.25% NaCl и 0.5% агарозы) инокулировали ночной культурой бактерии-мишени до конечной концентрации  $10^5$  КОЕ/мл, покрывали им колонии дрожжей и инкубировали при 37°C в течение 18 ч до образования зон ингибирования роста.

### Анализ уровня продукции АМП в жидкой культуре

Дрожжевые штаммы-продуценты АМП культивировали в питательной среде YPD (2% пептона, 1% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы, 100 мМ калий-фосфатного буфера pH 6.0) в колбах на качалке при 30°C и 180 об/мин в течение ночи. Через 24, 48 и 72 ч отбирали аликвоты среды, которые анализировали методом электрофореза в трициновом буфере в полиакриламидном геле в соответствии с протоколом [20]. Уровень продукции АМП оценивали по интенсивности окрашивания полос красителем Кумасси.

### Идентификация пептидов у клонов с антимикробной активностью

Активные дрожжевые клоны выращивали на селективной среде RDB. Геномную ДНК выделяли с использованием ацетата лития и SDS согласно протоколу [21]. Гены АМП амплифицировали методом ПЦР с использованием фланкирующих праймеров: Forw 5'-TGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTGGAGAAAAG-3' и Rev 5'-GAACTGAGGAACAGTCATGTCTAAGGCTACAAA-3'. ПЦР-продукты секвенировали методом Сэнгера, ген пептида идентифицировали, выравнивая полученную нуклеотидную последовательность по последовательности генов АМП из панели.

### Выделение геномной ДНК дрожжей и подготовка образцов для NGS-секвенирования

Геномную ДНК выделяли из объединенного пула трансформированных клонов дрожжей согласно протоколу [21]. Гены АМП амплифицировали с помощью эмульсионной ПЦР (эПЦР) согласно протоколу [22] с использованием праймеров, указанных выше. Полученный пул ПЦР-продуктов был дополнительно очищен с помощью магнитных частиц VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme, Китай).

### NGS-секвенирование

Подготовленные ПЦР-продукты амплифицировали с использованием набора REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование проводили с использованием генетического анализатора HiSeq2500,

Таблица 1. Панель АМП с выраженной антимикробной активностью

Антимикробный пептид	Аминокислотная последовательность*	Размер, число а.о.	Тип структуры
TP4	FIHHIIGGLFSAGKAIHRLIRRRRR	25	β-шпилька
Протегрин-1	RGGRLCYCRRRFCVCVGR	18	β-шпилька
Магаинин-1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	23	α-спираль
Мелиттин	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	26	α-спираль
Мастопаран	INLKAIAALAKKLF	14	α-спираль
Танатин	GSKKPVPPIYCNRRRTGKCQRM	21	β-шпилька
HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	30	β-шпилька
Тахиплезин-1	KWCFRVCYRGICYRRCR	17	β-шпилька
Индолицидин	ILPWKWPWWPWRR	13	α-спираль
Арминин 1a	KPWRFRRAIRRVWRVKVAPYIPFVVKTVGKK	31	α-спираль

\*Аминокислотная последовательность, длина и структура АМП уточнены в APD3 [23] и DBAASP [24].

HiSeq PE Cluster Kit v4 cBot и HiSeq SBSKit v4 (250 циклов) (Illumina, США) в соответствии с инструкциями производителя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Подбор панели антимикробных пептидов из баз данных АМП

Опираясь на базы данных АМП, такие как APD3 [23] и DBAASP [24], была составлена панель АМП с выраженной антимикробной активностью (табл. 1).

Проверка универсальности применения дрожжей в качестве гетерологического продуцента АМП требует валидации на панели АМП с разнообразными физико-химическими характеристиками. Опираясь на данный критерий, мы выбирали последовательности АМП с учетом относительно высокой антимикробной активности, разнообразия структуры и длины аминокислотной последовательности. Таким образом была составлена панель АМП, охватывающая широкий спектр структурных матриц.

### Создание генетических конструкций панели АМП и трансформация клеток дрожжей

Нуклеотидные последовательности генов антимикробных пептидов оптимизировали с помощью программного обеспечения GeneArt GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific Inc.), и синтезированные фрагменты клонировали в дрожжевой вектор для секретлируемой продукции рGAP4\_AMP (рис. 2). Благодаря наличию сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAP) для продукции целевых

пептидов не требуется добавление индуктора. Полученные генетические конструкции трансформировали в клетки дрожжей единым пулом. С 1 мкг библиотеки плазмид получено 10<sup>4</sup> дрожжевых клонов, которые были объединены в единую библиотеку для проведения функциональных исследований.

### Анализ представленности генов АМП из панели

Количество полученных клонов дрожжей на три порядка превышает количество анализируемых генов АМП, что свидетельствует о достаточной представительности данной библиотеки. Для проверки наличия всех генов АМП из панели и их соотношения мы выделили тотальную геномную ДНК и провели NGS-анализ. Согласно данным секвенирования, в библиотеке присутствуют все гены АМП из панели (рис. 3).

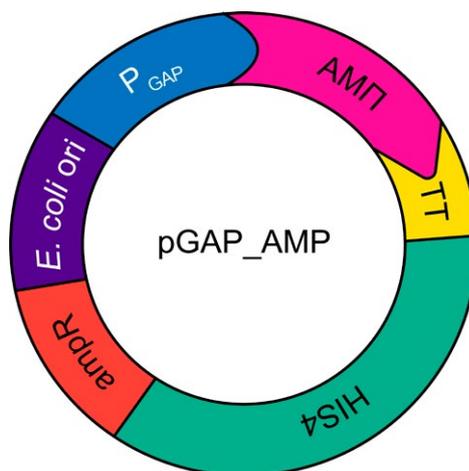


Рис. 2. Схема генетической конструкции для конститутивной продукции АМП

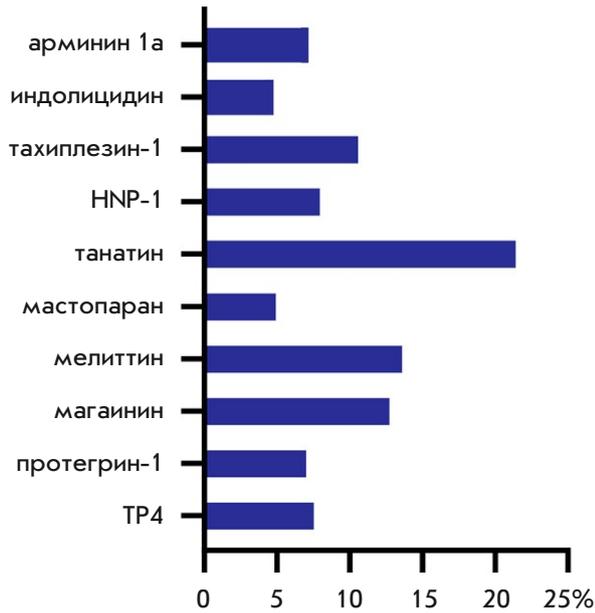


Рис. 3. Анализ представленности генов АМП в дрожжевой библиотеке. По оси абсцисс отложены доли (%) от общего количества последовательностей

### Анализ антимикробной активности дрожжевой библиотеки продуцентов АМП

Антимикробную активность проверяли путем анализа образования зон ингибирования роста бактерии-мишени *E. coli ΔlptD* на питательной среде в чашках Петри (рис. 4).

Количество проанализированных клонов составило ~ 3000, что более чем на два порядка покрывает исследуемую библиотеку АМП. Таким образом, вероятность потери клона, несущего ген какого-либо из выбранных АМП, в связи с недостаточным количеством проанализированных клонов была сведена к минимуму. Из 55 клонов выделили геномную ДНК. Участок, содержащий ген АМП, амплифицировали и проанализировали с помощью секвенирования по Сэнгеру. В ходе анализа установлено, что 37 клонов содержали ген танатина, а 18 – протегрина-1.

Активные клоны дрожжей демонстрировали крупные зоны ингибирования роста таргетной бактерии, которые потенциально могли перекрываться с зонами от других пептидов. Чтобы исключить возможные потери активных клонов, мы дополнительно клонировали новый пул генов АМП, из которого были исключены гены протегрина-1 и танатина. Анализ активности клонов в уменьшенной библиотеке не выявил новых активных кандидатов.

Уровень продукции АМП активными клонами проанализирован также по интенсивности полос в полиакриламидном геле (рис. 5).

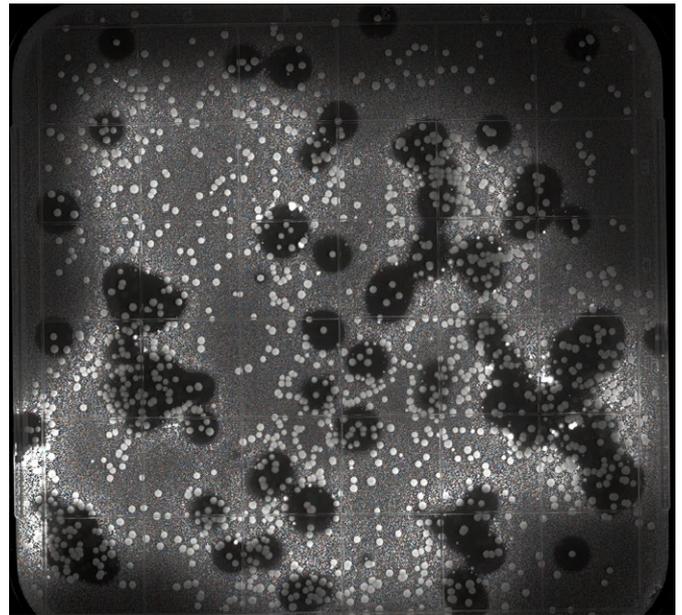


Рис. 4. Анализ образования зон ингибирования роста таргетной бактерии *Escherichia coli ΔlptD* клонами дрожжей, трансформированных рGAP\_AMP

Образцы культуральной среды характеризовались высоким уровнем продукции рекомбинантного танатина, что видно по наличию четкой полосы в низкомолекулярной области электрофореграммы. В то же время отсутствие соответствующих полос в культуральных средах от продуцентов протегрина-1 указывало на низкий уровень продукции этого пептида. Однако рекомбинантные дрожжевые клоны-продуценты, несмотря на низкий уровень продукции протегрина-1, демонстрировали детектируемый уровень антимикробной активности, поскольку сам этот АМП обладает значительной антимикробной активностью.

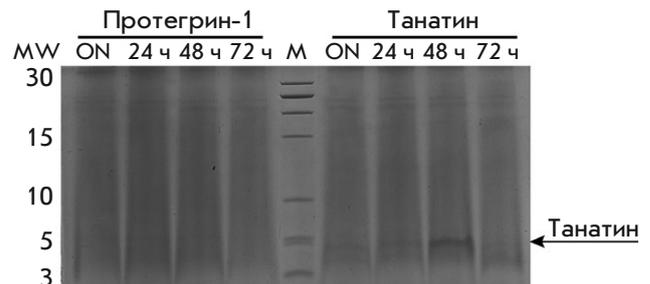


Рис. 5. Электрофореграмма проб культуральных сред продуцентов АМП в трициновом ПААГ. Отмечены временные точки отбора культуральной среды после культивирования клонов-продуцентов протегрина-1 и танатина. ON – среда после культивирования в течение ночи, М – маркер молекулярных масс белков

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в данной системе можно детектировать АМП как за счет высокой продукции, так и по уровню антимикробной активности.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Антимикробные пептиды (АМП) широко распространены в природе в качестве защитных и сигнальных молекул [25]. В основном они состоят из 5–50 аминокислотных остатков, зачастую с преобладанием положительно заряженных и гидрофобных боковых цепей. Большая группа АМП не имеет специфической белковой мишени в бактериальных клетках, поскольку действует на мембрану или вызывает окислительный стресс, что затрудняет выработку бактериями устойчивости к АМП [26]. Известно также, что резистентные к антибиотикам бактерии могут проявлять повышенную чувствительность к АМП [27]. Таким образом, АМП являются перспективными кандидатами на роль альтернативных антимикробных соединений для борьбы с множественной лекарственной устойчивостью.

Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* являются удобным и экономичным гетерологическим продуцентом, поскольку для них доступен обширный набор генно-инженерных инструментов для продукции широкого спектра белковых молекул, а также за счет низкой себестоимости необходимых компонентов сред. Детекция антимикробной активности в гетерологическом продуценте способствует значительному сокращению затрат на синтез и первичный анализ активности АМП. В данной работе получена библиотека дрожжевых клонов, продуцирующих панель антимикробных пептидов. Одновременный анализ активности дрожжевых клонов позволил сравнить потенциальную токсичность выбранных пептидов в отношении эукариотических клеток и их удельную активность. Показана выраженная антимикробная активность клонов-продуцентов протегрина-1 и танатина.

Известно, что протегрин-1 обладает высокой гемолитической активностью и цитотоксичностью [28], тогда как танатин, действие которого направлено на бактериальные мишени, не вызывает выраженного гемолиза [29] и проявляет низкую токсичность в клетках млекопитающих [30]. Это может быть одной из причин наблюдаемых в нашей работе различий в уровне продукции данных АМП. Штаммы-продуценты остальных пептидов из панели не проявили выраженного антимикробного эффекта по отношению к целевой бактерии. Причиной подобного может быть потенциальная фунгицидная активность соответствующих АМП по отношению

к клеткам дрожжей *P. pastoris*. С другой стороны, дрожжи относятся к домену эукариоты, соответственно, АМП, действующие на эукариотические мембраны за счет неспецифического механизма действия будут токсичными для клеток дрожжей. Это, в свою очередь, может снизить уровни продукции и, как следствие, привести к отсутствию антимикробной активности у дрожжевого продуцента. Однако подобный эффект можно использовать для исключения АМП, которые обладают низкой селективностью по отношению к бактериальным мембранам и будут токсичными для эукариотических клеток. Потенциально токсичные варианты должны обладать высокой удельной активностью для успешной детекции в рамках подобного скрининга.

Таким образом, можно заключить, что скрининг активных вариантов АМП посредством рекомбинантной продукции в дрожжевых клетках позволяет отбирать пептиды с разными характеристиками. Подобная система может применяться для поиска новых матриц для создания искусственного разнообразия вариантов АМП и последующего улучшения их фармакокинетических свойств.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования составлена панель АМП для создания пула рекомбинантных продуцентов. Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* были генетически модифицированы для секретируемой продукции антимикробных пептидов. Анализ зон ингибирования роста клонов дрожжей показал, что наиболее выраженной активностью обладают продуценты пептидов протегрина-1 и танатина. Анализ уровня продукции протегрина-1 и танатина показал более высокое содержание танатина в культуральной среде по сравнению с протегрином-1, что свидетельствует о разных причинах проявления высокой активности дрожжевых клонов. В случае танатина – за счет высокого уровня продукции, в случае протегрина-1 – за счет высокой удельной активности. Таким образом, использование дрожжевых клеток в качестве продуцентов АМП и создание на их основе пула клеток, обладающих антимикробной активностью, позволяет одновременно анализировать антимикробные свойства веществ в одинаковых условиях, сокращая время и затраты на проведение подобных исследований. Показан потенциал рекомбинантных технологий в разработке методов широкомасштабных скрининговых исследований антимикробных соединений. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-14-00357).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Robles Aguilar G., Gray A., Han C., Bisignano C., Rao P., Wool E., et al. // *The Lancet*. 2022. V. 399. № 10325. P. 629–655.
2. Cherny S.S., Nevo D., Baraz A., Baruch S., Lewin-Epstein O., Stein G.Y., Obolski U. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2021. V. 76. № 1. P. 239–248.
3. Nichol D., Rutter J., Bryant C., Hujer A.M., Lek S., Adams M.D., Jeavons P., Anderson A.R.A., Bonomo R.A., Scott J.G. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 334.
4. Itoh H., Tokumoto K., Kaji T., Paudel A., Panthee S., Hamamoto H., Sekimizu K., Inoue M. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2992.
5. Li S., She P., Zhou L., Zeng X., Xu L., Liu Y., Chen L., Wu Y. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 591426.
6. Lewis K. // *Cell*. 2020. V. 181. № 1. P. 29–45.
7. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., Rubtsova M.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 38. P. 9551–9556.
8. Magana M., Pushpanathan M., Santos A.L., Leanse L., Fernandez M., Ioannidis A., Giulianotti M.A., Apidianakis Y., Bradfute S., Ferguson A.L., et al. // *Lancet Infect. Dis.* 2020. V. 20. № 9. P. e216–e230.
9. Barreto-Santamaría A., Arévalo-Pinzón G., Patarroyo M.A., Patarroyo M.E. // *Antibiotics*. 2021. V. 10. № 12. P. 1499.
10. Porto W.F., Pires A.S., Franco O.L. // *Biotechnol. Adv.* 2017. V. 35. № 3. P. 337–349.
11. Jhong J.-H., Yao L., Pang Y., Li Z., Chung C.-R., Wang R., Li S., Li W., Luo M., Ma R., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2022. V. 50. № D1. P. D460–D470.
12. Ma Y., Guo Z., Xia B., Zhang Y., Liu X., Yu Y., Tang N., Tong X., Wang M., Ye X., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2022. V. 40. № 6. P. 921–931.
13. Mourtada R., Herce H.D., Yin D.J., Moroco J.A., Wales T.E., Engen J.R., Walensky L.D. // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. № 10. P. 1186–1197.
14. Kim H., Jang J.H., Kim S.C., Cho J.H. // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. V. 185. P. 111814.
15. Chun J., Bai J., Ryu S. // *ACS Synth. Biol.* 2020. V. 9. № 3. P. 508–516.
16. Kazmirchuk T.D.D., Bradbury-Jost C., Withey T.A., Gesse T., Azad T., Samanfar B., Dehne F., Golshani A. // *Genes*. 2023. V. 14. № 6. P. 1194.
17. Hollmann A., Martinez M., Maturana P., Semorile L.C., Maffia P.C. // *Front. Chem.* 2018. V. 6. P. 204.
18. Karbalaee M., Rezaee S.A., Farsiani H. // *J. Cell Physiol.* 2020. V. 235. № 9. P. 5867–5881.
19. Wu S., Letchworth G.J. // *Biotechniques*. 2004. V. 36. № 1. P. 152–154.
20. Schägger H. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. № 1. P. 16–22.
21. Lööke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. // *BioTechniques*. 2011. V. 50. № 5. P. 325–328.
22. Terekhov S.S., Eliseev I.E., Ovchinnikova L.A., Kabilov M.R., Prjibelski A.D., Tupikin A.E., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Severinov K.V., Lomakin Y.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 44. P. 27300–27306.
23. Wang G., Li X., Wang Z. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D1087–D1093.
24. Pirtskhalava M., Armstrong A.A., Grigolava M., Chubinidze M., Alimbarashvili E., Vishnepolsky B., Gabrielian A., Rosenthal A., Hurt D.E., Tartakovsky M. // *Nucl. Acids Res.* 2021. V. 49. № D1. P. D288–D297.
25. Koczulla A.R., Bals R. // *Drugs*. 2003. V. 63. № 4. P. 389–406.
26. Bahar A.A., Ren D. // *Pharmaceuticals*. 2013. V. 6. № 12. P. 1543–1575.
27. Lázár V., Martins A., Spohn R., Daruka L., Grézal G., Fekete G., Számel M., Jangir P.K., Kintsés B., Csörgő B., et al. // *Nat. Microbiol.* 2018. V. 3. № 6. P. 718–731.
28. Edwards I.A., Elliott A.G., Kavanagh A.M., Zuegg J., Blaskovich M.A.T., Cooper M.A. // *ACS Infect. Dis.* 2016. V. 2. № 6. P. 442–450.
29. Hou Z., Lu J., Fang C., Zhou Y., Bai H., Zhang X., Xue X., Chen Y., Luo X. // *J. Infect. Dis.* 2011. V. 203. № 2. P. 273–282.
30. Tanhaeian A., Azghandi M., Mousavi Z., Javadmanesh A. // *Protein Pept. Lett.* 2020. V. 27. № 1. P. 41–47.

УДК 615, 616-05

# Галанин уменьшает ишемическое/реперфузионное повреждение сердца у крыс со стрептозотоциновым диабетом

И. М. Студнева, Л. И. Серебрякова, О. М. Веселова, И. В. Доброхотов, М. Е. Палькеева, Д. В. Авдеев, А. С. Молокоедов, М. В. Сидорова, О. И. Писаренко\*

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова МЗ РФ, Москва, 121552 Россия

\*E-mail: olpi@live.ru

Поступила в редакцию 27.08.2024

Принята к печати 21.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27506

**РЕФЕРАТ** Большинство клинических исследований подтверждает негативное влияние сахарного диабета (СД) на течение и исход сердечно-сосудистых осложнений, вызванных ишемическим/реперфузионным повреждением (ИРП) сердца, поэтому актуален поиск новых подходов к лечению ИРП диабетического миокарда. В представленной работе изучали влияние нейропептида галанина (G) на размеры инфаркта миокарда (ИМ), показатели функции митохондрий и энергетического состояния зоны риска (ЗР) у крыс с сахарным диабетом первого типа (СД1), подвергнутых региональной ишемии и реперфузии сердца. Галанин крысы был получен методом твердофазного синтеза с использованием Fmoc-стратегии и очищен с помощью ВЭЖХ. СД1 индуцировали введением стрептозотоцина. ИРП сердца моделировали окклюзией передней нисходящей коронарной артерии и последующей реперфузией. G в дозе 1 мг/кг вводили в/в перед реперфузией. G уменьшал размеры ИМ и активность креатинкиназы-МВ в плазме крови диабетических крыс на 40 и 28% соответственно. Под действием G улучшалось дыхание митохондрий в скинированных сапонином волокнах ЗР – максимальное ADP-стимулированное состояние 3, дыхательный контроль и функциональная связь митохондриальной креатинкиназы с окислительным фосфорилированием. G поддерживал достоверно более высокие уровни АТР, общего фонда адениннуклеотидов, аденилатного энергетического заряда кардиомиоцитов и снижал потери общего креатина в ЗР сердца диабетических крыс. Полученные результаты предполагают перспективность применения G при ИРП миокарда, осложненном СД1.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** галанин, крыса, стрептозотоциновый диабет, ишемия и реперфузия сердца, дисфункция митохондрий, энергетическое состояние миокарда, повреждение клеточных мембран.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АФК – активные формы кислорода; АЭЗ – аденилатный энергетический заряд; ДК – дыхательный контроль; ЗР – зона риска; ИМ – инфаркт миокарда; ИРП – ишемическое/реперфузионное повреждение; КК-МВ – креатинкиназа-МВ; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ЛЖ – левый желудочек; мт-КК – митохондриальная креатинкиназа; ОФ – окислительное фосфорилирование; ЛНА – левая нисходящая коронарная артерия; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СД – сахарный диабет; СТЗ – стрептозотцин; Сг – креатин; G – галанин; РСг – фосфокреатин; ΣAN – общий пул адениннуклеотидов; ΣСг – общий креатин.

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема коморбидности сахарного диабета и ишемической болезни сердца как двух распространенных патологий является одной из важнейших в современной экспериментальной и клинической кардиологии, учитывая их взаимное негативное влияние на прогноз и качество жизни больных. У пациентов с сахарным диабетом чаще возника-

ют окклюзии коронарных артерий, а сердце более чувствительно к ишемическому и реперфузионному повреждению (ИРП), чем у пациентов без диабета [1]. Как правило, защита сердца от ИРП миокарда при диабете оказывается неэффективной [2]. Это вызвано дефектами в сигнальных каскадах PI3K/Akt и JAK2/STAT3, ключевых для защиты миокарда [3]. Диабетическая гипергликемия может вызывать

дисфункцию митохондрий за счет увеличения экспрессии динамин-связанного белка 1 [4], блокирования митохондриальных АТФ-зависимых  $K^+$ -каналов [5] и инактивации фактора-1 $\alpha$ , индуцируемого гипоксией (HIF-1 $\alpha$ ) [6]. Перечисленные метаболические изменения способствуют десенсibilизации диабетического миокарда к терапевтическим вмешательствам против ИПП. В связи с этим актуален поиск новых фармакологических мишеней для профилактики и лечения ИПП миокарда при диабете.

В последнее время важную роль в регуляции функции сердца при патологических состояниях отводят галанинергической системе [7]. Нейропептид галанин (GWTLNSAGYLLGPH AIDNHRFSDKHGLT-NH<sub>2</sub>) широко представлен в центральной и периферической нервной системе, а также в других тканях [8]. В периферических органах, включая сердце, G действует не только через нейрональные механизмы, но и активирует семейство трансмембранных рецепторов GalR1-3 [9]. Недавно мы показали, что внутривенное введение G крысам после региональной ишемии миокарда значительно снижало некротическое повреждение кардиомиоцитов [10]. Этот эффект был опосредован активацией рецептора GalR2 и значительно снижался под влиянием M871, антагониста GalR2 [11]. Уменьшение размеров инфаркта миокарда (ИМ) под действием G сопровождалось снижением образования аддукта гидроксильных радикалов 5,5-диметил-пирролин-N-оксид-ОН и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в зоне риска (ЗР) при возобновлении кровотока. G способен также ингибировать свободнорадикальное окисление липопротеинов низкой плотности в плазме крови человека [12]. Существенно, что G предотвращал развитие гипергликемии при стрептозотоциновом (СТЗ) диабете у крыс, улучшал метаболическое состояние сердца диабетических животных благодаря повышению дыхательной функции митохондрий и снижал образование продуктов ПОЛ в плазме крови [13]. Мы предположили, что этот пептид, улучшающий образование энергии в митохондриях сердца и снижающий окислительный стресс, может быть перспективным для снижения ИПП сердца при СД1. Ранее влияние G на ишемизированный миокард, подвергнутый воздействию диабета, не изучалось. Для проверки этой гипотезы G был использован в период реперфузии после региональной ишемии миокарда у крыс с гипергликемией, вызванной введением СТЗ. В этой

работе критериями повреждения сердца служили размеры ИМ и активность маркеров некроза – креатинкиназы-МВ (КК-МВ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – в плазме. Для понимания механизмов действия G акцент сделали на энергетическом состоянии ЗР и функции митохондрий, которая была охарактеризована параметрами дыхания волокон миокарда, скинированных сапонином.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реагенты

Производные Fmoc-защищенных аминокислот были приобретены у Novabiochem и Bachem (Швейцария), реагенты для синтеза пептидов – у компании Fluka Chemie GmbH (Швейцария). Ферменты и химические препараты для определения метаболитов и параметров дыхания волокон миокарда приобретены у ООО «Мерк Лайф Сайенс» (Россия). Растворы готовили с использованием деионизированной воды (Millipore Corp., США).

### Синтез и хроматография пептида G

Пептид G получен конвергентным синтезом на твердой фазе путем конденсации пептидных блоков, полученных на полимере и в растворе, и очищен с помощью препаративной ВЭЖХ до 98% чистоты на хроматографе Knauer (Германия) с колонкой (30 × 250 мм) Kromasil 100-10 ODS (Швеция) [14]. Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Kromasil 100-5 C18 (4.6 × 250 мм), размер частиц сорбента 5 мкм; в качестве элюентов использовали: буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрил в буфере А, элюция проводилась линейным градиентом от 20 до 80% Б за 30 мин со скоростью 1 мл/мин, детекция при  $\lambda = 220$  нм (Приложения, рис. S1). Структуру пептида подтверждали методом масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF на приборе UltrafleXtreme Bruker Daltonics GmbH (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd) (Приложения, рис. S2). Характеристики пептида G приведены в табл. 1.

### Дизайн эксперимента

В работе использовали крыс-самцов Вистар массой 280–290 г, полученных из питомника животных «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий (Москва, Россия). Животных содержали в индивидуальных клетках при температуре 20–

Таблица 1. Характеристики нейропептида G

Аминокислотная последовательность	Мол. масса, г/моль	MALDI-TOF, m/z	Растворимость в воде, мг/мл	Чистота, ВЭЖХ, %
GWTLNSAGYLLGPH AIDNHRFSDKHGLT-NH <sub>2</sub>	3164.45	3163.474 [M + H] <sup>+</sup>	>40	98.10

25°C с естественным циклом света и темноты, они имели свободный доступ к стандартному гранулированному рациону и воде. Перед исследованием всех животных взвешивали. После 24-часового голодания у 10 крыс забирали кровь из хвостовой вены для определения концентрации глюкозы и активности КК-МВ и ЛДГ в плазме. Затем крыс наркотизировали 2,2,2-трибромэтанолом (1 мг/кг в/б авертин, «Мерк», Россия) и выделяли сердца для определения показателей энергетического обмена ( $n = 5$ ) и параметров дыхания митохондрий в волокнах левого желудочка (ЛЖ) сердца ( $n = 5$ ) (исходное состояние – группа КС). Оставшихся крыс распределяли случайным образом на пять групп по 15 крыс в каждой: контроль (К), ИРП сердца (ИР); диабет (Д), диабет с последующим ИРП сердца (Д+ИР), диабет с ИРП сердца и с введением G на реперфузии (Д+ИРG). В группе ИР повреждение сердца моделировали окклюзией левой нисходящей коронарной артерии (ЛНА) и последующей реперфузией [11]. Острый СД1 вызывали однократной инъекцией СТЗ (60 мг/кг, в/в) [15]. О развитии диабета судили по повышению уровня глюкозы в крови до 12 мМ и выше через 2 дня после инъекции СТЗ. Уровень глюкозы не снижался в течение 16 дней эксперимента у всех животных, получавших СТЗ. Группа Д+ИР получала однократную инъекцию СТЗ (60 мг/кг, в/в). Животных этой группы после 16-дневного эксперимента подвергали окклюзии ПНА и реперфузии, такой же длительности, как в группе ИР. Животным группы Д+ИРG вводили однократно СТЗ (60 мг/кг, в/в) и через 16 дней моделировали ИРП. Пептид G в физиологическом растворе вводили в/в в дозе 1 мг/кг болюсом в начале реперфузии. Доза G была выбрана на основе наших предыдущих результатов [11]. Крысы контрольной группы получали однократную в/в инъекцию 0.1 М цитратного буфера pH 4.5 (растворитель СТЗ). Массу тела и уровень глюкозы в крови животных экспериментальных групп определяли еженедельно. После 16-дневного исследования образцы крови собирали из хвостовой вены у крыс всех групп для определения активности КК-МВ и ЛДГ в плазме. В сердце пяти животных из групп ИР, Д+ИР и Д+ИРG гистохимическим методом оценивали размеры ЗР и ИМ. У пяти крыс из экспериментальных групп после анестезии авертином (1 мг/кг, в/б) выделяли сердце и замораживали его в жидком азоте с использованием щипцов Волленбергера для последующего анализа метаболитов. Оставшихся пять животных из этих групп использовали для определения параметров дыхания митохондрий в волокнах левого желудочка (ЛЖ) сердца. Схема экспериментального протокола показана на рис. 1.



**Рис. 1.** Схема протокола опытов. Д – крысы получали в/в инъекцию СТЗ (60 мг/кг в 0.1 М цитратном буфере pH 4.5); Д+ИР – диабетические крысы (СТЗ 60 мг/кг, в/в), подвергнутые региональной ишемии и реперфузии сердца; Д+ИРG – диабетические крысы (СТЗ 60 мг/кг, в/в), подвергнутые региональной ишемии и реперфузии сердца, получавшие G (в/в в дозе 1 мг/кг болюсом в начале реперфузии). Цитр. буф. – 0.1 М цитратный буфер pH 4.5; СТЗ – стрептозотоцин

### Модель региональной ишемии и реперфузии сердца крысы

Крысы групп ИР, Д+ИР и Д+ИРG наркотизировали 20% уретаном (1200 мг/кг веса, в/б) и в условиях торакотомии осуществляли искусственную вентиляцию легких комнатным воздухом с помощью аппарата KTR-5 (Hugo Sacks Elektronik, Германия). Контролировали среднее артериальное давление и частоту сокращений сердца. Показатели записывали в ходе опыта с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (National Instruments, США) и программы в системе LabView 7 (National Instruments). После окончания препарирования следовал период стабилизации гемодинамических показателей (30 мин). Затем животных подвергали 40-минутной окклюзии ЛНА с последующей 60-минутной реперфузией. Животным группы Д+ИРG одновременно с началом реперфузии в/в болюсом вводили пептид G в дозе 1.0 мг/кг веса. В группах ИР и Д+ИР после периода региональной ишемии в/в болюсом вводили такой же объем физиологического раствора. В конце опыта для идентификации ЗР и интактной области миокарда реокклюдировали ЛНА и в яремную вену вводили 2 мл 2% раствора Эванса. Затем вырезали сердце и выделяли левый желудочек (ЛЖ) для определения размеров ИМ.

### Определение размеров инфаркта миокарда

Замороженный ЛЖ разрезали перпендикулярно длинной оси сердца на 4–5 срезов толщиной око-

ло 1.5–2.0 мм, которые затем инкубировали в течение 10 мин в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида в 0.1 М калий-фосфатном буфере (pH 7.4 при 37°C). Полученные образцы сканировали, площади ИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу ImageJ (NIH, США). После этого срезы взвешивали для определения массы ЛЖ. В каждой группе рассчитывали отношения ЗР/ЛЖ и ИМ/ЗР в % [11].

#### Оценка повреждения мембран кардиомиоцитов

Повреждение мембран кардиомиоцитов оценивали по увеличению активности ЛДГ и КК-МВ в плазме крови. Около 0.5 мл крови собирали в гепаринизированные пробирки из венозного катетера в исходном состоянии (перед окклюзией ПНА) и после 1 ч реперфузии. Активность ферментов в плазме определяли с использованием наборов фирмы BioSystems на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) при  $\lambda = 340$  нм.

#### Дыхание пермеабиллизированных волокон миокарда

Пермеабиллизированные сапонином волокна из ЛЖ сердца крысы получали по модифицированному методу [16]. Параметры дыхания волокон ЛЖ оценивали с использованием субстратов комплекса I – 10 мМ глутамата и 5 мМ малата – с помощью системы Oxygraph plus (HansaTech Instruments, Великобритания) и выражали в нмоль  $O_2$ /мин/мг сухого веса. Скорость дыхания в состоянии 3 ( $V_3$ ) достигалась добавлением 2 мМ ADP. Сухую массу волокон определяли после сушки в течение ночи при 95°C. Параметры дыхания каждого образца волокон ЛЖ измеряли дважды. Дыхание в состоянии 2 ( $V_2$ ) оценивали по скорости потребления кислорода после добавления 10 мМ глутамата и 5 мМ малата без ADP. Функцию митохондрий оценивали по величине дыхательного контроля (ДК), который рассчитывали как отношение  $V_3/V_2$ . Целостность внешней мембраны митохондрий оценивали, добавляя 10 мкМ цитохрома c после максимальной стимуляции дыхания 2 мМ ADP, и выражали отношением  $V_{\text{cvt}}/V_{\text{ADP}}$  в %. Степень функционального сопряжения митохондриальной креатинкиназы (мт-КК) с окислительным фосфорилированием (ОФ) оценивали, добавляя 30 мМ Cr к волокнам в присутствии субмаксимальной концентрации ADP (0.1 мМ), и рассчитывали как отношение  $(V_{\text{Cr}} - V_{\text{ADP}})/V_{\text{ADP}}$  (%) [17].

#### Определение содержания метаболитов в зоне риска сердца

По окончании реперфузии ЗР быстро выделяли из ЛЖ и замораживали щипцами Волленбергера,

охлажденными в жидком азоте. Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6%  $HClO_4$  (10 мл/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Германия). Белки осаждали центрифугированием (центрифуга Sorvall RT1, Thermo Fisher Scientific, США) при 2800 g в течение 10 мин при 4°C. Супернатанты нейтрализовали 5 М  $K_2CO_3$  до pH 7.4. Осадок  $KClO_4$  отделяли центрифугированием в тех же условиях. Безбелковые экстракты хранили при -70°C до определения метаболитов. Сухой вес гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение суток при 110°C. Содержание ATP, ADP, AMP, PCr и Cr в тканевых экстрактах определяли модифицированными энзиматическими методами [18], используя спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Япония).

#### Статистическая обработка данных

Использован пакет программ SigmaPlot 11.2 (SysStat, США). Значения представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Различия между группами подтверждены статистически с применением дисперсионного анализа (ANOVA). При сравнении нескольких групп с контролем использован *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Масса тела и уровень глюкозы в крови

В исходном состоянии (1-й день эксперимента) масса крыс достоверно не различалась между группами (табл. 2). В контрольной группе за период наблюдения происходило прогрессивное увеличение массы тела животных. У крыс диабетической группы не выявлено прибавления массы тела на 9-й день исследования (через неделю после повышения содержания глюкозы в крови выше 12 мМ под действием СТЗ). В конце исследования у животных этой группы масса тела была в среднем на 11.8 и 22.1% ниже, чем в исходном состоянии и в контроле ( $p < 0.02$  и  $p < 0.001$  соответственно). Сходное изменение массы тела отмечено у животных групп Д+ИР и Д+ИРГ. Не обнаружено различий в массе тела животных диабетических групп в последний день исследования перед моделированием ИР повреждения сердца и введением пептида G.

В исходном состоянии не было достоверной разницы между концентрацией глюкозы в крови животных всех групп. Введение СТЗ повышало уровень глюкозы по сравнению с контролем в течение всего эксперимента. Через 16 дней концентрация глюкозы в крови животных группы Д в 4.5 раза

**Таблица 2.** Изменения массы тела и концентрации глюкозы в крови животных изученных групп в течение эксперимента

Группа	Масса тела, г		
	1-й день	9-й день	16-й день
К	326.2 ± 11.7	344.2 ± 3.5	379.2 ± 4.5*
Д	335.2 ± 2.5	348.7 ± 3.3*	295.5 ± 14.5* <sup>§</sup> @
ИР	340.6 ± 3.6	-	-
Д+ИР	338.2 ± 1.7	376.5 ± 2.6* <sup>@</sup>	291.3 ± 4.6* <sup>§</sup> @
Д+ИРГ	336.2 ± 2.3	380.0 ± 4.3* <sup>@</sup> #	321.2 ± 13.0 <sup>§</sup> @+
Глюкоза крови, мМ			
К	6.1 ± 0.2	-	6.3 ± 0.2
Д	5.3 ± 0.5	22.4 ± 0.8*	23.8 ± 1.7* <sup>@</sup>
ИР	5.1 ± 0.4	-	-
Д+ИР	4.9 ± 0.6	26.8 ± 3.3*	21.3 ± 5.1* <sup>@</sup>
Д+ИРГ	5.0 ± 0.2	25.0 ± 2.0*	21.5 ± 3.3* <sup>@</sup>

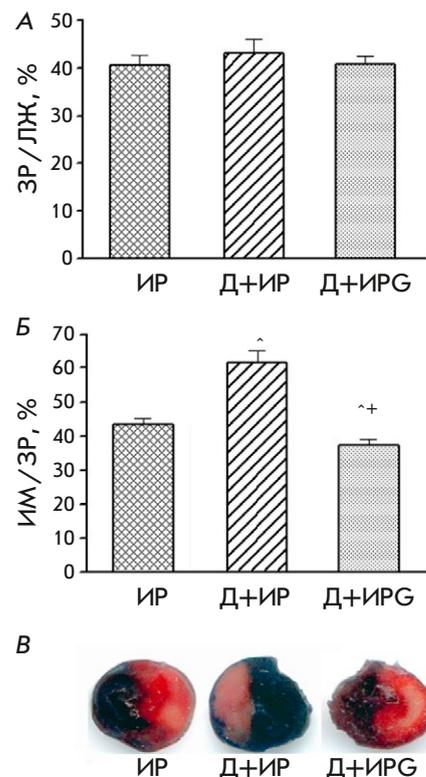
Данные представлены как  $M \pm m$  ( $n = 15$ ).  $p < 0.05$  от: \* показателя в 1-й день, <sup>§</sup> показателя на 9-й день, <sup>@</sup> контроля, # Д, + Д+ИР.

превышала исходный уровень ( $p < 0.001$ ) и в 3.8 раза значения в контрольной группе ( $p < 0.001$ ). Аналогичные изменения этого показателя наблюдали в группах Д+ИР и Д+ИРГ. Статистически значимых различий в уровне глюкозы в обеих диабетических группах перед моделированием ИР повреждения сердца не было.

### Влияние диабета и пептида G на размеры инфаркта миокарда

Гистохимический анализ срезов ЛЖ сердца в конце реперфузии не выявил различий в размерах ЗР между группами ИР, Д+ИР и Д+ИРГ (рис. 2). Величина ЗР/ЛЖ в этих группах была близкой и составляла в среднем  $41.3 \pm 1.3\%$ . Это означает, что моделирование ИР повреждения сердца было стандартным у всех животных. В группе ИР величина инфаркта, выраженная отношением ИМ/ЗР составила  $43.4 \pm 1.6\%$ . Под действием СТЗ размеры ИМ увеличивались и к окончанию эксперимента были в 1.4 раза больше этого показателя, чем в группе ИР ( $p = 0.002$ ). Реперфузия с G значительно снижала ИМ/ЗР у диабетических крыс: в группе Д+ИРГ этот показатель был на 40% ниже, чем в группе Д+ИР. На рис. 2B показана локализация некротической зоны в срезах ЛЖ после их окрашивания ТФТ. Увеличение образования пигмента красного цвета формазана в результате восстановления ТФТ  $NAD^+$  и  $NADP^+$ -зависимыми дегидрогеназами в группе Д+ИРГ указывает на снижение инфаркта под действием G.

**Рис. 2.** Размеры зоны риска (А), инфаркта миокарда (Б) срезы ЛЖ (В), окрашенные 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом в конце реперфузии, в группах с региональной ишемией и реперфузией. Показаны  $M \pm m$  для групп из пяти животных.  $p < 0.05$  по сравнению с: ^ ИР, + Д+ИР

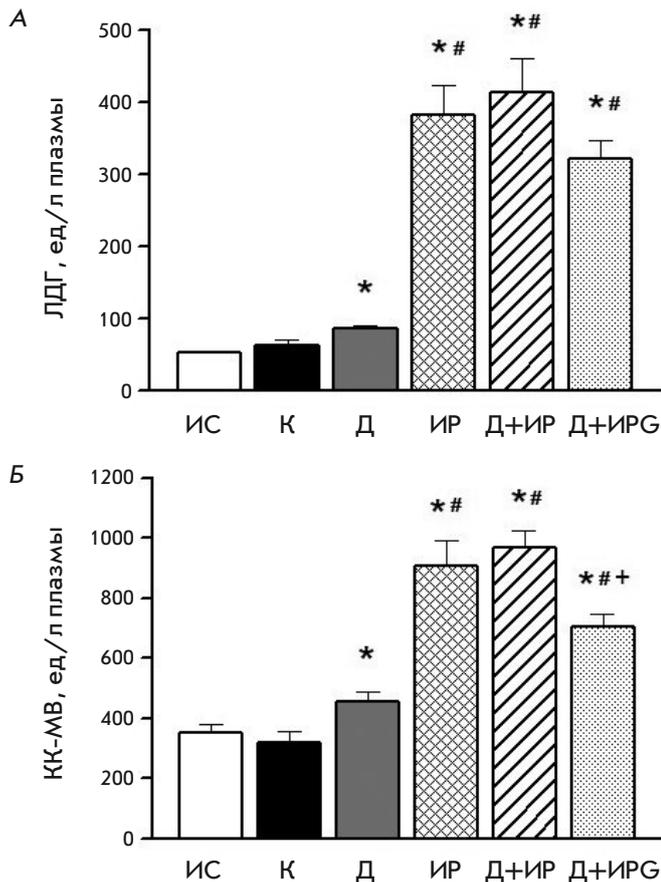


### Активность КК-МВ и ЛДГ в плазме крови

Активности КК-МВ и ЛДГ у крыс контрольной группы не отличались от значений в исходном состоянии (рис. 3А,Б). Развитие диабета в результате введения СТЗ приводило к значимому увеличению активности КК-МВ и ЛДГ к окончанию эксперимента по сравнению с контролем ( $p = 0.027$  и  $p = 0.046$  соответственно). Моделирование ИР повреждения сердца значительно увеличивало активности КК-МВ и ЛДГ к окончанию реперфузии по сравнению с этими показателями в контроле ( $p < 0.001$ ). Эти значения были соответственно в 2.0 и 4.4 раза выше, чем в диабетической группе ( $p < 0.001$ ). Региональная ишемия и реперфузия сердца у диабетических животных группы Д+ИР не вызывала значимого увеличения активности маркеров некроза по сравнению с группой ИР. Болюсное в/в введение G в начале реперфузии снижало активность КК-МВ по сравнению с этим показателем в группе Д+ИР в 1.4 раза ( $p = 0.006$ ). Активность ЛДГ в группе Д+ИРГ под действием G по сравнению с этим показателем в группе Д+ИР снижалась недостоверно ( $p = 0.085$ ).

### Параметры дыхания волокон миокарда, сканированных сапонином

После 16 дней эксперимента отсутствовали различия в скорости дыхания в состоянии 2, состоянии 3, величине ДК и степени функциональной связи мт-КК с ОФ между этими показателями в контрольной



**Рис. 3.** Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, А) и креатинкиназы-МВ (КК-МВ, Б) в плазме крови крыс. Представлены значения  $M \pm m$  для групп из пяти животных.  $p < 0.05$  по сравнению с: \* К, # Д, + Д+ИР

группе и в исходном состоянии (рис. 4). У крыс, получавших СТЗ, наблюдалось снижение  $V_2$  и особенно  $V_3$  (на 28 и 60% по сравнению с контролем соответственно,  $p < 0.05$  и  $p < 0.001$ ). Результатом этого было двукратное снижение ДК ( $p < 0.001$ ). Степень функциональной активности мт-КК, оцененная в Cr-тесте, у животных с диабетом снижалась в 1.6 раза по сравнению с контролем ( $p < 0.001$ ). Сходные изменения дыхательной функции митохондрий ЗР вызывало ИРП сердца. Средние значения параметров дыхания в этом случае не отличались значимо от значений в группе Д. Совместное воздействие СТЗ и ИРП ухудшало дыхание в состоянии 2 и 3 по сравнению с этими показателями у крыс диабетической группы ( $p = 0.038$  и  $p < 0.01$  соответственно) и у животных с ИРП ( $p = 0.022$  и  $p = 0.004$  соответственно). Это приводило к уменьшению ДК по сравнению с группой Д и ИР ( $p = 0.037$  и  $p = 0.05$  соответственно). Функциональная активность мт-КК в группе Д+ИР была заметно ниже, чем в группах Д и ИР, однако различия между этими группами были статистически недостоверными. Введение пептида G диабетическим

животным после региональной ишемии миокарда увеличивало максимальное ADP-стимулированное состояние 3 и ДК в 2.3 и 1.6 раза по сравнению с этими показателями в группе Д+ИР ( $p = 0.011$  и  $p = 0.022$  соответственно). Функциональная связь мт-КК с ОФ в группе Д+ИРГ возрастала в 2.4 раза по сравнению с группой Д+ИР. Репрезентативные протоколы дыхания, демонстрирующие изменения в состоянии 3 в изученных группах, показаны в Приложениях (рис. S3). Добавление 10 мкМ цитохрома с не влияло на ADP-стимулированное дыхание в группах Д, Д+ИР и Д+ИРГ в конце эксперимента по сравнению с контролем. Процентное отношение  $V_{\text{цит с}}/V_{\text{ADP}}$  в этих группах составило в среднем  $103.5 \pm 1.9\%$ , что свидетельствует об отсутствии повреждения наружной мембраны МХ под влиянием СТЗ и ИР.

### Энергетическое состояние миокарда

В контроле содержание АТФ, АДФ, АМФ, PCr и Cr в ЛЖ сердца после 16-дневного эксперимента не отличалось статистически значимо от исходных величин (табл. 3). У животных диабетической группы отмечено достоверное снижение содержания АТФ,  $\Sigma$ AN, PCr и  $\Sigma$ Cr по сравнению с этими показателями в контроле ( $p < 0.05$ – $0.001$ ). Более сильное воздействие на АТФ и  $\Sigma$ AN в ЗР оказывало ИРП сердца. В этом случае снижение этих параметров было в среднем в 1.3 раза больше, чем в контроле ( $p < 0.003$  и  $p < 0.002$  соответственно). Введение СТЗ и последующая региональная ишемия и реперфузия сердца увеличивали потери АТФ и  $\Sigma$ AN в ЗР по сравнению с этими показателями в сердце животных диабетической группы ( $p = 0.001$  и  $p = 0.008$  соответственно). Эти изменения в содержании адениннуклеотидов приводили к снижению аденилатного энергетического заряда (АЭЗ) кардиомиоцитов по сравнению со снижением в группах Д и ИР ( $p < 0.01$  и  $p < 0.001$  соответственно). Отсутствовали достоверные изменения в системе PCr–Cr в ЗР животных группы Д+ИР по сравнению с группами Д и ИР. Введение пептида G животным диабетической группы в начале реперфузии улучшало энергетическое состояние ЗР к окончанию реперфузии. Это проявлялось в поддержании более высокого уровня АТФ и  $\Sigma$ AN по сравнению с этими показателями в группе Д+ИР (в 1.4 и 1.25 раза,  $p = 0.023$  и  $p = 0.04$  соответственно) и достоверно более высокому АЭЗ кардиомиоцитов ( $p = 0.022$ ). Под действием пептида G содержание  $\Sigma$ Cr в ЗР было выше, чем группе Д+ИР ( $p = 0.007$ ) и достоверно не отличалось от значения в контроле.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование СД1 у крыс введением СТЗ помимо гипергликемии и отсутствия прироста массы

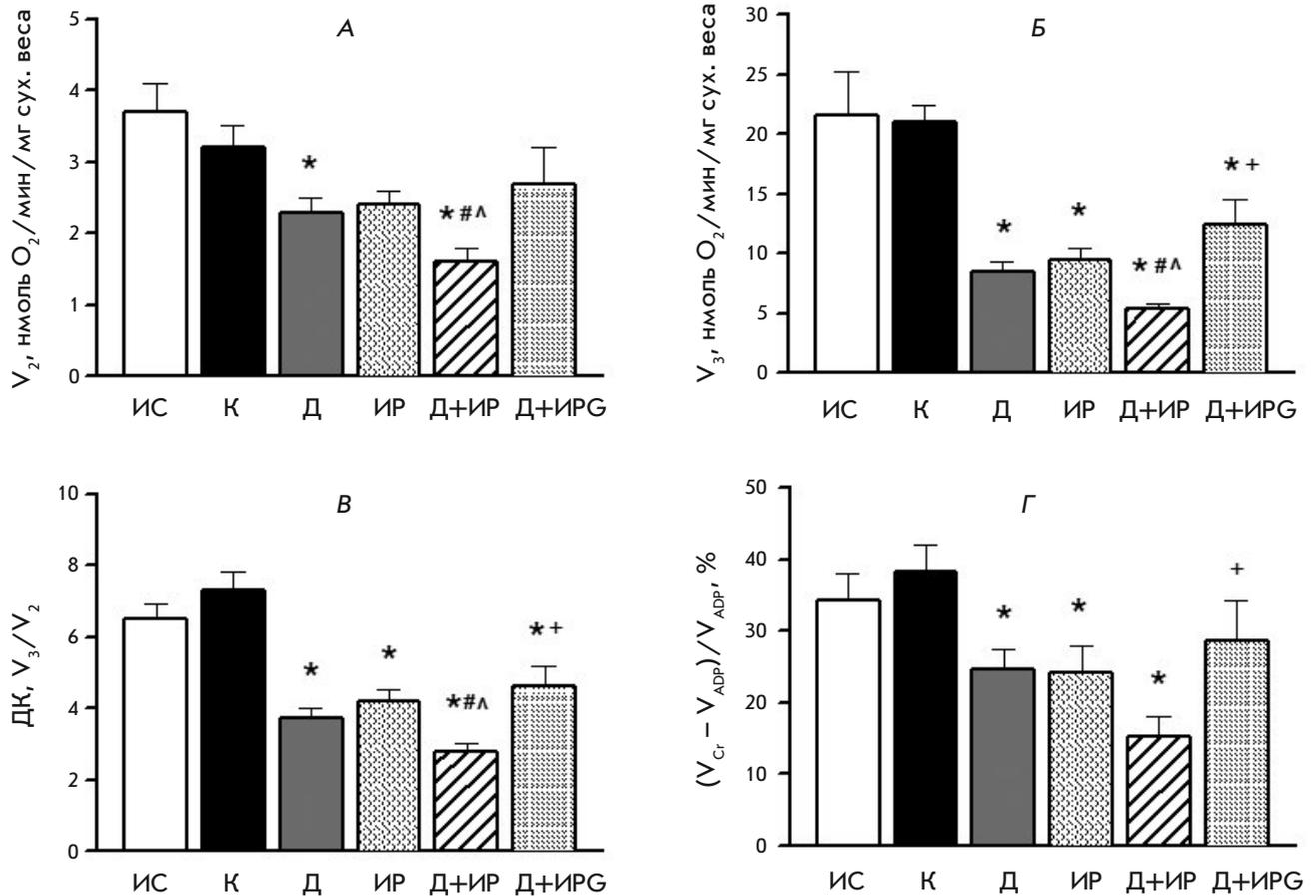


Рис. 4. Параметры митохондриального дыхания в скинированных сапонином волокнах ЛЖ в присутствии 10 мМ глутамата и 5 мМ малата. А – скорость потребления кислорода в состоянии 2 ( $V_2$ ); Б – скорость потребления кислорода в состоянии 3 ( $V_3$ ); В – дыхательный контроль ДК =  $V_3/V_2$ ; Г – степень связывания мт-КК с ОФ ( $(V_{Cr} - V_{ADP})/V_{ADP}$ , %). Значения представлены как  $M \pm m$  для групп из пяти животных.  $p < 0.05$  по сравнению с: \*К; # Д; ^ ИР; + Д+ИР

Таблица 3. Энергетическое состояние миокарда крыс в изученных группах

Показатель	ИС	К	Д	ИР	Д+ИР	Д+ИРГ
АТР	20.16±1.27	19.16±1.56	14.53±1.21*	10.34±1.45*	8.11±0.44**	11.27±1.04**+
АДР	5.47±0.43	5.36±0.53	4.93±0.68	4.54±0.51	4.98±0.27	5.69±0.34
АМР	1.03±0.14	1.13±0.24	1.02±0.27	0.97±0.14	1.75±0.28^	2.20±0.15**^
ΣАН	26.66±1.87	25.68±1.90	20.43±1.24*	15.86±1.12**	14.83±1.02*#	18.68±1.35**+
АЭЗ	0.85±0.01	0.85±0.02	0.82±0.01	0.79±0.02	0.71±0.01**^	0.75±0.01**+
PCr	25.34±1.98	25.29±1.39	15.62±0.95*	13.86±2.02*	17.06±1.54*	18.89±1.25*
Cr	37.21±2.77	34.98±1.36	32.54±2.77	31.54±2.67	30.57±1.47	34.42±2.41
ΣCr	62.55±2.15	60.27±1.37	48.16±2.03*	45.40±2.33*	47.63±0.74*	52.86±1.26**+

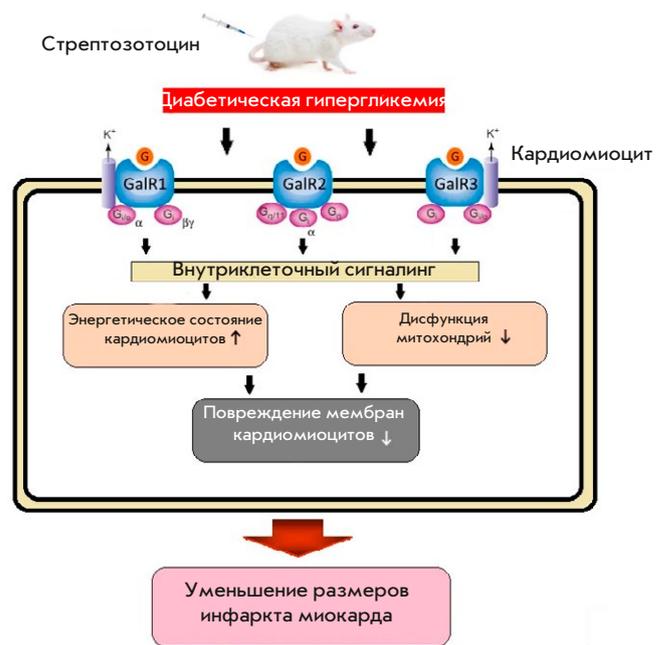
Данные представлены как  $M \pm m$  ( $n=5$ ) и выражены для метаболитов в мкмоль/г сух. веса. ИС – исходное состояние.  $\Sigma AN = ATP + ADP + AMP$ ;  $AЭЗ = (ATP + 0.5 ADP) / \Sigma AN$ ;  $\Sigma Cr = PCr + Cr$ .  $p < 0.05$  от: \* К и ИС, # Д, ^ ИР, + Д+ИР.

тела сопровождалось истощением запасов макроэргических фосфатов и сопутствующим снижением  $\Sigma AN$  и  $\Sigma Cr$  в сердце. Обнаруженные нарушения энергетического обеспечения кардиомиоцитов сочетались с глубоким снижением максимально-

го ADP-стимулированного потребления кислорода в состоянии 3 и уменьшением функциональной активности мт-КК, оцененной в тесте с Cr. Обычно такие изменения дыхания митохондрий связывают с ограничением продукции АТР [19] и уве-

личением образования АФК [20]. Действие СТЗ-индуцированного диабета сопровождалось увеличением уровня циркулирующих КК-МВ и ЛДГ, что свидетельствовало о повреждении миокарда. Повышенная активность КК-МВ и ЛДГ в плазме была обнаружена ранее на моделях диабетической кардиомиопатии, вызванной введением СТЗ лабораторным животным [21], и у пациентов с диабетом [22]. Последующая региональная ишемия и реперфузия сердца у крыс, получавших СТЗ, вызывала увеличение некротического повреждения ЛЖ (до 25.6%) и значительное возрастание активности обоих маркеров некроза в плазме по сравнению с диабетическими животными. Некротическая гибель кардиомиоцитов в ЗР сопровождалась ухудшением дыхательной функции митохондрий, большими потерями АТФ и  $\Sigma$ AN, чем у крыс с диабетом, и снижением АЭЗ кардиомиоцитов к окончанию реперфузии. Следует отметить, что совместное воздействие СТЗ и ИР существенно увеличивало размеры инфаркта, выраженные отношением ИМ/ЗР (%), по сравнению только с одной региональной ишемией и реперфузией.

Настоящая работа впервые продемонстрировала защитное действие введения G в начале реперфузии после периода региональной ишемии у крыс с СД1. G существенно уменьшал размеры ИМ и активность КК-МВ в плазме этих крыс по сравнению с животными диабетической группы Д+ИР. Эти эффекты могли быть обусловлены в том числе снижением дисфункции митохондрий, на что указывает увеличение АДР-стимулированного дыхания в состоянии 3, ДК и улучшение функционального сопряжения мт-КК с ОФ. В результате происходило повышение уровня АТФ,  $\Sigma$ AN и АЭЗ кардиомиоцитов и лучшее сохранение  $\Sigma$ Cr в ЗР. Ранее мы обнаружили способность G уменьшать реперфузионное повреждение сердца крысы *in situ*, которая выражалась в ограничении размеров ИМ и снижении повреждения мембран кардиомиоцитов [23]. Она была связана со снижением образования активных форм кислорода (АФК) и продуктов ПОЛ в реперфузированном миокарде. В настоящей работе избыточная продукция АФК и ПОЛ, индуцированная диабетической гипергликемией и последующей региональной ишемией и реперфузией сердца, могла быть ведущей причиной дисфункции митохондрий и некротической гибели клеток [24]. Не исключено, что защитное действие G может быть обусловлено его антиоксидантными свойствами – усилением экспрессии генов *SOD*, *CAT* и *GSH-Px*, кодирующих ферменты системы антиоксидантной защиты сердца, и/или способностью перехватывать АФК и ингибировать ПОЛ [12, 23].



**Рис. 5.** Активация внутриклеточной сигнализации G при стрептозотоциновой гипергликемии у крыс снижает митохондриальную дисфункцию, улучшает энергетическое состояние миокарда и уменьшает повреждение клеточных мембран в зоне риска реперфузированного сердца, что приводит к уменьшению размеров инфаркта

Помимо регуляции свободнорадикальных процессов, активация G различных путей сигнализации при связывании с рецепторами GalR1-3 может способствовать уменьшению повреждения клеток [10]. Это принципиально важно, поскольку диабет нарушает внутриклеточные сигнальные каскады, активируемые RISK-киназами, ответственные за повышение резистентности клеток к повреждениям и прежде всего сигнальный путь PI3K/Akt [2, 3]. Основные звенья внутриклеточного сигналинга, активируемого G, показаны в Приложениях (рис. S4). Наиболее физиологически значимые из них приводят к стимуляции захвата глюкозы кардиомиоцитами, ингибированию проапоптотических белков BAD/BAK, каспазы-3 и каспазы-9, блокированию открытия митохондриальной поры временной проницаемости (mPTP) и увеличению экспрессии рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR). Запуск этих адаптационных механизмов имеет решающее значение в условиях сниженной продукции АТФ при диабете и реперфузии сердца [25]. Как известно, снижение апоптоза кардиомиоцитов в моделях *in vivo* сопровождается ограничением размеров ИМ и улучшением сократительной функции сердца [26], ингибирование открытия mPTP способствует выживанию и подвижности клеток [27], а экспрессия PPAR $\gamma$  стимулирует поглощение

и окисление глюкозы кардиомиоцитами [28]. На рецепторную природу действия G указывает и тот факт, что блокада рецептора GalR2 селективным антагонистом M871 при ИПП сердца значительно ослабляла защитный потенциал G, увеличивая размеры ИМ и активность маркеров некроза в плазме [11]. В этом контексте важно, что действие полноразмерного галанина, связывающегося со всеми подтипами его рецепторов GalR1-3, воспроизводится N-концевыми природными и модифицированными фрагментами G, обладающими высокой аффинностью к GalR2 [10]. Это указывает на потенциальную роль активации GalR2 для лечения/профилактики ИПП миокарда у пациентов с СД.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа подтверждает влияние стрептозотоцинового диабета на восприимчивость миокарда крыс к ИПП. Показано, что в этих условиях введение G при возобновлении реперфузии значительно снижало ИМ. Этот эффект связан с запуском внутриклеточной сигнализации через сопряженные с G-белками трансмембранные рецепторы GalR1, GalR2 и GalR3 (рис. 5). Защитное действие G

проявлялось в уменьшении дисфункции митохондрий, результатом которой было улучшение энергетического состояния реперфузированной области миокарда. Эти положительные сдвиги в энергетике миокарда сопровождалась снижением повреждения клеточных мембран. В целом, полученные результаты указывают на потенциальную возможность применения G в качестве дополнительной терапии при СД1 с ИПП миокарда. В связи с этим дальнейшее изучение молекулярных механизмов снижения реперфузионного стресса в диабетическом сердце с помощью природных и модифицированных пептидов галанина представляется важной задачей. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00008) и Минздрава РФ (НИОКТР 121031700143-1).*

*Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующих раскрытия в данной статье.*

*Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27506>.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dia M., Paccalet A., Pillot B., Leon Ch., Ovize M., Claire C., Bochaton Th., Paillard M. // *Front. Cardiovasc. Med.* 2021. V. 8. P. 660698.
- Lejay A., Fang F., John R., Thaveau F., Chakfe N., Geny B., Scholey J. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016. V. 91. P. 11–22.
- Gao S., Wang R., Dong S., Wu J., Perek B., Xia Z., Yao Sh., Wang T. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021. P. 6657529.
- Ding M., Lei J., Han H., Li W., Qu Y., Fu E., Fu F., Wang X. // *Cardiovasc. Diabetol.* 2015. V. 14. P. 143.
- Li D., Huang B., Liu J., Li L., Li X. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e73334.
- Riquelme J.A., Westermeier F., Hall A.R., Vicencio J.M., Pedrozo Z., Ibacache M., Fuenzalida B., Sobrevia L., Davidson S.M., Yellon D.M., et al. // *Pharmacol. Res.* 2016. V. 103. P. 318–327.
- Díaz-Cabiale Z., Parrado C., Narváez M., Millón C., Puigerver A., Fuxe K., Narváez J.A. // *EXS.* 2010. V. 102. P. 113–131.
- Lang R., Gundlach A.L., Holmes F.E., Hobson S.A., Wynick D., Hökfelt T., Kofler B. // *Pharmacol. Rev.* 2015. V. 67. P. 118–175.
- Webling K.E., Runesson J., Bartfai T., Langel U. // *Front. Endocrinol.* 2012. V. 3. P. 146.
- Pisarenko O.I., Studneva I.M., Veselova O.M. // *Biochemistry (Moscow).* 2021. V. 86. № 10. P. 1342–1351.
- Serebryakova L., Veselova O., Studneva I., Dobrokhotov I., Palkeeva M., Avdeev D., Molokoedov A., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2022. V. 37. № 6. P. 1109–1118.
- Pisarenko O.I., Studneva I.M., Serebryakova L.I., Timoshin A.A., Konovalova G.G., Lankin V.Z., Tihaze A.K., Veselova O.M., Dobrokhotov I.V., Sidorova M.V., et al. // *Biochemistry (Moscow).* 2021. V. 86. № 4. P. 496–505.
- Veselova O., Studneva I., Dobrokhotov I., Palkeeva M., Molokoedov A., Sidorova M., Pisarenko O. // *Int. J. Peptide Res. Therap.* 2022. V. 28. P. 103.
- Sidorova M.V., Palkeev M.E., Avdeev D.V., Molokoedov A.S., Ovchinnikov M.V., Azmuko A.A., Serebryakova L.I., Veselova O.M., Studneva I.M., Pisarenko O.I. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 32–42.
- Chen H., Brahmabhatt S., Gupta A., Sharma A. // *Cardiovasc. Diabetol.* 2005. V. 4. P. 3.
- Saks V.A., Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Kay L., Sikk P., Tiivel T., Tranqui L., Olivares J., Winkler K., Wiedemann F., et al. // *Mol. Cell. Biochem.* 1998. V. 184. № 1–2. P. 81–100.
- Kuznetsov A.V., Veksler V., Gellerich F.N., Saks V., Margreiter R., Kunz W.S. // *Nat. Prot.* 2008. V. 3. № 6. P. 965–976.
- Bergmeyer H.U. *Methods of enzymatic analysis.* 4th edn. N.Y.: Acad. Press, 1974. pp. 1196–1200, 1475–1478, 1772–1776, 1777–1781, 2101–2110.
- Avram V.F., Merce A.P., Hâncu I.M., Bătrân A.D., Kennedy G., Rosca M.G., Muntean D.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 8852.
- Dominiak K., Jarmuszkiewicz W. // *Antioxidants.* 2021. V. 10. № 3. P. 533.
- Huang E.J., Kuo W.W., Chen Y.J., Chen T.H., Chang M.H., Lu M.C., Tzang B.S., Hsu H.H., Huang C.Y., Lee S.D. // *Clin. Chim. Acta.* 2006. V. 366. P. 293–298.
- Fuleshwar M., Pratik A., Deepak K. // *Sciences.* 2013. V. 3. P. 51–54.
- Serebryakova L., Studneva I., Timoshin A., Veselova O., Palkeeva M., Ovchinnikov M., Azmuko A., Molokoedov A., Sidorova M., Pisarenko O. // *Inter. J. Pept. Res. Ther.* 2021. V. 27. P. 2039–2048.
- Münzel T., Camici G.G., Maack C., Bonetti N., Fuster V., Kovacic J. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017. V. 70. P. 212–229.
- Tian R., Abel E.D. // *Circulation.* 2001. V. 103. P. 2961–2966.
- Krijnen P.A., Nijmeijer R., Meijer C.J., Visser C.A., Hack C.E., Niessen H.W.M. // *J. Clin. Pathol.* 2002. V. 55. P. 801–811.
- Hausenloy D.J., Yellon D.M. // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 203. P. 123.
- Jay M.A., Ren J. // *Curr. Diab. Rev.* 2007. V. 3. P. 33–39.

УДК 577.2

# Сочетание доксорубина в низкой дозе и SLURP-1 усиливает их противоопухолевый эффект и ассоциируется со снижением экспрессии EGFR

О. В. Шлепова<sup>1</sup>, М. Л. Бычков<sup>1</sup>, В. О. Шипунова<sup>1,2</sup>, Е. И. Шрамова<sup>1</sup>, М. А. Шулепко<sup>3</sup>, Т. Я. Горностаева<sup>1,2</sup>, Е. А. Киселева<sup>1,2</sup>, И. Д. Кукушкин<sup>1,2</sup>, В. А. Казаков<sup>4</sup>, Е. А. Туховская<sup>4</sup>, И. А. Дьяченко<sup>4</sup>, А. Н. Мурашев<sup>4</sup>, З. О. Шенкарев<sup>1,2</sup>, С. М. Деев<sup>1,5,6</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,7</sup>, Е. Н. Люкманова<sup>1,2,3,7\*</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

<sup>2</sup>Московский центр перспективных исследований, Москва, 123592 Россия

<sup>3</sup>Биологический факультет, Шэньчжэньский МГУ-ППИ Университет, провинция Гуандун, Шэньчжэнь, 518172 Китай

<sup>4</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, 142290 Россия

<sup>5</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

<sup>6</sup>Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, 430005 Россия

<sup>7</sup>Междисциплинарная научно-образовательная школа «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология», биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

\*E-mail: lyukmanova\_ekaterina@smbu.edu.cn

Поступила в редакцию 30.09.2024

Принята к печати 15.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27526

**РЕФЕРАТ** Злокачественные опухоли кожи, такие как плоскоклеточная карцинома (SCC), характеризуются высокой скоростью роста, метастазированием и часто встречающейся химиорезистентностью. Курение считается одним из факторов риска развития SCC, а никотиновый ацетилхолиновый рецептор типа  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ -nAChR) – перспективной мишенью для терапии SCC. Секретируемый белок SLURP-1 человека является ауто/паракринным регулятором эпителиального гомеостаза и селективным отрицательным аллостерическим модулятором  $\alpha 7$ -nAChR. Недавно мы продемонстрировали высокую эффективность терапии на основе рекомбинантного SLURP-1 для контроля роста и метастазирования клеток SCC *in vivo*. Противоопухолевый эффект SLURP-1 был опосредован взаимодействием как с  $\alpha 7$ -nAChR, так и с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). Цитотоксический антибиотик доксорубин используется для лечения SCC, однако его применение ограничено из-за высокой токсичности. Нами изучено использование повышенной дозы SLURP-1 и комбинации SLURP-1 с низкой дозой доксорубина для лечения SCC у мышей, которым ксенотрансплантировали клетки эпидермоидной карциномы A431. Увеличение дозы SLURP-1 не привело к существенному повышению эффективности терапии. Однако комбинация с доксорубином усиливала противоопухолевую активность SLURP-1 и значительно подавляла метастазирование. Эффект от комбинированной терапии сопровождался снижением экспрессии EGFR в опухолях. Показано прямое ингибирование активации EGFR белком SLURP-1. Токсичность комбинированной терапии не выявлена. Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности применения SLURP-1 в комбинации с химиотерапией в низких дозах при SCC и требуют дальнейшего изучения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рак, химиотерапия, SLURP-1, Lu6/uPAR,  $\alpha 7$ -nAChR, EGFR.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АКТ – протеинкиназа В; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; cSCC – плоскоклеточная карцинома кожи; STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции 3.

## ВВЕДЕНИЕ

Частота возникновения рака кожи, в том числе плоскоклеточного (cSCC), и смертность, связанная с ним, растут во всем мире [1]. Основные проблемы в лечении cSCC – невозможность полного хирургического удаления опухоли, метастазирование и развитие резистентности к химиотерапевтическим препаратам [1–4]. Курение является одним из факторов риска развития cSCC [5], а никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), активируемые при употреблении табака, считаются перспективными терапевтическими мишенями при cSCC. Известно, что nAChR типа  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ -nAChR) является проонкогенным рецептором [6–9], экспрессия которого в опухолевых клетках повышена по сравнению с нормальными [10] и коррелирует с плохим прогнозом выживания пациентов [11, 12]. Активация  $\alpha 7$ -nAChR способствует пролиферации, ангиогенезу, миграции и инвазии клеток карциномы и глиомы [8, 12–19]. В раковых клетках  $\alpha 7$ -nAChR может образовывать гетеромерные комплексы с другим проонкогенным рецептором – рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) [20–23]. Более того, активация  $\alpha 7$ -nAChR никотином способствует химиорезистентности и метастазированию SCC через трансактивацию EGFR [24].

Некоторые эндогенные белки семейства Lu6/uPAR [25] модулируют активность  $\alpha 7$ -nAChR и могут рассматриваться как прототипы селективных и нетоксичных противоопухолевых препаратов. Одним из таких модуляторов является секретиремый белок SLURP-1 эпителия человека [26], который регулирует гомеостаз клеток эпителия [27]. Экспрессия SLURP-1 снижена в первичной и метастатической меланоме по сравнению с нормальными клетками [28, 29], а повышенный уровень SLURP-1 в плазме крови коррелирует с лучшим прогнозом выживаемости при раке поджелудочной железы [30]. Рекombinantный аналог SLURP-1 ингибирует рост раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [21, 22, 30–35], а также отменяет индуцированную никотином пролиферацию клеток аденокарциномы легкого [36]. Противоопухолевый эффект SLURP-1 в модели SCC *in vivo* опосредован взаимодействием как с  $\alpha 7$ -nAChR, так и с EGFR [22].

Ранее предложили использовать в терапии SCC доксорубин (ДНК-интеркалирующий антрацикли-

новый антибиотик, опосредованно ингибирующий сигнализацию EGFR [37, 38]), который демонстрирует комплексный антипролиферативный эффект [39, 40]. Однако его применение сильно ограничено высокой токсичностью [41]. Снижение дозы доксорубина может стать хорошей стратегией, позволяющей избежать побочных эффектов.

В данной работе мы исследовали возможность использования комбинации SLURP-1 и доксорубина в низких дозах для контроля роста и метастазирования клеток SCC *in vivo*. Помимо высокой эффективности предложенной терапии, наблюдали снижение экспрессии EGFR в опухолях мышей, получавших SLURP-1 в комбинации с доксорубином. Полученные данные свидетельствуют о высоком противоопухолевом потенциале предложенного подхода.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы и животные

Рекombinantный SLURP-1 получен в клетках *E. coli* как описано ранее [31, 42].

В работе использовали доксорубин производства компании TEVA (Израиль).

Животных содержали в стандартных условиях питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, аккредитованного на международном уровне AAALACi. Все исследования проводили в соответствии с этическими рекомендациями Rus-LASA, одобренными комиссией по контролю за содержанием и использованием животных ИБХ РАН (протокол № 318/2021).

### Культивирование клеток и анализ миграции в модели «заживление раны» *in vitro*

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 (ATCC, США) выращивали (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США), сокращенно «полная среда». Клетки пересеивали 2 раза в неделю.

Миграцию клеток оценивали с помощью «скретч»-анализа как описано ранее [21, 43]. На полученных с помощью CloneSelect Imager (Molecular Devices, США) изображениях количественно оценивали площадь царапины, занятую клетками, с помощью

ImageJ (НИН, США). Данные нормировали на среднюю площадь, занятую клетками, в контрольных лунках. Полученные данные аппроксимировали с помощью уравнения Хилла.

### Модель ксенотрансплантации опухоли, стратегия лечения и прижизненная биолюминесцентная визуализация

Для получения люминесцирующих клеток A431/NanoLuc родительские клетки A431 трансфицировали плазмидой NanoLuc, как описано в [44], с использованием реагента для трансфекции FuGENE HD (Promega, США).

Самцам мышей BALB/c Nu/Nu (22–25 г) подкожно вводили  $10^7$  клеток A431/NanoLuc, разведенных в 100 мкл 30% матригеля (Corning, США) в полной среде. На 3-й день после инъекции клеток мышей делили на пять групп (исходно  $n = 8-10$ , табл. S1) и вводили внутривенно ежедневно в течение 10 последующих дней по 100 мкл 0.9% раствора NaCl (физ. раствор), содержащего: 1) без добавок – контроль, 2) 100 мкг SLURP-1 (5 мг/кг), 3) 10 мкг SLURP-1 (0.5 мг/кг), 4) 50 мкг доксорубина (2.5 мг/кг), 5) 5 мкг доксорубина (0.25 мг/кг) с 10 мкг SLURP-1 (0.5 мг/кг) (рис. 1A). Некоторые животные погибли во время эксперимента (табл. S1 и рис. S1) и были исключены из анализа.

Объем первичной опухоли измеряли штангенциркулем и рассчитывали с помощью формулы:

$$V = 0.52 \times A \times B^2$$

( $A$  – наибольший диаметр,  $B$  – наименьший диаметр).

На 3-й, 13-й и 23-й дни после подкожной инъекции клеток опухоль визуализировали с помощью компьютерной томографии IVIS Spectrum (Perkin Elmer, США) как описано ранее [22]. Изображения биолюминесценции получали с помощью камеры IS1803N7357 iKon (Andor, Великобритания), интенсивность биолюминесценции представляли в фотонах в секунду на см<sup>2</sup> встерадиан (ф/с/см<sup>2</sup>/ср) и анализировали с помощью программы Living Image 4.5.5.19626 (Xenogen, США).

На 24-й день после инъекции клеток мышей умерщвляли путем дислокации шейных позвонков, опухоли отделяли и замораживали при  $-150^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего анализа. Легкие, печень, почки, селезенку и сердце извлекали и помещали в 4% раствор параформальдегида (Applichem, Испания).

### Вестерн-блоттинг

Для анализа влияния SLURP-1 и доксорубина на экспрессию EGFR образец опухоли (0.05 мг)

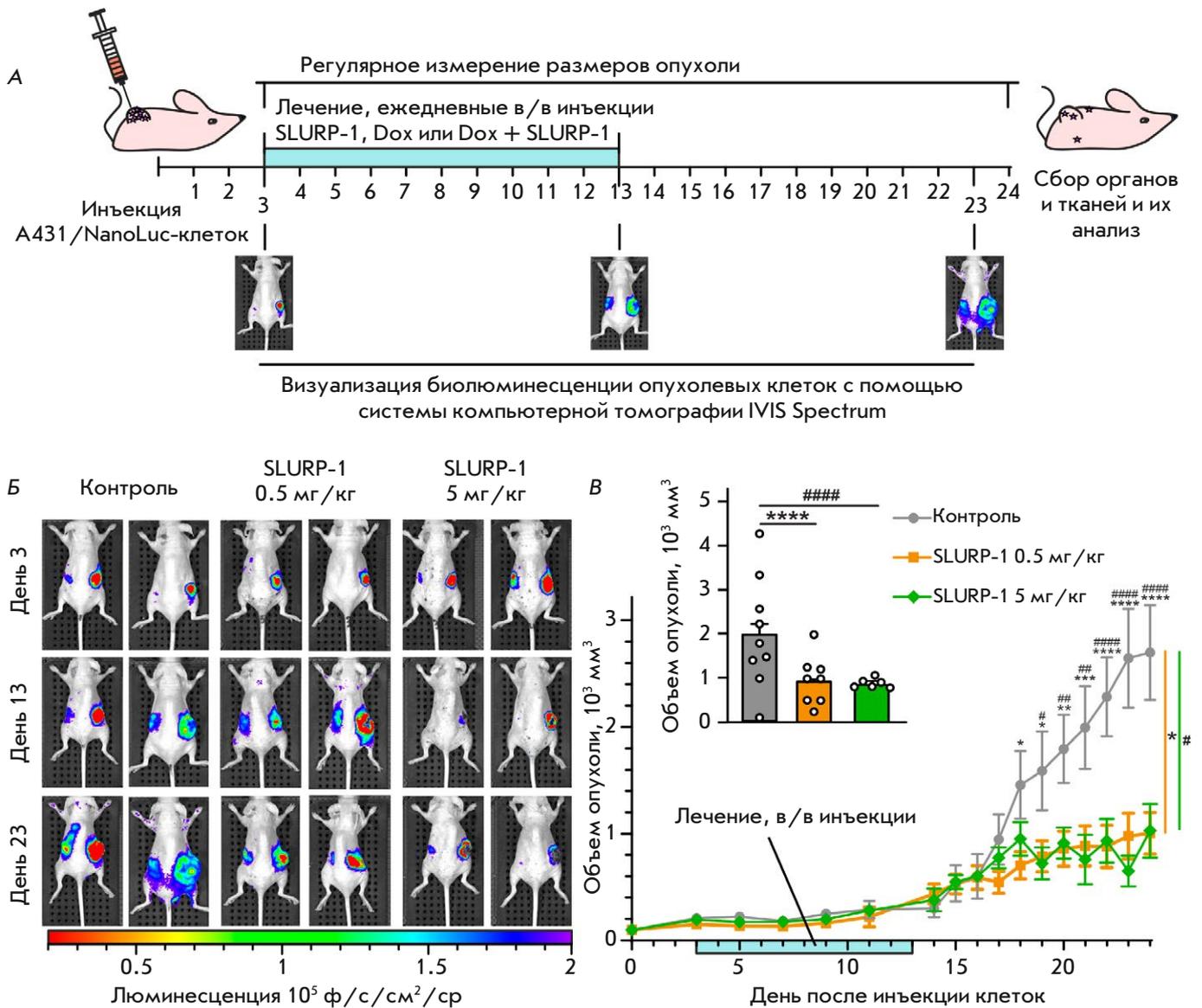
гомогенизировали, солюбилизировали в 2% Triton X-100 и разводили в невосстанавливающем буфере для ПААГ. Вестерн-блоттинг проводили с использованием первичных антител (sc-120, Santa Cruz, США, 1:1000) и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) (715-035-150, Jackson ImmunoResearch, США, 1:5000). Сигнал детектировали с помощью субстрата ECL (Bio-Rad, США) с использованием гель-документирующей системы ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ 1.53t (НИН, США).

### Клеточный иммуноферментный анализ

Изучали влияние SLURP-1 на активацию EGFR. Клетки A431 высевали в 96-луночные планшеты ( $1 \times 10^4$  клеток/лунку), через 24 ч среду в лунках заменяли на бессывороточную среду, а еще через 24 ч – на среду, содержащую SLURP-1 в различных концентрациях. Через 30 мин добавляли 25 нМ эпидермального фактора роста (EGF) к клеткам и инкубировали еще 3 ч. Далее клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (PBS), блокировали 2% бычьим сывороточным альбумином (BSA) и 0.1% Triton X-100 в PBS, инкубировали с первичными антителами против фосфо-EGFR (Y1173) (ABIN343717, antibodies-online, 1:1000) и вторичными антителами (715-035-150, Jackson ImmunoResearch, 1:5000), добавляли по 50 мкл раствора тетраметилбензидина (ТМБ), останавливали реакцию 2 М раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и определяли абсорбцию в лунках при 450 нм с помощью планшетного ридера AMR-100 (Allsheng, Китай).

### Гистохимия

Для гистохимического анализа образцы легких, печени, почек, селезенки и сердца от трех случайно выбранных мышей из каждой группы, получавших физиологический раствор (контроль), SLURP-1 (5 мг/кг), доксорубин (2.5 мг/кг) или SLURP-1 (0.5 мг/кг) + доксорубин (0.25 мг/кг), фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, промывали в проточной водопроводной воде, обезжировали в этаноле восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, изучали с помощью световой микроскопии на микроскопе AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии гистологических препаратов получали с помощью камеры высокого разрешения AxioCam 305 color (Carl Zeiss) и программного обеспечения ZEN 2.6 lite (Carl Zeiss) при увеличении  $\times 200$ .

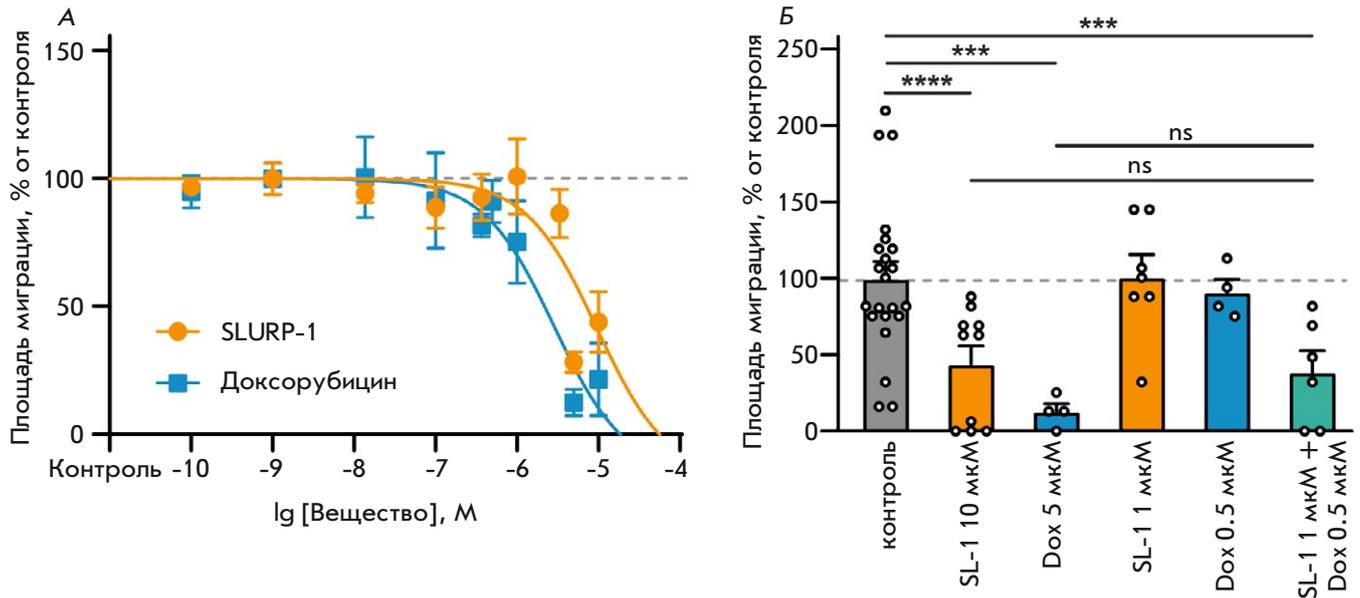


**Рис. 1.** Влияние различных доз SLURP-1 на рост опухоли в ксенографтной мышинной модели.

**А** – схема введения препаратов и измерения роста опухоли.

**Б** – репрезентативные изображения билюминесценции опухоли (клетки A431/NanoLuc) до аппликации SLURP-1 (3-й день после инъекции клеток, 1-й день терапии), после аппликации (13-й день после инъекции клеток, следующий день после окончания 10-дневной терапии) и перед эвтаназией (23-й день после инъекции клеток). Все изображения мышей см. на рис. S1.

**В** – измерение объема первичной опухоли с помощью штангенциркуля. Данные представлены в мм<sup>3</sup> ± SEM. \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ) и \*\*\*\*( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между контрольной и 0.5 мг/кг SLURP-1 группами, а #( $p < 0.05$ ), ##( $p < 0.01$ ) и ####( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между контрольной и 5 мг/кг SLURP-1 группами по данным двухфакторного теста ANOVA с последующим апостериорным тестом Даннета. Дни аппликации отмечены светло-голубой полосой; (B, вставка). Средний объем первичной опухоли, измеренный штангенциркулем, у каждой мыши за последние 5 дней (20–24 дни после приживления опухоли). Данные представлены в мм<sup>3</sup> ± SEM. \*\*\*\*( $p < 0.0001$ ) и ####( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между группами в соответствии с однофакторным тестом ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки



**Рис. 2.** Влияние различных доз SLURP-1 и доксорубицина на миграцию клеток A431. А – влияние SLURP-1 и доксорубицина на миграцию клеток. Данные представлены как среднее значение поверхности царапины, занятой мигрирующими клетками (% от контроля), ± SEM,  $n = 3–22$ . Полученные данные были аппроксимированы с помощью уравнения Хилла. Контрольный уровень (100%) показан пунктирной линией. Б – влияние SLURP-1 (SL-1) и доксорубицина (Dox), а также их комбинации на миграцию клеток. Данные представлены как среднее значение поверхности царапины, занятой мигрирующими клетками (% от контроля), ± SEM,  $n = 3–22$ ; контрольный уровень (100%) показан пунктирной линией. \*\*\*( $p < 0.001$ ) и \*\*\*\*( $p < 0.0001$ ) указывают на значимое отличие от контрольной группы (100%, необработанные клетки) по результатам однофакторного теста ANOVA с последующим апостериорным тестом Даннета, «n.s.» – отсутствие значимых различий между группами

**Статистический анализ**

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM). Количество образцов ( $n$ ) указано в подписях к рисункам. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.5.0 (Graphpad software, США). Данные анализировали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью теста Шапиро–Уилка. Для непараметрических данных вместо однофакторного теста ANOVA использовали тест Краскела–Уоллиса. Анализ проводили с использованием непарного  $t$ -теста, теста Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна, однофакторного теста ANOVA с апостериорным тестом Даннета или Тьюки, однофакторного теста Welch ANOVA с апостериорным тестом Даннета и двухфакторного теста ANOVA с апостериорным тестом Даннета как указано в подписях к рисункам. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

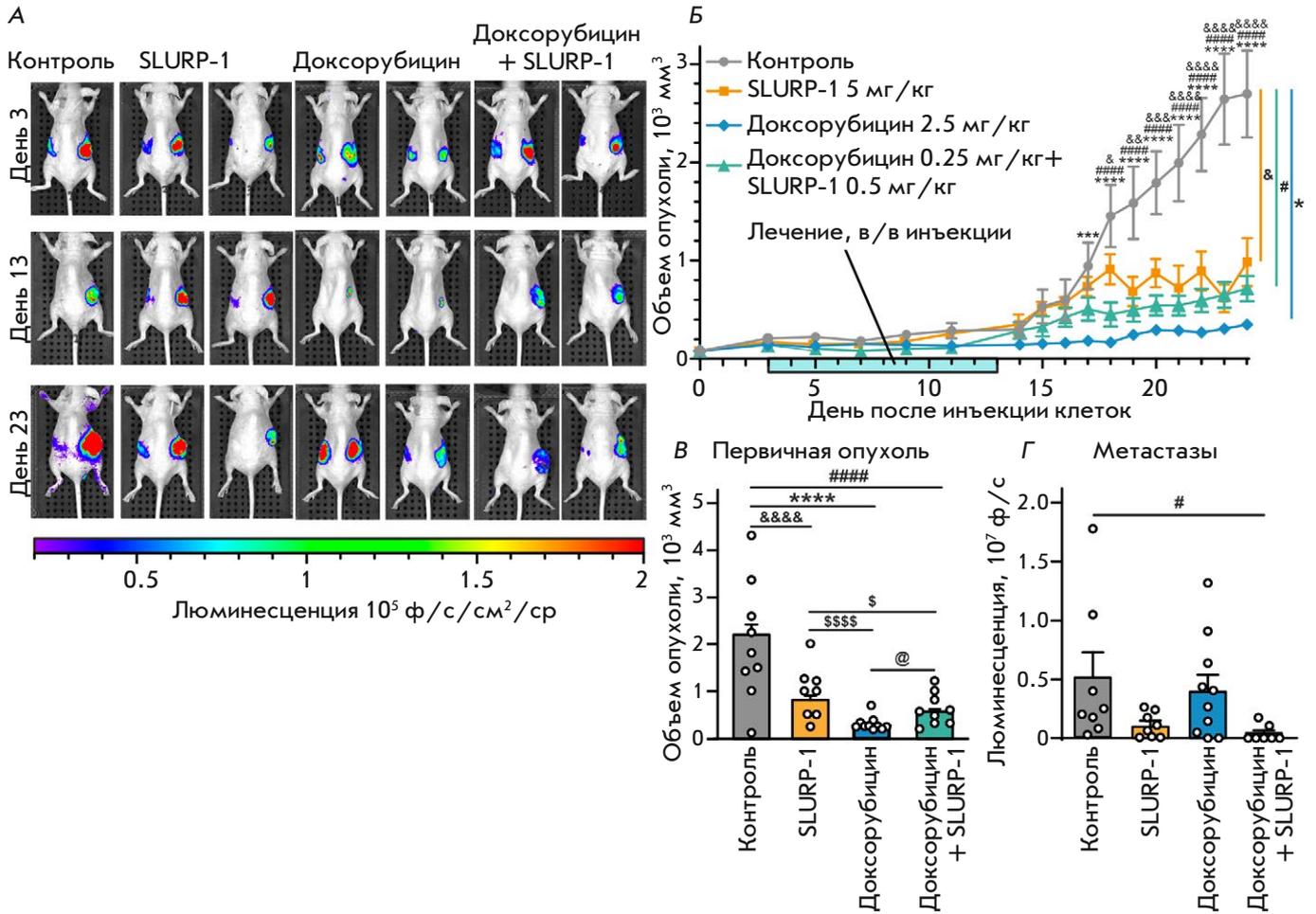
**Увеличение дозы SLURP-1 не повышает его терапевтическую эффективность *in vivo***

Мы сравнили действие двух доз белка SLURP-1 *in vivo*: 0.5 мг/кг, использованную ранее [22], и в 10

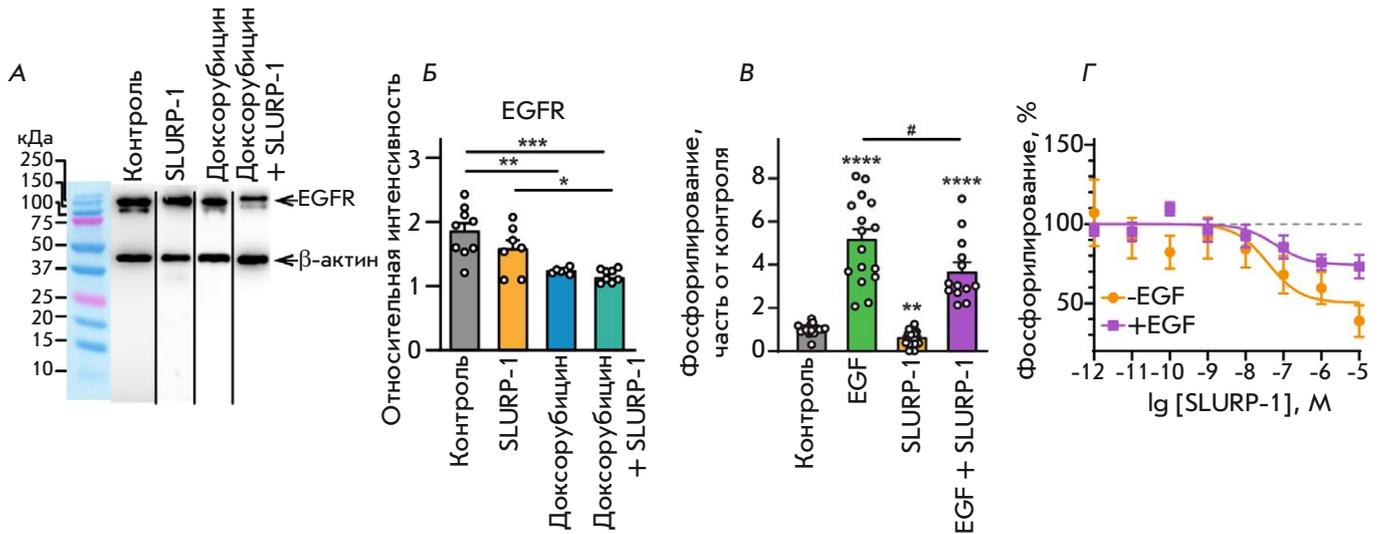
раз большую – 5 мг/кг, на мышей с ксенотрансплантированной эпидермоидной карциномой человека [22]. Удивительно, но эффект более высокой дозы SLURP-1 не отличался от эффекта более низкой дозы (рис. 1B,B). Аппликация SLURP-1 в обеих дозах (0.5 и 5 мг/кг) подавляла рост первичной опухоли (рис. 1A–B, S1) с одинаковой эффективностью и приводила к трехкратному уменьшению объема первичной опухоли по сравнению с контролем (рис. 1B, вставка). Таким образом, показан эффект насыщения SLURP-1, который не может быть усилен увеличением дозы.

**Низкие дозы SLURP-1 и доксорубицина демонстрируют аддитивный эффект на миграцию клеток A431 *in vitro***

Ранее, используя мультиклеточные сфероиды, полученные из клеток A549 и A431, мы наблюдали аддитивный антипролиферативный эффект доксорубицина (широко распространенного химиотерапевтического препарата [45]) и SLURP-1 *in vitro* [46]. В данной работе мы наблюдали сильное дозозависимое снижение миграции клеток A431 после 24 ч инкубации с SLURP-1 или доксорубицином (рис. 2A,B, табл. S2). Следует отметить, что 10 мкМ



**Рис. 3.** Влияние SLURP-1, доксорубицина и их комбинации на рост и метастазирование опухоли в модели ксено-трансплантации мышам клеток A431/NanoLuc. **А** — репрезентативные изображения биолуминесценции опухоли (клетки A431/NanoLuc) до аппликации SLURP-1 и доксорубицина (3-й день после инъекции клеток, 1-й день терапии), после аппликации (13-й день после инъекции клеток, следующий день после окончания 10-дневной терапии) и перед эвтаназией (23-й день после инъекции клеток). Все изображения мышей см. на рис. S1. **Б** — измерение объема первичной опухоли с помощью штангенциркуля. Данные представлены в мм<sup>3</sup> ± SEM. \*\*\* ( $p < 0.001$ ) и \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между контрольной и 2.5 мг/кг доксорубицин группами, #### ( $p < 0.0001$ ) указывает на значимое различие между контрольной и 0.5 мг/кг SLURP-1 + 0.25 мг/кг доксорубицин группами, а & ( $p < 0.05$ ), && ( $p < 0.01$ ), &&& ( $p < 0.001$ ) и &&&& ( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между контрольной и 5 мг/кг SLURP-1 группами согласно двухфакторному тесту ANOVA с последующим апостериорным тестом Даннета. Дни аппликации веществ отмечены светло-голубой полосой. **В** — среднее значение объема первичной опухоли, измеренное штангенциркулем у каждой мыши за последние 5 дней (20–24 день после инъекции клеток). Данные представлены в мм<sup>3</sup> ± SEM. \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) указывает на значимое различие между контрольной и (2.5 мг/кг доксорубицин) группами, #### ( $p < 0.0001$ ) — значимое различие между контрольной и 0.5 мг/кг SLURP-1 + 0.25 мг/кг доксорубицин группами, &&&& ( $p < 0.001$ ) указывает на значимое различие между контрольной и 5 мг/кг SLURP-1 группами, \$ ( $p < 0.05$ ) указывает на значимое отличие от группы (5 мг/кг SLURP-1), а @ ( $p < 0.05$ ) — на значимое различие между группами 2.5 мг/кг доксорубицин и 0.5 мг/кг SLURP-1 + 0.25 мг/кг доксорубицин в соответствии с однофакторным тестом ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки. **Г** — общая люминесценция, измеренная в областях вне первичной опухоли. Данные представлены в виде фотонов в секунду (ф/с) ± SEM. # ( $p < 0.05$ ) указывает на значимое отличие от контрольной группы (физ. раствор) согласно тесту Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна



**Рис. 4.** Влияние SLURP-1 на экспрессию и активацию EGFR (аутофосфорилирование по Y1173). **А** – репрезентативные мембраны, с вестернблот-анализом экспрессии EGFR в опухолях после аппликации физ. раствора (контроль), SLURP-1 (5 мг/кг), доксорубицина (2.5 мг/кг) или SLURP-1 (0.5 мг/кг) + доксорубицин (0.25 мг/кг). Целые мембраны показаны на рис. S2. Представленные образцы получены на разных мембранах параллельно. **Б** – уровень экспрессии EGFR, нормированный на уровень экспрессии β-актина. Данные представлены как относительная интенсивность ± SEM ( $n = 6-9$ ). \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) и \*\*\* ( $p < 0.001$ ) указывают на значимые различия между группами по данным однофакторного теста ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки. **В** – влияние 1 мкМ SLURP-1, 25 нМ EGF и их смеси на активацию EGFR в клетках A431. Данные представлены в кратном отношении к контролю (необработанные клетки) ± SEM ( $n = 13-17$ ). \*\* ( $p < 0.01$ ) и \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) указывают на значительные отличия от контроля по данным однофакторного теста Welch ANOVA с апостериорным тестом Даннета. # ( $p < 0.05$ ) указывает на значительные различия между группами по результатам непарного  $t$ -теста. **Г** – влияние различных концентраций SLURP-1 на активацию EGFR в отсутствие и в присутствии EGF ( $n = 10-14$ ). Данные представлены в % от контроля ± SEM. Полученные данные аппроксимированы с помощью уравнения Хилла

SLURP-1 эквивалентны дозе 5 мг/кг, использованной *in vivo*, а 5 мкМ доксорубицина – 2.5 мг/кг (что соответствует кумулятивной дозе 25 мг/кг (75 мг/м<sup>2</sup>), рекомендуемой для одного цикла терапии солидных опухолей (60 мг/м<sup>2</sup>) [47]). Комбинация сниженных в 10 раз концентраций SLURP-1 и доксорубицина (1 и 0.5 мкМ соответственно) приводила к достоверному ингибированию миграции клеток, сравнимому с эффектами 10 мкМ SLURP-1 или 5 мкМ доксорубицина по отдельности (рис. 1Б). Таким образом, комбинация низких доз SLURP-1 и доксорубицина оказывает аддитивный эффект на миграцию клеток A431.

**Комбинация с доксорубицином в низкой дозе повышает противоопухолевую активность SLURP-1 *in vivo***

Далее мы показали, что комбинация 0.5 мг/кг SLURP-1 (1 мкМ *in vitro*) с 0.25 мг/кг доксорубицина (0.5 мкМ *in vitro*) снижает рост первичной опухоли *in vivo* более эффективно, чем только высокая доза SLURP-1 (рис. 3А,Б,В). Кроме того, применение SLURP-1 совместно с низкой дозой доксоруби-

цина значительно подавляло и метастазирование, в то время как SLURP-1 (5 мг/кг) и доксорубицин (2.5 мг/кг) в высоких дозах не влияли значимо на метастазирование (рис. 3А,Б,Г и рис. S1). Таким образом, SLURP-1 является перспективным противоопухолевым препаратом для комбинированной терапии, при которой доза токсичного химиотерапевтического препарата может быть снижена.

**Комбинация SLURP-1 с доксорубицином подавляет экспрессию EGFR в опухолях *in vivo***

EGFR, наиболее известный проонкогенный рецептор [23], сверхэкспрессируется в клетках эпидермоидной карциномы A431 [48]. Нами показано, что терапия только доксорубицином (2.5 мг/кг) или SLURP-1 совместно с доксорубицином (0.25 мг/кг доксорубицина + 0.5 мг/кг SLURP-1) приводит к значительному снижению экспрессии EGFR в ксенотрансплантированных опухолях A431 (рис. 4А,Б).

**SLURP-1 влияет на активацию EGFR**

SLURP-1 уменьшал аутофосфорилирование EGFR по сайту Y1173 в клетках A431. Кроме того,

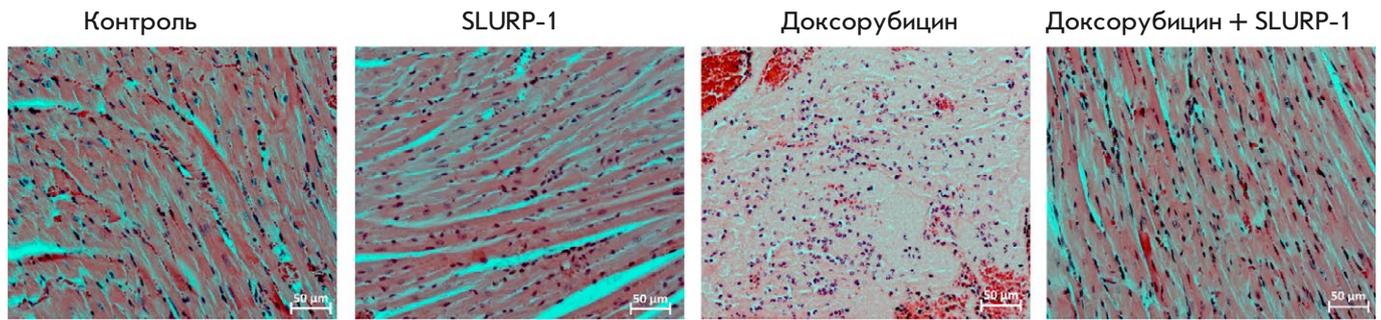


Рис. 5. Кардиотоксичность аппликации SLURP-1 и доксорубина. Фрагменты сердца мышей, получавших физ. раствор (контроль), SLURP-1 (5 мг/кг), доксорубин (2.5 мг/кг) или SLURP-1 (0.5 мг/кг) + доксорубин (0.25 мг/кг). В сердце мыши из группы доксорубина выявлен обширный очаг некроза кардиомиоцитов с нейтрофильной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 200$

в присутствии SLURP-1 наблюдалось снижение EGF-индуцированного фосфорилирования EGFR (рис. 4B,Г, табл. S3). Эти эффекты демонстрировали концентрационную зависимость со схожими  $EC_{50}$  ( $\sim 40 \pm 11$  и  $60 \pm 17$  нМ соответственно) и с отличающимися максимальными эффектами ( $50 \pm 9$  и  $74 \pm 5\%$  соответственно). Схожая эффективность ингибирования активации EGFR при измененной амплитуде эффекта (рис. 4Г, табл. S3) указывает на разные сайты связывания EGF и SLURP-1 на поверхности молекулы EGFR.

#### Комбинация SLURP-1 и доксорубина не проявляет токсичности *in vivo*

Для изучения потенциальной токсичности исследуемых препаратов проанализировали патологические изменения в органах мышей (по три мыши из каждой группы). В легких, печени, селезенке, почках и печени животных всех групп не обнаружили каких-либо значимых отклонений, которые могли бы свидетельствовать о токсичности (рис. S3). В то же время в образцах сердца двух животных, получавших высокую дозу доксорубина (2.5 мг/кг), нашли очаги некроза кардиомиоцитов (рис. 5). Таким образом, можно сделать вывод, что комбинированная терапия низкими дозами SLURP-1 и доксорубина более безопасна, чем только высокие дозы доксорубина.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на серьезные побочные эффекты, химиотерапия по-прежнему остается основным методом терапии опухолей [49]. Один из самых широко используемых химиотерапевтических препаратов, доксорубин, проявляет высокую противоопухолевую эффективность, но при этом обладает серьезной токсичностью [40, 50], возрастающей с увеличением кумулятивной дозы и возраста пациента,

что ограничивает его применение [41, 50–54]. В ряде исследований предложено комбинировать химиотерапию с другими методами для снижения дозы химиопрепарата и уменьшения его побочных эффектов [55, 56]. Ингибирование  $\alpha 7$ -nAChR может снизить прогрессию опухоли, метастазирование, химиорезистентность и побочные эффекты химиотерапии [19, 25, 57–61]. Секретируемый белок человека SLURP-1 ингибирует  $\alpha 7$ -nAChR [26] и проявляет противоопухолевую активность *in vivo* [22]. Нами предложены два подхода к повышению эффективности терапии на основе SLURP-1: (1) увеличение дозы SLURP-1 в качестве монотерапии и (2) применение SLURP-1 совместно с доксорубином.

В соответствии с данными, полученными нами ранее, SLURP-1 подавлял рост опухоли *in vivo*, при этом увеличение дозы SLURP-1 в 10 раз не повышало его эффективность (рис. 1). Используя второй подход, мы выявили аддитивный эффект SLURP-1 и доксорубина в низких концентрациях на миграцию клеток *in vitro* (рис. 2B) и противоопухолевый и антиметастатический эффекты *in vivo* (рис. 3B,Г). Проведенные ранее тесты на иммуногенность и токсичность показали высокую безопасность внутривенного введения SLURP-1 [22]. При этом отмечена высокая кардиотоксичность доксорубина в обычно используемых в клинике концентрациях у мышей (рис. 5) [47]. В то же время доксорубин в сниженной в 10 раз дозе в комбинации с SLURP-1 не вызывал развитие кардиотоксических эффектов (рис. 5). Таким образом, применение доксорубина в низких дозах в комбинации с SLURP-1 или другими ингибиторами  $\alpha 7$ -nAChR можно рассматривать как хороший выбор для противоопухолевой терапии.

Точные молекулярные механизмы, лежащие в основе совместного действия SLURP-1 и доксорубина на рост опухоли A431, еще не установ-

лены. Одним из объяснений может быть совместная инактивация EGFR, сверхэкспрессированного в клетках A431 [62]. Действительно, и сам доксорубин, и в комбинации с SLURP-1 подавляет экспрессию этого рецептора в опухолях (рис. 4А,Б). EGFR опосредует рост, миграцию и выживание опухолевых клеток [63]. SLURP-1 отменяет EGF-индуцированную активацию рецептора (рис. 4В,Г), а доксорубин также влияет на сигнальные пути, запускаемые EGFR [38]. С другой стороны, общий эффект SLURP-1 и доксорубина может быть результатом ингибирования взаимодополняющих внутриклеточных сигнальных каскадов. Известно, что сверхэкспрессия Src [64], активация путей STAT3 [65] и PI3K/AKT [66] приводят к стимуляции активации и экспрессии EGFR в опухолевых клетках. В свою очередь, инкубация с SLURP-1 приводит к ингибированию этих сигнальных путей в клетках A431 [22]. С другой стороны, противоопухолевый эффект доксорубина опосредован реорганизацией липидных рафтов через EGFR/Src-сигнализацию [38]. Таким образом, усиленный эффект комбинации SLURP-1 и доксорубина может

быть результатом синергического действия каждого соединения на сигнальные пути, регулирующие экспрессию и активацию EGFR.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинация с доксорубином в низкой дозе усиливает противоопухолевую активность SLURP-1 и значительно подавляет метастазирование опухоли. Усиление эффекта может быть связано с понижением уровня экспрессии и активации EGFR в опухолях под действием обоих препаратов. Таким образом, комбинированная терапия опухолей, в частности сССС, с помощью SLURP-1 и низких доз химиотерапевтических агентов выглядит перспективной и требует дальнейшего изучения. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Министерства науки и высшего образования  
Российской Федерации (№ 075-15-2024-536).*

*Приложения доступны на сайте  
<https://doi.org/10.32607/actanaturae27526>.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Khan N.H., Mir M., Qian L., Baloch M., Ali Khan M.F., Rehman A.-U., Ngowi E.E., Wu D.-D., Ji X.-Y. // *J. Adv. Res.* 2022. V. 36. P. 223–247.
- Burns C., Kubicki S., Nguyen Q.-B., Aboul-Fettouh N., Wilmas K.M., Chen O.M., Doan H.Q., Silapunt S., Migden M.R. // *Cancers.* 2022. V. 14. № 15. P. 3653.
- Winge M.C.G., Kellman L.N., Guo K., Tang J.Y., Swetter S.M., Aasi S.Z., Sarin K.Y., Chang A.L.S., Khavari P.A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2023. V. 23. № 7. P. 430–449.
- Sharma A., Sharma U., Jagannathan N.R., Ray R., Rajeswari M.R. // *Cancer Invest.* 2019. V. 37. № 8. P. 339–354.
- Arafa A., Mostafa A., Navarini A.A., Dong J.-Y. // *Cancer Causes Control CCC.* 2020. V. 31. № 8. P. 787–794.
- Grando S.A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2014. V. 14. № 6. P. 419–429.
- Schaal C., Chellappan S.P. // *Mol. Cancer Res.* 2014. V. 12. № 1. P. 14–23.
- Wang S., Hu Y. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 16. № 2. P. 1375–1382.
- Hollenhorst M.I., Krasteva-Christ G. // *Mol. Basel Switz.* 2021. V. 26. № 20. P. 6097.
- Li L., Chen H., Chang H. // *J. Clin. Med.* 2019. V. 8. № 9. P. 1391.
- Bordas A., Cedillo J.L., Arnalich F., Esteban-Rodriguez I., Guerra-Pastrián L., de Castro J., Martín-Sánchez C., Atienza G., Fernández-Capitan C., Rios J.J., et al. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 40. P. 67878–67890.
- Cheng W.-L., Chen K.-Y., Lee K.-Y., Feng P.-H., Wu S.-M. // *J. Cancer.* 2020. V. 11. № 5. P. 1125–1140.
- Dasgupta P., Rizwani W., Pillai S., Kinkade R., Kovacs M., Rastogi S., Banerjee S., Carless M., Kim E., Coppola D., et al. // *Int. J. Cancer.* 2009. V. 124. № 1. P. 36–45.
- Li C.-L., Lin Y.-K., Chen H.-A., Huang C.-Y., Huang M.-T., Chang Y.-J. // *J. Clin. Med.* 2019. V. 8. № 9. P. 1391.
- Tu C.-C., Huang C.-Y., Cheng W.-L., Hung C.-S., Uyanga B., Wei P.-L., Chang Y.-J. // *Tumor Biol.* 2016. V. 37. № 4. P. 4421–4428.
- Davis R., Rizwani W., Banerjee S., Kovacs M., Haura E., Coppola D., Chellappan S. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 10. P. e7524.
- Pucci S., Fasoli F., Moretti M., Benfante R., Di Lascio S., Viani P., Daga A., Gordon T.J., McIntosh M., Zoli M., et al. // *Pharmacol. Res.* 2021. V. 163. P. 105336.
- Schaal C., Padmanabhan J., Chellappan S. // *Cancers.* 2015. V. 7. № 3. P. 1447–1471.
- Afrashteh Nour M., Hajiasgharzadeh K., Kheradmand F., Asadzadeh Z., Bolandi N., Baradaran B. // *Life Sci.* 2021. V. 278. P. 119557.
- Chernyavsky A.I., Shchepotin I.B., Grando S.A. // *Int. Immunopharmacol.* 2015. V. 29. № 1. P. 36–44.
- Bychkov M.L., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Kulbatskii D.S., Chulina I.A., Paramonov A.S., Baidakova L.K., Azev V.N., Koshelev S.G., Kirpichnikov M.P., et al. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 739391.
- Shlepova O.V., Shulepko M.A., Shipunova V.O., Bychkov M.L., Kukushkin I.D., Chulina I.A., Azev V.N., Shramova E.I., Kazakov V.A., Ismailova A.M., et al. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2023. V. 11. P. 1256716.
- Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L. // *Mol. Oncol.* 2018. V. 12. № 1. P. 3–20.
- Shimizu R., Ibaragi S., Eguchi T., Kuwajima D., Kodama S., Nishioka T., Okui T., Obata K., Takabatake K., Kawai H., et al. // *Int. J. Oncol.* 2019. V. 54. № 1. P. 283–294.
- Vasilyeva N.A., Loktyushov E.V., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N. // *Biochem. (Moscow).* 2017. V. 82. № 13. P. 1702–1715.
- Lyukmanova E., Shulepko M., Kudryavtsev D., Bychkov M., Kulbatskii D.S., Kasheverov I., Astapova M., Feofanov A., Thomsen M., Mikkelsen J., et al. // *PLoS One.* 2016. V. 11.

- № 2. P. e0149733.
27. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // *Life Sci.* 2007. V. 80. № 24–25. P. 2243–2247.
28. Bergqvist C., Kadara H., Hamie L., Nemer G., Safi R., Karouni M., Marrouche N., Abbas O., Hasbani D.J., Kibbi A.G., et al. // *Int. J. Dermatol.* 2018. V. 57. № 2. P. 162–170.
29. Arousse A., Mokni S., H'mida Ben Brahim D., Bdioui A., Aounallah A., Gammoudi R., Saidi W., Boussofara L., Ghariani N., Denguezli M., et al. // *Int. J. Dermatol.* 2019. V. 58. № 8. P. 966–968.
30. Throm V.M., Männle D., Giese T., Bauer A.S., Gaida M.M., Kopitz J., Bruckner T., Plaschke K., Grekova S.P., Felix K., et al. // *Oncotarget.* 2018. V. 9. № 14. P. 11734–11751.
31. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 4. P. 60–66.
32. Lyukmanova E., Bychkov M., Sharonov G., Efremenko A., Shulepko M., Kulbatskii D., Shenkarev Z., Feofanov A., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // *Br. J. Pharmacol.* 2018. V. 175. № 11. P. 1973–1986.
33. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 489. № 1. P. 392–395.
34. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 493. № 1. P. 211–214.
35. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. № 4. P. 403–410.
36. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shlepova O.V., Shenkarev Z.O., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // *Int. Immunopharmacol.* 2020. V. 82. P. 106303.
37. Tortora G., Gelardi T., Ciardiello F., Bianco R. // *Int. J. Biol. Markers.* 2007. V. 22. № 1 Suppl 4. P. S47–52.
38. Yun U.-J., Lee J.-H., Shim J., Yoon K., Goh S.-H., Yi E.H., Ye S.-K., Lee J.-S., Lee H., Park J., et al. // *Lab. Invest.* 2019. V. 99. № 8. P. 1157–1172.
39. Mendez B.M., Thornton J.F. // *Plast. Reconstr. Surg.* 2018. V. 142. № 3. P. 373e–387e.
40. van der Zanden S.Y., Qiao X., Neefjes J. // *FEBS J.* 2021. V. 288. № 21. P. 6095–6111.
41. Swain S.M., Whaley F.S., Ewer M.S. // *Cancer.* 2003. V. 97. № 11. P. 2869–2879.
42. Shulepko M., Lyukmanova E., Paramonov A., Lobas A., Shenkarev Z., Kasheverov I., Dolgikh D., Tsetlin V., Arseniev A., Kirpichnikov M. // *Biochem. (Moscow).* 2013. V. 78. № 2. P. 204–211.
43. Varankar S.S., Bapat S.A. // *Front. Oncol.* 2018. V. 8. P. 633.
44. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Zelepukin I.V., Schulga A.A., Proshkina G.M., Shramova E.I., Kutscher H.L., Telegin G.B., Kabashin A.V., et al. // *ACS Nano.* 2020. V. 14. № 10. P. 12781–12795.
45. Sritharan S., Sivalingam N. // *Life Sci.* 2021. V. 278. P. 119527.
46. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 489. № 1. P. 392–395.
47. Johnson-Arbor K., Dubey R. Doxorubicin // *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.*
48. Cuan X., Yang X., Zhu W., Zhao Y., Luo R., Huang Y., Wang X., Sheng J. // *BMC Pharmacol. Toxicol.* 2023. V. 24. № 1. P. 29.
49. Miller K.D., Nogueira L., Devasia T., Mariotto A.B., Yabroff K.R., Jemal A., Kramer J., Siegel R.L. // *CA. Cancer J. Clin.* 2022. V. 72. № 5. P. 409–436.
50. Kamińska K., Cudnoch-Jędrzejewska A. // *Neurotox. Res.* 2023. V. 41. № 5. P. 383–397.
51. Tian Z., Yang Y., Yang Y., Zhang F., Li P., Wang J., Yang J., Zhang P., Yao W., Wang X. // *BMC Cancer.* 2020. V. 20. № 1. P. 1139.
52. Upshaw J.N. // *Curr. Oncol. Rep.* 2020. V. 22. № 7. P. 72.
53. El-Agamy S.E., Abdel-Aziz A.K., Esmat A., Azab S.S. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2019. V. 84. № 1. P. 1–14.
54. Du J., Zhang A., Li J., Liu X., Wu S., Wang B., Wang Y., Jia H. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. P. 673340.
55. Qin S.-Y., Cheng Y.-J., Lei Q., Zhang A.-Q., Zhang X.-Z. // *Biomaterials.* 2018. V. 171. P. 178–197.
56. Bello L., Carrabba G., Giussani C., Lucini V., Cerutti F., Scaglione F., Landré J., Pluderi M., Tomei G., Villani R., et al. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. № 20. P. 7501–7506.
57. Yan Y., Su C., Hang M., Huang H., Zhao Y., Shao X., Bu X. // *Virology.* 2017. V. 14. № 1. P. 190.
58. Bu X., Zhang A., Chen Z., Zhang X., Zhang R., Yin C., Zhang J., Zhang Y., Yan Y. // *BMC Cancer.* 2019. V. 19. № 1. P. 976.
59. Brown K.C., Lau J.K., Dom A.M., Witte T.R., Luo H., Crabtree C.M., Shah Y.H., Shiflett B.S., Marcelo A.J., Proper N.A., et al. // *Angiogenesis.* 2012. V. 15. № 1. P. 99–114.
60. Grozio A., Paleari L., Catassi A., Servent D., Cilli M., Piccardi F., Paganuzzi M., Cesario A., Granone P., Mourier G., et al. // *Int. J. Cancer.* 2008. V. 122. № 8. P. 1911–1915.
61. Shulepko M.A., Kulbatskii D.S., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. № 2. P. 66–75.
62. Xu Y.H., Richert N., Ito S., Merlino G.T., Pastan I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. № 23. P. 7308–7312.
63. Uribe M.L., Marrocco I., Yarden Y. // *Cancers.* 2021. V. 13. № 11. P. 2748.
64. Bao J., Gur G., Yarden Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 5. P. 2438–2443.
65. Zhao C., Yang L., Zhou F., Yu Y., Du X., Xiang Y., Li C., Huang X., Xie C., Liu Z., et al. // *Oncogene.* 2020. V. 39. № 20. P. 3997–4013.
66. Wang D., Su L., Huang D., Zhang H., Shin D.M., Chen Z.G. // *Mol. Cancer.* 2011. V. 10. P. 116.

# Inhibition of HBV Replication by a Fully Humanized Neutralizing Antibody *In Vivo* and *In Vitro*

Zhipeng Zhang<sup>1,2\*</sup>, Yanqin Ma<sup>2</sup>, Yan He<sup>2</sup>, Dong Wang<sup>2</sup>, Huaian Song<sup>2</sup>, Kun Yue<sup>2</sup>, Xiaomei Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Life Science and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi, 214122 China

<sup>2</sup>Suzhou Hepa Thera Biopharmaceutical Co., Ltd., Shanghai, 200120 China

\*E-mail: zhipengzhang2009@163.com

Received July 11, 2024; in final form, January 27, 2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27457

**ABSTRACT** Neutralizing antibodies are capable of specifically binding to the HBsAg virus, thereby preventing HBV infection and subsequently reducing viral antigen load in both the liver and systemic circulation. This has significant implications for restoring the postnatal immune function. By utilizing the phage antibody library technology, we successfully screened a fully humanized neutralizing antibody targeting the hepatitis B surface antigen. The antiviral activity was assessed in primary human hepatocytes (PHHs) by determining the EC<sub>50</sub> values for HBeAg and HBsAg biomarkers in HBV types B, C, and D; no cytotoxicity was observed within the tested concentration range. Furthermore, HT-102 exhibited no ADCC effect but displayed a weak CDC effect along with a dose-dependent response. We established an AAV/HBV mouse model and observed significant dose-dependent reduction in HBsAg and HBV DNA levels for both the medium-dose and high-dose groups. The immunohistochemical staining data showed dose-dependent reduction in HBsAg expression in the liver, with high-dose group exhibiting minimal positive expression. Finally, a mild immune response was induced, while reducing the burden of antigen–antibody complexes circulating within the system. Consequently, strain on the patient’s immune system was alleviated by effectively slowing down CD8<sup>+</sup>T lymphocyte depletion, and functional cure was ultimately achieved as intended.

**KEYWORDS** Neutralizing antibody, CDC effect, HBsAg.

## INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection is a common public health problem worldwide; 5–10% of persistent HBV infections following acute hepatitis B develop into chronic liver disease, including chronic active hepatitis, cirrhosis, and primary liver cell carcinoma [1]. Although nucleic acid analogs effectively prevent the risk of HBV reactivation and completely eliminate the possibility of hepatitis outbreak, the probability of functional cure is extremely low, and it still causes serious damage to the liver and even the occurrence of liver cancer [2].

Currently, prevention of hepatitis B virus infection primarily involves active and passive immunization [3]. Active immunization entails administering the hepatitis B vaccine, making it one of effective measures for preventing hepatitis B transmission [4]. Passive immunization involves administering hepatitis B immune globulin (HBIG), which is mainly used to prevent mother-to-child transmission (in combina-

tion with the hepatitis B vaccine) [5]. Research has demonstrated that a combination of both HBIG and the hepatitis B vaccine is more effective in reducing the chronic infection rate [6]. Most HBIG is derived from positive serum containing anti-HBsAg, which limits its large-scale production and poses a risk for blood-borne infectious diseases because it is originating from serum sources. Despite the transition from blood-derived vaccines to genetically engineered ones, there is an urgent need to develop genetically engineered antibodies against anti-HBs as a replacement for HBIG [7]. The phage antibody library technology offers an alternative solution to address this issue.

The present study mainly introduced a new fully humanized neutralizing antibody (HT-102), which was in phase 1 clinical stage (Chinese Clinical Trial Registry No. ChiCTR2200072837). The phage display Fab libraries were constructed using the established methods [8, 9] based on targeted genes isolated from PBMCs of 18 donors who had received

hepatitis B virus vaccination. Total cellular mRNAs were extracted using an RNeasy Mini Kit (Qiagen), and cDNA synthesis was primed with oligo (dT) using a Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche). The light and heavy chain genes were amplified from the cDNA by PCR and sequentially cloned into the pComb 3H vector using a standard protocol [10]. Fab antibody preparations were tested and screened by indirect ELISA using 96-well plates coated with 0.5–1 µg of purified S protein, with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-human Fab used as a secondary antibody. Following the evaluation of the clones, HT-102 was selected as the final monoclonal antibody due to its superior performance in terms of anti-HBsAg titer, Fab expression levels, and binding affinity [11]. The primary mechanism involves specific binding to the S antigen on the surface of the HBV virus [12], which prevents its interaction with cell receptors and subsequent entry into cells, consequently impeding HBV infection in uninfected cells [13].

## MATERIALS AND METHODS

### *In vitro*

The following commercial cell lines were used for *in vitro* efficacy assays: PHHs (Wuxi Apptec, cat. # LGI, China), Myrcludex B (Wuxi AppTec, cat. # P1214012, China), Cell PBMC (HemaCare, cat. # 20063062, USA), HepG2-HBsAg and Raji cells (Wuxi AppTec, China). Detailed information regarding the HBV virus is provided in *Table 1* (see Appendix). The following commercial test kits were utilized in this experiment: LDH assay kit (Promega, cat. # G1780, USA), CCK-8 (Li Ji Biochemicals, cat. # AC11L057, China), HBsAg ELISA kit (Autobio Inc., cat. # CL-0310, China), and HBeAg ELISA kit (Autobio Inc., cat. # CL-0312, China). The main instruments used in this experiment include an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Molecular Devices, USA), a centrifuge (Beckman Coulter, USA), and a cell counter (Countstar, China).

**Anti-HBV efficacy.** On day 0, PHH cells were recovered and adjusted to a suitable density of  $1.32 \times 10^5$  cells/well before being seeded into 48-well cell plates at a concentration of 20 µg/ml. On day 1, HT-102 was prepared at starting concentrations of 20, 5, 1.250, 0.313, 0.078, 0.020, and 0.005 µg/ml to be mixed with type B, type C, and type D HBV viruses for 1 h before being added to the cells. Similarly, Myrcludex B was prepared at starting concentrations of 100, 25, 6.250, 1.563, 0.391, 0.098, and 0.024 nM. On day 8, the cell culture supernatants were collected for CCK-8 assay to determine cell viability as well

as ELISA analysis for HBeAg and HBsAg detection. The HBsAg inhibition rate (%) and HBeAg inhibition rate (%) were calculated as  $(1 - [\text{HBsAg or HBeAg test sample concentration} / \text{HBsAg or HBeAg medium control concentration}]) \times 100\%$ , respectively. Cell viability% was determined as  $(\text{test sample absorbance} - \text{blank average absorbance}) / (\text{medium control average absorbance} - \text{blank average absorbance}) \times 100\%$ . The data were analyzed using the log(inhibitor) vs response-variable slope method in the GraphPad Prism software to obtain the  $EC_{50}$  and  $CC_{50}$  values of the compound against HBV.

### *The antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) effects.*

The binding rate of the tested antibody to the target cell was verified as follows. Different concentrations of HT-102 (0.1, 1, 10, and 100 µg/ml) were prepared and incubated with HepG2-HBsAg stably transfected cells at 4°C for a specified duration. A negative control was included simultaneously. Fluorescent secondary antibody APC-anti-human IgG Fc (Jackson ImmunoResearch, cat. # 109-605-098, USA) was added and incubated. Finally, flow cytometry was employed to determine the binding rate.

**ADCC:** On day 1, PBMC cells were adjusted to a density of  $2 \times 10^6$  cells/ml. Raji and HepG2-HBsAg stable transfection cell lines were also adjusted to a density of  $4 \times 10^5$  cells/ml. The antibodies, including positive control Rituximab (MedChemExpress, cat. # HY-P9913, USA) and negative control IgG1 (Genenode, cat. # 91001B, China), were then prepared at concentrations ranging from 100 to 0 µg/ml. The LDH test was performed in strict accordance with the manufacturer's instructions provided in the LDH assay kit. Killing rate =  $(\text{Test sample absorbance} - \text{Low control absorbance} - \text{PBMC absorbance}) / (\text{High control absorbance} - \text{Low control absorbance}) \times 100\%$ .  $ADCC\% = (\text{killing rate of test sample} - \text{killing rate of no-antibody control}) \times 100\%$ .

**CDC:** The cell density of Raji and HepG2 cells was separately adjusted to  $4 \times 10^5$  cells/ml. HT-102 antibody, positive control Rituximab, and negative control IgG1 were prepared at concentrations ranging from 100 to 0 µg/ml. Next, the lysis solution was introduced into each well for lysing the cells thereby releasing LDH (lactate dehydrogenase). The instructions provided in the LDH kit were followed meticulously to conduct the LDH test. Complement-Mediated Cytotoxicity of Target Cells: Killing rate =  $(\text{Test sample absorbance} - \text{Low control absorbance}) / (\text{High control absorbance} - \text{Low control absorbance}) \times 100\%$ .  $CDC\% = (\text{killing rate of test sample} - \text{killing rate of no-antibody control}) \times 100\%$ .

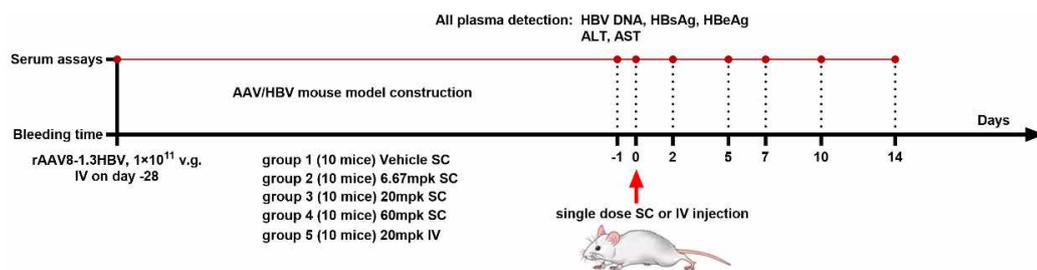


Fig. 1. Experimental design

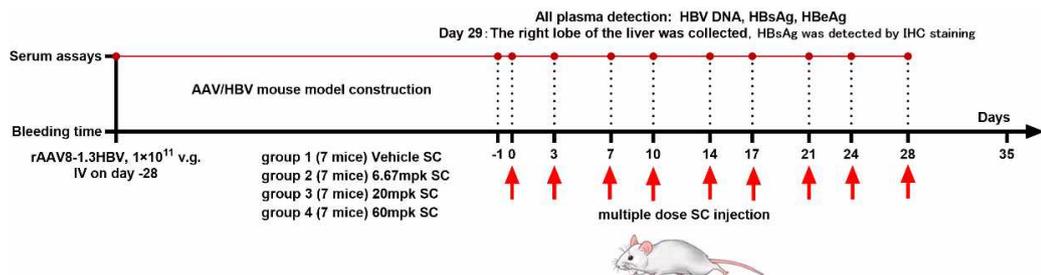


Fig. 2. Experimental design

### In vivo

The recombinant rAAV8-1.3HBV (type D, ayw; batch number: awy1-P4-220301) was procured from Shanghai Wuxi AppTec. The primary reagents and instruments used are detailed in *Tables 2 and 3* (see Appendix).

**Evaluation of the anti-HBV activity by a single dose injection.** Before injection, rAAV8-1.3HBV was prepared in sterile PBS at a concentration of  $1 \times 10^{11}$  v.g./200  $\mu$ l. Injections were administered to 60 mice via the tail vein. After screening, 50 mice were divided into five groups and designated as group 1 through group 5. Blood plasma was collected before detecting HBV DNA, HBsAg, and HBeAg on days 14 and 21 after virus injection. On day 0 (28 days after virus injection), four groups of mice were subcutaneously injected with a blank vehicle or a test compound solution, while the fifth group of mice was injected with the test compound solution via the tail vein. Blood plasma samples were collected from all mice via the submandibular vein on days -1, 2, 5, 7, 10, and 14, and used to detect HBV DNA, HBsAg, and HBeAg. These blood plasma samples were also used to detect ALT and AST on days -1, 7, and 14 (Appendix, *Fig. S1*). The experimental protocol is shown in *Fig. 1*. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation of each group of mouse samples, unless otherwise specified.

**Evaluation of the anti-HBV activity by multiple dose injection.** All 35 mice successfully received 200  $\mu$ l of the rAAV8-1.3HBV solution via the tail vein. After

screening, 28 mice were selected into groups and labeled as group 1 through group 4. Blood samples were collected from infected mice via the subclavian vein on days 24 and 44 post-infection and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for detecting HBV DNA, HBsAg, and HBeAg [14]. On day 0, mice in groups 1–4 received subcutaneous injections of either a vehicle or a test compound. Blood samples were collected from all mice through the subclavian vein on days -1, 1, 5, 8, 12, 15, 19, 22, 26, and 29 post-infection for detecting HBV DNA, HBsAg, and HBeAg. All mice were sacrificed by  $\text{CO}_2$  inhalation on day 29, and the right lobe of the liver was harvested and preserved in formaldehyde, transferred to PBS, and embedded into paraffin blocks to conduct IHC staining for detecting HBsAg. *Figure 2* illustrates the experimental protocol design. The results of HBV DNA, HBsAg, HBeAg analysis are presented as the mean value  $\pm$  standard deviation per group of mouse samples, unless otherwise specified.

## RESULTS

### In vitro anti-HBV efficacy

The experimental protocol was designed to validate the *in vitro* antiviral activity within the PHHs system. Myrcludex B exhibited expected inhibition against HBeAg subtypes B, C, and D with  $\text{EC}_{50}$  values of 8.583, 11.180, and 0.853 nM, respectively, as well as against HBsAg subtypes B, C, and D with  $\text{EC}_{50}$  values of 3.358, 7.545, and 0.908 nM, respectively [15, 16]. HT-102 (batch number: C19455-YY2022001(C)) demonstrated  $\text{EC}_{50}$  values of 0.083, 0.057, and 0.117  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for inhibition of HBeAg subtypes B, C

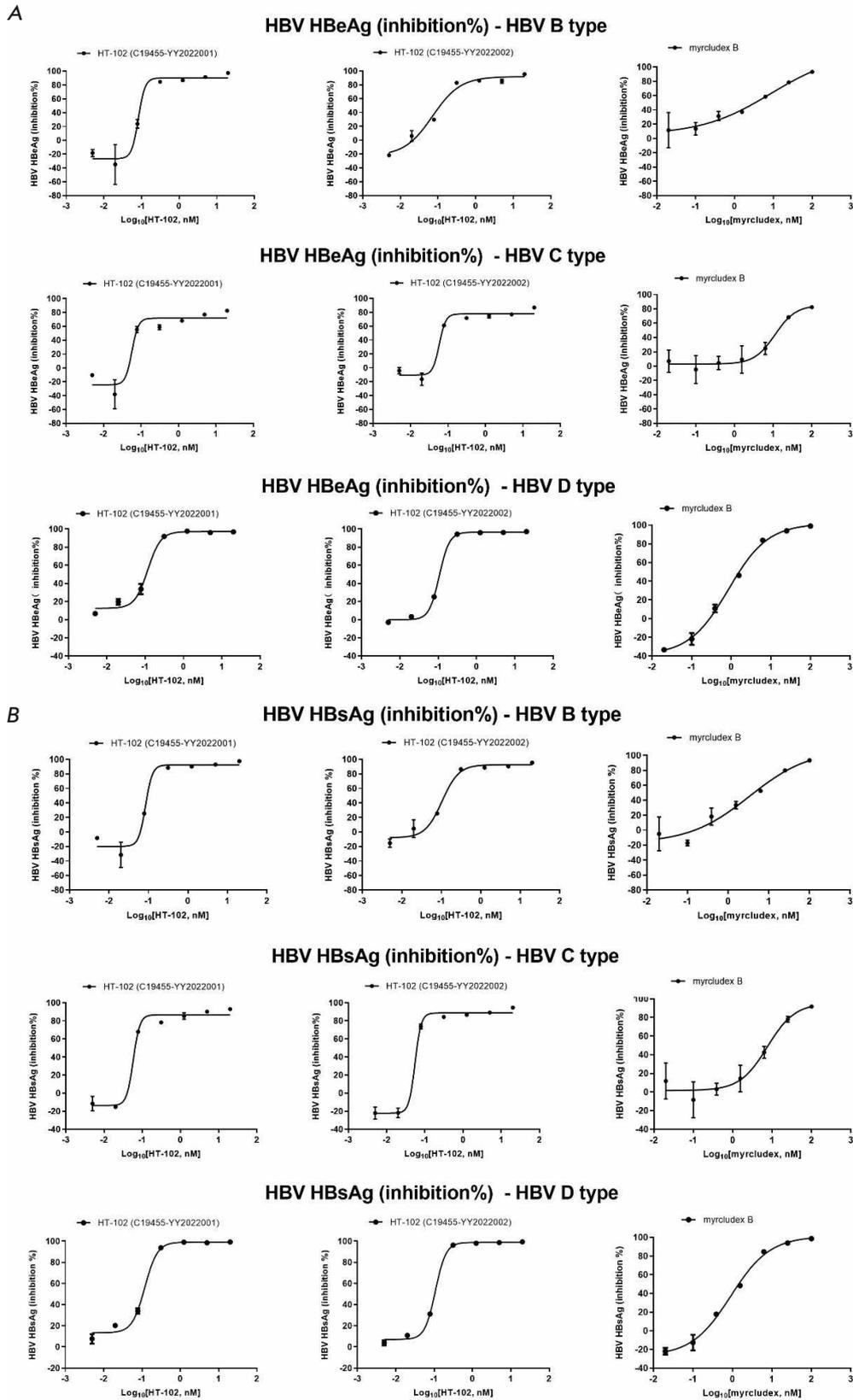
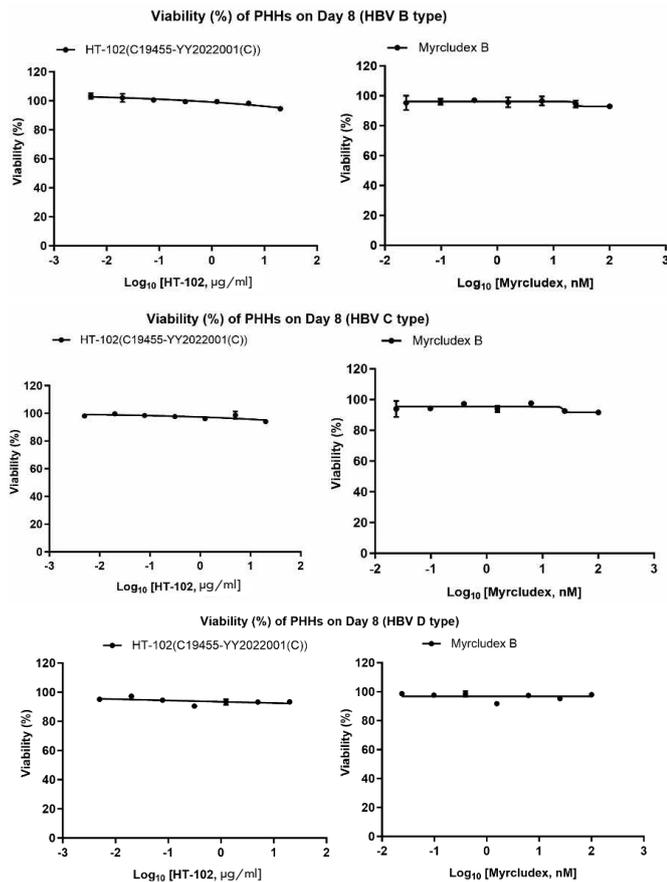


Fig. 3. (A) The fit curve for the inhibition of HBeAg by neutralizing antibody. (B) The fitting curve for the inhibition of HBsAg by neutralizing antibody targeting HBV surface antigens. Error bars represent standard errors



**Fig. 4.** The fit curves for cell viability. Error bars represent standard errors

and D, and EC<sub>50</sub> values of 0.084, 0.058, and 0.119 µg/ml for inhibition of HBsAg subtypes B, C, and D. HT-102 (batch number: C19455-YY2022002) showed EC<sub>50</sub> values of 0.072, 0.058, and 0.107 µg/ml for inhibition of HBeAg subtypes B, C, and D, and EC<sub>50</sub> values of 0.104, 0.055, and 0.108 µg/ml for inhibition of HBsAg subtypes B, C, and D. The fit curves are shown in Fig. 3.

A microscopy study revealed that neither HT-102 (batch number: C19455-YY2022001(C)) nor myrcludex B exhibited an apparent toxicity against PHHs cells. This finding was further supported by the results obtained from CCK-8 detection. Figure 4 shows the cell viability curve.

**The antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) effects**

HepG2 cells stably expressing HBsAg protein were used as target cells. When evaluating the binding efficiency of the neutralizing antibody to these target cells [17], flow cytometry results demonstrated a con-

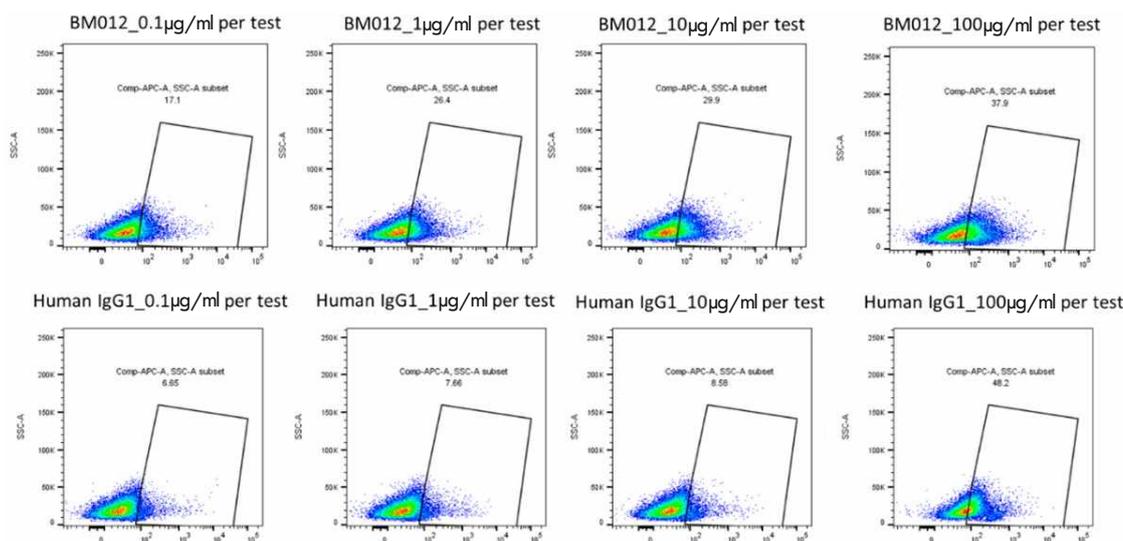
centration-dependent increase in binding rates between the target cells and various concentrations (0.1, 1, 10, and 100 µg/ml) of HT-102(BM012). The highest binding rate, 37.9% at a concentration of 100 µg/ml, was observed with HepG2-HBsAg stably transfected cells. In contrast, the binding rates of the negative control antibody were significantly lower than those of HT-102(BM012) at the same concentrations. However, it is worth noting that at a concentration of 100 µg/ml, the binding rate was elevated (48.2%) for the negative control antibody, suggesting potential non-specific staining due to excessive concentration. These findings shown in Fig. 5.

Evaluation of the ADCC activity revealed that Rituximab exhibited a significant dose-dependent ADCC activity within its specified range (13.57–53.03%) [18, 19]. The negative control antibody, human IgG1, exhibited an ADCC activity of -7.35%. Concentrations of the positive and negative controls used in the test are listed in Table 4 (see Appendix). The test antibody HT-102(BM012) displayed no detectable ADCC activity within its specified range (0.0064–100 µg/ml) (Table 5, see Appendix).

During further assessment of the CDC effect of the test antibody, it was observed that Rituximab exhibited a CDC effect ranging from 0.68 to 15.59% within its tested concentration range (0.0064–100 µg/ml). The HT-102 (BM012) showed a CDC effect ranging from -0.71 to 5.23% within its tested concentration range (0.0064–100 µg/ml), while the negative control human IgG antibody had a CDC effect value of -0.13%. These findings indicated that HT-102 (BM012) exhibited a weak but dose-dependent CDC effect. The detailed results are available in Tables 6 and 7 (see Appendix).

**Evaluation of the *in vivo* anti-HBV activity by a single dose injection**

The levels of HBeAg, HBsAg, and HBV DNA in mice in the vehicle group remained relatively stable throughout the experiment, fluctuating within the ranges of 3.30–3.70 log<sub>10</sub> PEIU/ml for HBeAg, 5.10–5.72 log<sub>10</sub> IU/ml for HBsAg, and 5.47–6.02 log<sub>10</sub> copy/µL for HBV DNA during the experimental period [20]. Low-dose group (6.67 mpk, SC): on day 0, mice in group 2 were compared to the vehicle group. No significant reduction was observed in plasma levels of HBeAg, HBsAg, and HBV DNA. Medium-dose group (20 mpk, SC): mice in group 3 were compared to the vehicle group; on day 2, a slight decrease was observed in plasma levels of HBeAg (-0.15 log<sub>10</sub> PEIU/ml; *p* < 0.01), HBsAg (-0.60 log<sub>10</sub> IU/ml; *p* < 0.01), and HBV DNA (-0.47 log<sub>10</sub> copy/µL; *p* < 0.05), but these levels rebounded by day 10 after treatment. High-dose group (60mpk, SC):



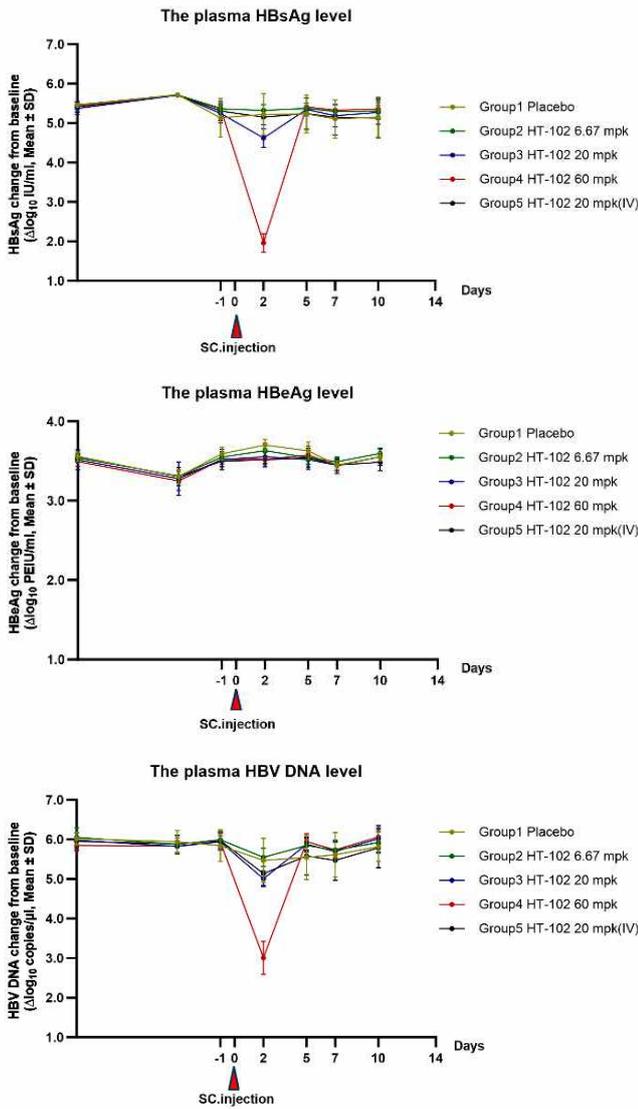
**Fig. 5.** The efficacy of the neutralizing antibody and negative control antibody in their binding to the target cells

mice in group 4 were compared to those in the vehicle group; on day 2, there was a slight decline in plasma level of HBeAg ( $-0.18 \log_{10}$  PEIU/ml;  $p < 0.01$ ), and significant decrease in both HBsAg ( $-3.26 \log_{10}$  IU/ml;  $p < 0.01$ ) and HBV DNA levels ( $-2.47 \log_{10}$  copy/ $\mu$ L;  $p < 0.01$ ). However, identically to the observations in the medium-dose group, the levels of HBeAg, HBsAg, and HBV DNA returned to the baseline. In the medium-dose group (20 mg/kg, IV), mice in group 5 were injected via the tail vein. Compared to the vehicle group, there was slight reduction in plasma HBeAg and HBV DNA levels on day 2 ( $0.12 \log_{10}$  PEIU/ml ( $p < 0.01$ ) and  $0.41 \log_{10}$  copies/ $\mu$ L ( $p < 0.01$ ), respectively). However, by day 10 post-dose, the HBsAg levels returned to the level of the vehicle group. The results of the entire experiment are presented in Fig. 6.

#### Evaluation of the *in vivo* anti-HBV activity by multiple dose injection

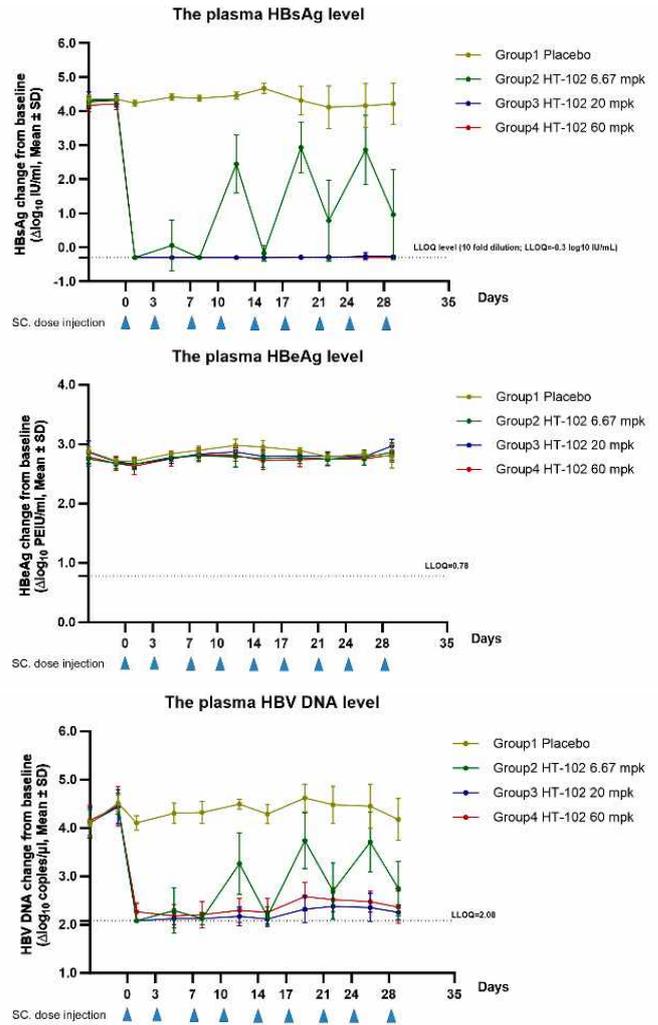
Group 2 (6.67 mg/kg, SC): HT-102 was administered subcutaneously at a dose of 6.67 mg/kg every three days. Compared to the vehicle group, the plasma HBeAg level in mice slightly decreased from day 8 to day 19 post-dose; the mean decrease ranged from 0.09 to 0.19  $\log_{10}$  PEIU/ml ( $p < 0.05$ ). The other time points were similar to those in the vehicle group. The plasma HBsAg level in mice was significantly reduced on day 1 after the first administration and decreased to the lower limit of quantification (LLOQ); the plasma level of HBsAg fluctuated between day 5 and day 29. A significant decline was observed on days 8, 15, 22, and 29; the mean decrease was 4.67, 4.84, 3.33, and 3.26  $\log_{10}$  IU/ml ( $p < 0.01$ ), respectively. Compared with the vehicle group, the plasma level of HBV DNA

in mice was significantly lower after the first administration of HT-102; subsequently, on days 5 through 29, there were fluctuations in the plasma levels of HBV DNA related to the administration time, with a significant decrease observed on days 8, 15, 22, and 29 (the mean decrease being 2.20, 2.12, 1.78, and 1.43  $\log_{10}$  copies/ $\mu$ L ( $p < 0.01$ ), respectively). Plasma levels of HBeAg in group 3 mice were slightly decreased (20 mg/kg) compared to the vehicle group on days 5 and day 12 through day 19 post-dose. The plasma levels of HBsAg in mice were significantly reduced on days 1 through 29, reaching the LLOQ value. The mean decrease in the HBsAg level was between  $-4.42$  and  $-4.97 \log_{10}$  IU/ml ( $p < 0.01$ ). In a similar manner, the plasma levels of HBV DNA in mice were significantly decreased at all time points between day 1 and day 29 compared to those in the vehicle group and slightly reduced, approaching the LLOQ value. The mean decrease in HBV DNA was between  $-1.92$  and  $-2.32 \log_{10}$  copy/ $\mu$ l ( $p < 0.01$ ). In group 4 mice, the serum levels of HBeAg were slightly decreased on days 12 through 19 compared to those in the vehicle group; the mean reduction range was  $-0.15$  to  $-0.23 \log_{10}$  PEIU/ml ( $p < 0.05$ ), while results similar to those in the vehicle group were observed for other time points. Furthermore, the serum HBsAg levels were significantly reduced on days 1 through 29, reaching the LLOQ value, the mean reduction range being  $-4.40$  to  $-4.97 \log_{10}$  IU/ml ( $p < 0.01$ ). In a similar manner, the serum levels of HBV DNA significantly decreased from day 1 to 29 and approached the LLOQ value, with mean reduction range of  $-1.81$  to  $-2.20 \log_{10}$  copy/ $\mu$ l ( $p < 0.01$ ). Detailed graphs are shown in Fig. 7.



**Fig. 6.** The effects of the test compound on HBsAg, HBeAg, and HBV DNA in the plasma of AAV/HBV mice. The plasma levels of HBsAg and HBeAg in mice were quantified by ELISA, while the HBV DNA level was determined by quantitative PCR analysis. Error bars represent standard errors

Figure 8 shows HBsAg expression in the liver for each mouse group. All the liver tissue sections harvested from AAV/HBV-infected mice were characterized by specific localization of HBsAg. Moreover, equine anti-HBsAg polyclonal antibody was used to stain brown for the positive control in IHC staining. Positive HBsAg expression was predominantly concentrated within the hepatic sinusoidal region and exhibited a radial distribution [21, 22]. Microscopic examination revealed a significant dose-dependent

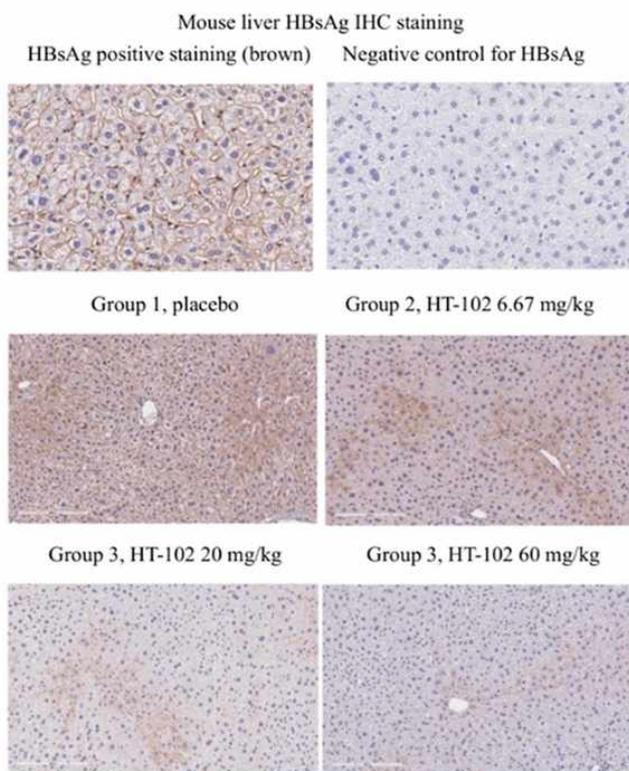


**Fig. 7.** The effects of the test compound on plasma levels of HBsAg, HBeAg, and HBV DNA in AAV/HBV mice. The plasma levels of HBsAg and HBeAg in mice were quantified by ELISA, while the HBV DNA level was determined by quantitative PCR analysis. Error bars represent standard errors

reduction in HBsAg expression in liver tissue samples from the low-dose, medium-dose, and high-dose groups compared to the placebo group. Notably, the lowest level of HBsAg positive expression was observed for mice in the high-dose group.

**DISCUSSION**

The excessive release of HBsAg in chronic HBV patients leads to tolerance to antibodies and cell-mediated immune responses, which currently is a major



**Fig. 8.** Immunohistochemical staining of HBsAg was performed in mouse liver samples to evaluate the anti-HBV activity in the AAV/HBV mouse model through multiple dose injections. The HBsAg levels in the mouse liver were determined by IHC staining, compared with positive and negative controls; groups 1 to 3 were sampled for liver tissue staining on day 29

obstacle to eradication of the virus [23, 24]. Therefore, it is crucial to identify approaches that can overcome immune tolerance and enable hosts to generate effective immune responses capable of clearing the virus and preventing further HBV infection [25, 26].

We conducted *in vitro* assays to evaluate the antiviral activity of the compound against hepatitis B virus (HBV) types B, C, and D. The HBeAg and HBsAg levels were quantified by ELISA, while human primary hepatocytes (PHHs) were employed for assessing the efficacy of the compound. Furthermore, no cytotoxic effects were observed within the tested concentration range. This study revealed no ADCC effect; however, HT-102 exhibited a weak and dose-dependent CDC effect. Subcutaneous administration of the test antibody at medium and high doses effectively reduced the HBeAg, HBsAg, and HBV DNA levels, being indicative of a significant dose-dependent response. Analysis of the ALT and AST levels in blood samples

revealed no significant elevation in the mean post-dose levels among the treatment groups, indicating that there was no adverse impact on liver function. Furthermore, repeated subcutaneous low-dose, medium-dose, and high-dose injections effectively reduced the HBeAg, HBsAg, and HBV DNA levels, while exhibiting a favorable dose-dependent effect across all dosage groups. The immunohistochemical staining data revealed significant decline in HBsAg expression in the liver tissue samples; mice in the high-dose group exhibited the lowest HBsAg positive expression.

The results of both *in vivo* and *in vitro* pharmacological experiments indicate that the *in vivo* studies yielded some unexpected outcomes. Specifically, single medium- and high-dose administration led to a rapid rebound in HBsAg levels. After multiple low-dose administrations, HBsAg biomarkers exhibited cross-correlation between rebound and inhibition. However, after administration of multiple medium and high doses, HBsAg biomarkers remained at or below the lower limit of detection. The low-dose group exhibited unsatisfactory findings, two fundamental reasons underlying this observation. First, immunogenicity played a crucial role. Although neutralizing antibodies had shown promising clinical effects, fully humanized antibodies may elicit immune responses in mice, resulting in production of antidrug antibodies (ADAs). ADAs could neutralize activity of the antibody drug, affect drug clearance and bioavailability, alter the pharmacokinetic characteristics of drugs, as well as interfere with or impede therapeutic efficacy [27–29]. A fluctuating rebound effect was observed in the medium-dose group. It was possible to detect the presence of antidrug antibody (ADA) in the blood serum of mice and assess changes in its pharmacokinetic properties, as well as conduct research on constructing a humanized liver chimeric mouse model infected with HBV. Second, the initial administration of neutralizing antibodies may induce a negative feedback regulation, thereby further stimulating the release of viral particles from infected hepatocytes, leading to the inefficacy observed in the low-dose group, while the medium-dose group exhibited a fluctuating rebound in the mouse model of HBV infection. However, the high-dose group directly neutralized both extracellular circulating HBV viral particles and newly secreted ones from infected hepatocytes, consistently maintaining them below the limit of quantification (LLOQ). This finding provided valuable insights for subsequent clinical dosing regimens [30]. ●

Appendix is available on the website  
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27457>.

REFERENCES

1. Liang T.J. // *Hepatology*. 2009. V. 49. P. S13–S21.
2. Papatheodoridi M., Tampaki M., Lok A.S., Papatheodoridis G.V. // *Hepatology*. 2022. V. 75. № 5. P. 1257–1274. doi: 10.1002/hep.32241
3. Orlando R., Foggia M., Maraolo A.E., Mascolo S., Palmiero G., Tambaro O. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015. V. 34. № 6. P. 1059–1070.
4. Kato T., Akari H. // *Uirusu*. 2023. V. 72. № 2. P. 149–158.
5. Veronese P., Dodi I., Esposito S., Indolfi G. // *World J. Gastroenterol.* 2021. V. 27. № 26. P. 4182–4193.
6. Hsu Y.C., Huang D.Q., Nguyen M.H. // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2023. V. 20. № 8. P. 524–537.
7. Wu C.R., Kim H.J., Sun C.P., Chung C.Y., Lin Y.Y., Tao M.H., Kim J.H., Chen D.S., Chen P.J. // *Hepatology*. 2022. V. 76. P. 207–219.
8. Sun L., Lu X., Li Ch., Wang M., Liu Q., Li Z., Hu X., Li J., Liu F., Li Q., et al. // *PLoS One*. 2009. V. 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005476>
9. Kashyap A.K., Steel J., Oner A.F., Dillon M.A., Swale R.E., Wall K.M., Perry K.J., Faynboym A., Ilhan M., Horowitz M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 5986–5991.
10. Barbas C.F. 3rd, Kang A.S., Lerner R.A., Benkovic S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 7978–7982.
11. Burm R., van Houtte F., Verhoye L., Mesalam A.A., Ciesek S., Roingeard P., Wedemeyer H., Leroux-Roels G., Meuleman P. // *JHEP Rep.* 2022. V. 5. № 3. P. 100646. doi: 10.1016/j.jhepr.2022.100646
12. Zhang H., Itoh Y., Suzuki T., Ihara K., Tanaka T., Haga S., Enatsu H., Yumiya M., Kimura M., Takada A., et al. // *Microbiol. Immunol.* 2022. V. 66. P. 179–192. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1348-0421.12964>
13. Yue M., Nie M., Huang X., Zhang T., Zhao Q. // *Chin. J. Microbiol. Immunol.* 2021. V. 41. P. 805–810. <https://rs.yiigle.com/CN115399202004/1340647.htm>
14. Yang D., Liu L., Zhu D., Peng H., Su L., Fu Y.X., Zhang L. // *Cell. Mol. Immunol.* 2013. V. 11. P. 71–78.
15. Donkers J.M., Appelman M.D., van de Graaf S.F.J. // *JHEP Rep.* 2019. V. 1. № 4. P. 278–285.
16. Guo H., Urban S., Wang W. // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. P. 1169770.
17. Hehle V., Beretta M., Bourguine M., Ait-Goughoulte M., Planchais C., Morisse S., Vesin B., Lorin V., Hieu T., Stauffer A., et al. // *J. Exp. Med.* 2020. V. 217. № 10. e20200840. doi: 10.1084/jem.20200840
18. Gelay J., Manganini M., Facchinetti V., Gramigna R., Broady R., Borleri G., Rambaldi A., Introna M. // *Haematologica*. 2003. V. 88. № 9. P. 1002–1012.
19. Smith M.R. // *Oncogene*. 2003. V. 22. № 47. P. 7359–7368.
20. Yang D., Liu L., Zhu D., Peng H., Su L., Fu Y.X., Zhang L. // *Cell. Mol. Immunol.* 2014. V. 11. № 1. P. 71–78.
21. He Z., Chen J., Wang J., Xu L., Zhou Z., Chen M., Zhang Y., Shi M. // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2021. V. 33. № 1. P. 76–82.
22. Song Z., Lin S., Wu X., Ren X., Wu Y., Wen H., Qian B., Lin H., Huang Y., Zhao C., et al. // *Hepatol Int.* 2023. V. 17. № 5. P. 1300–1317. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37368186/>
23. Qi R., Fu R., Lei X., He J., Jiang Y., Zhang L., Wu Y., Wang S., Guo X., Chen F., et al. // *J. Hepatol.* 2024. V. 80. № 5. P. 714–729. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38336348/>
24. Zhang Y.M., Yang Y.D., Jia H.Y., Zeng L.Y., Yu W., Zhou N., Li L.J. // *World J. Gastroenterol.* 2014. V. 20. № 15. P. 4407–4413.
25. Burm R., van Houtte F., Verhoye L., Mesalam A.A., Ciesek S., Roingeard P., Wedemeyer H., Leroux-Roels G., Meuleman P. // *JHEP Reports*. 2023. V. 5. № 3. 100646. doi: 10.1016/j.jhepr.2022.100646
26. Lempp F.A., Vincenzetti L., Volz T., Guarino B., Benigni F., Rosen L.E., Zatta F., Bianchi S., Lombardo G., Jaconi S., et al. // *American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Hepatology*. 2021. V. 74. P. 513A–514A.
27. Dingman R., Balu-Iyer S.V. // *J. Pharm. Sci.* 2019. V. 108. № 5. P. 1637–1654. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30599169/>
28. Vaisman-Mentesh A., Gutierrez-Gonzalez M., DeKosky B.J., Wine Y. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 1951. doi: 10.3389/fimmu.2020.01951
29. Lazar G.A., Desjarlais J.R., Jacinto J., Karki S., Hammond P.W. // *Mol. Immunol.* 2007. V. 44. № 8. P. 1986–1998.
30. Agarwal K., Yuen M.F., Wedemeyer H., Cloutier D., Shen L., Arizpe A., Pang P.S., Tay C., Gupta S.V., Cathcart A.L., et al. // *EASL International Liver Congress*. 2021. [https://www.natap.org/2021/EASL/EASL\\_43.htm](https://www.natap.org/2021/EASL/EASL_43.htm)

УДК 571.27

# Липополисахарид *Rhodobacter capsulatus* PG – потенциальный блокатор активации Toll-подобных рецепторов 2 и 4

С. В. Зубова<sup>1\*</sup>, Я. В. Радзюкевич<sup>2</sup>, Н. И. Косякова<sup>3</sup>, И. Р. Прохоренко<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт биологического приборостроения РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия<sup>2</sup>Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия<sup>3</sup>Больница Пущинского научного центра РАН, Пущино, 142290 Россия

\*E-mail: zusvet@rambler.ru

Поступило в редакцию 06.11.2024

Принято к печати 28.01.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27555

**РЕФЕРАТ** TLR2 и TLR4 играют ключевую роль в развитии воспаления в ответ на бактериальную инфекцию. На клетках цельной крови человека исследовали действие липополисахарида (LPS) *Rhodobacter capsulatus* PG на активацию синтеза провоспалительных цитокинов агонистами рецепторов TLR2 и TLR4 LPS *Escherichia coli*, липотейхоевой кислотой (LTA) *Streptococcus pyogenes* или Pam3CSK4 (синтетическим аналогом бактериальных липопептидов). Показано, что LPS *R. capsulatus* PG проявляет антагонистические свойства в отношении исследуемых агонистов TLR2 и TLR4, блокируя синтез цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-8. Предложены возможные механизмы блокирующего действия LPS *R. capsulatus* PG. LPS *R. capsulatus* PG может служить прототипом препаратов, защищающих как от грамотрицательных, так и от грамположительных бактерий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** липополисахариды, *Rhodobacter capsulatus*, липотейхоевые кислоты, Pam3CSK4, TLR, цитокины.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** KDO – 3-дезоксид-манно-октулозоновая кислота; LPS – липополисахарид; LTA – липотейхоевая кислота; IL – интерлейкин; MD-2 – белок миелоидной дифференцировки 2; Pam3CSK4 – синтетический триацилированный липопептид; PAMP – патогенраспознающие молекулярные паттерны; TLR – Toll-подобный рецептор; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$ .

## ВВЕДЕНИЕ

Распознавание патогена клетками крови является наиболее важным шагом в развитии адекватного иммунного ответа на инфекцию. TLR2 и TLR4 играют ключевую роль при воспалении благодаря способности идентифицировать определенные консервативные молекулярные структуры вторгшихся патогенов (PAMP) [1]. Эти рецепторы также формируют и связывают врожденные и адаптивные иммунные реакции. Изучение механизмов функциональных ответов клеток врожденного иммунитета на PAMP различной природы важно для разработки эффективных способов противодействия бактериальным и вирусным инфекциям. TLR4 является специфическим рецептором LPS, основного компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий [2]. Лигандная

специфичность TLR2 контролируется их гетеродимеризацией с TLR1 или TLR6. Триацилированные липопептиды вызывают гетеродимеризацию TLR2 с TLR1, а в ответ на диацилированные липопептиды TLR2 взаимодействует с TLR6 и CD36 [3]. Из трех липидных цепей триацилированного лиганда (в частности, Pam3CSK4) две взаимодействуют с TLR2, тогда как третья цепь занимает гидрофобный канал TLR1 [4]. Поскольку в молекуле TLR6 гидрофобный канал отсутствует, гетеродимер TLR2/TLR6 не может распознавать триацилированные липопептиды [5]. Способность TLR2 кооперироваться либо с TLR1, либо с TLR6 приводит к взаимодействию клеток крови с более широким спектром микробных продуктов, увеличивает продукцию провоспалительных цитокинов и осложняет патогенез сепсиса.

LPS фототрофной бактерии штамма *Rhodobacter capsulatus* PG, обладающий собственной низкой эндотоксической активностью, является антагонистом эндотоксинов [6]. Синтетический аналог липида A *R. capsulatus*, препарат E5531, способен блокировать иммунобиологическую активность LPS и LTA [7].

Задача настоящей работы состояла в изучении способности LPS *R. capsulatus* PG блокировать активацию клеток врожденного иммунитета лигандами TLR2 и TLR4 разной природы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проведены на цельной крови условно здоровых добровольцев в возрасте от 25 до 30 лет. Все испытуемые дали письменное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования соответствует Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.) и одобрен Локальным этическим комитетом больницы Пущинского научного центра (№ 2 от 10.04.2014). Забор периферической крови осуществляли в клинических условиях с использованием вакутейнеров (Becton Dickinson and Company, Великобритания), обработанных гепарином натрия (17 ед./мл).

### Активация клеток крови LPS, LTA или Pam3CSK4

Для изучения влияния LPS, LTA и Pam3CSK4 на синтез цитокинов цельную кровь разводили средой RPMI 1640 в соотношении 1 : 10 и инкубировали с LPS *E. coli* O55:B5 (100 нг/мл), LTA *Streptococcus pyogenes* (1000 нг/мл), синтетическим липопептидом Pam3CSK4 (300 нг/мл) (Sigma-Aldrich, США) или LPS *R. capsulatus* PG (1000 нг/мл) в различных сочетаниях в течение 6 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. LPS *R. capsulatus* PG получен согласно методике, описанной ранее [8]. Для определения антагонистического действия LPS *R. capsulatus* PG в отношении агонистов кровь предварительно инкубировали в течение 30 мин с LPS *R. capsulatus* PG, после чего добавляли LPS, LTA или Pam3CSK4. После инкубации клетки крови осаждали центрифугированием (300 g, 10 мин). Супернатанты отбирали и хранили при –20°C до определения содержания цитокинов.

### Содержание цитокинов

Содержание цитокинов определяли с помощью наборов для ИФА TNF-α, IL-6, IL-8 («Вектор-БЕСТ», Россия) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность образцов определяли на ИФА-анализаторе STAT FAX 3200 (Awareness Technology Inc., США) при длине волны 450 нм.

### Статистический анализ

Статистическую обработку и графическое представление результатов проводили методами непараметрической статистики в Origin Pro 7.5 и Microsoft Office Excel 2010 (плагин AtteStat). Результаты представлены в виде медианных значений с верхним и нижним квартилями (IQR). Статистическую значимость различий между медианными значениями определяли по критерию Манна–Уитни ( $p < 0.05$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Важнейшим звеном в цепочке активации синтеза цитокинов являются специфические рецепторы TLR2 и TLR4, обеспечивающие адекватный иммунный ответ на различные патогены. На клетках цельной крови человека в единой серии экспериментов исследовали активацию синтеза цитокинов TNF-α, IL-6 и хемокина IL-8 посредством лигандов TLR2 и TLR4: LPS *E. coli*, LTA *S. pyogenes* или Pam3CSK4. Активирующие лиганды стимулировали выработку TNF-α, IL-6 и IL-8 клетками крови, достоверно превышающую контрольные значения (рис. 1).

В ответ на активацию LTA *S. pyogenes* наблюдалось повышение синтеза TNF-α и IL-8, концентрации которых были выше, чем при воздействии LPS *E. coli* или Pam3CSK4. Иными словами, количество синтезируемых клетками цитокинов снижалось в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *E. coli* > Pam3CSK4. LPS *R. capsulatus* PG в концентрации, превышающей концентрацию эндотоксина *E. coli* в 10 раз, Pam3CSK4 в 3 раза и в равной концентрации с LTA *S. pyogenes* не стимулировал выработку TNF-α в клетках (рис. 1).

Содержание IL-8 и IL-6 в крови в ответ на LPS *R. capsulatus* PG незначительно увеличивалось по сравнению с контролем, но было значительно ниже, чем при активации клеток крови другими лигандами.

Изучение способности LPS *R. capsulatus* PG защищать от действия LPS *E. coli*, LTA *S. pyogenes* и Pam3CSK4 показало, что LPS *R. capsulatus* PG подавляет синтез TNF-α и IL-6 в крови, причем блокирование ответа снижалось в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *E. coli* > Pam3CSK4, как и при активации клеток крови исследованными лигандами. LPS *R. capsulatus* PG не защищал клетки крови от активации синтеза IL-8 посредством LPS *E. coli*, в отличие от активации посредством LTA *S. pyogenes* и Pam3CSK4. В этом случае защитный эффект LPS *R. capsulatus* PG был значительным.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе изучали потенциальную антагонистическую активность LPS непатогенной

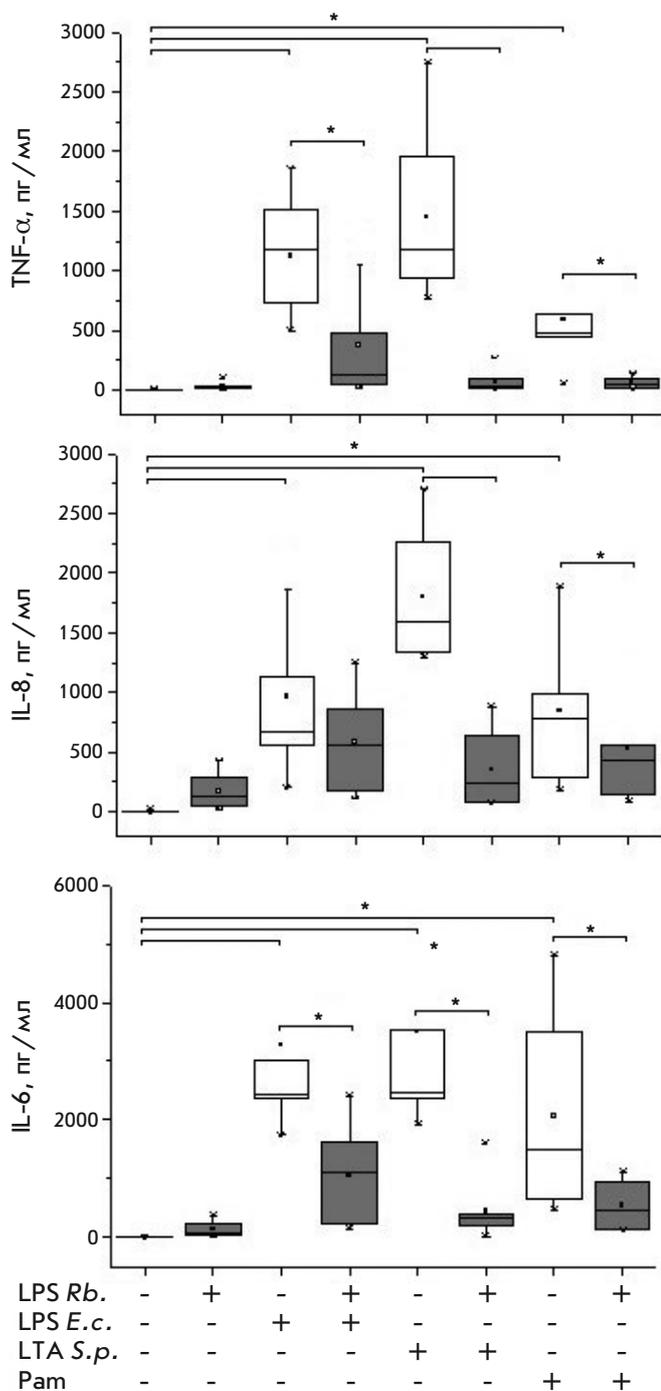


Рис. 1. Влияние LPS *R. capsulatus* PG на синтез TNF- $\alpha$ , IL-8 и IL-6 при активации клеток цельной крови LPS *E. coli*, LTA *S. pyogenes* или Pam3CSK4, n = 7. \*p < 0.05

бактерии *R. capsulatus* PG не только в отношении LPS грамотрицательной бактерии *E. coli* – типичного агониста TLR4, но также ди- или триацелированных липопептидов – LTA грамположительной бактерии *S. pyogenes* и синтетического аналога триацелированных липопептидов, Pam3CSK4.

Эндотоксическая активность LPS зависит от структуры липида А. Наиболее значимый фактор, определяющий связь между структурой липида А и токсичностью LPS, количество жирных цепей. Ранее было показано, что E5531, синтетический аналог липида А фототрофной бактерии *R. capsulatus* 37b4, блокирует иммунобиологическую активность LPS *E. coli* и LTA *Staphylococcus faecalis* [7]. В отличие от E5531, LPS *R. capsulatus* PG содержит не только атипичный липид А с пятью укороченными жирными кислотами, в том числе одной ненасыщенной, но и включает в свою структуру 3-дезоксид-манно-октулозоновую кислоту (KDO), внешний кор и О-антиген. Установлено, что внутренний кор LPS влияет не только на биологическую активность, но также на взаимодействие с белком MD-2 и TLR4 [9]. Для распознавания LPS TLR4 образует димер с мембранным белком MD-2, который связывается с LPS, образуя комплекс, способный активировать TLR4-положительные клетки [2]. Показано, что липид А *R. sphaeroides* полностью заполняет гидрофобный карман MD-2, формируя комплекс MD-2/липид А, который удерживается главным образом за счет гидрофобного взаимодействия между хвостами липида А и аминокислотами полости связывания MD-2. Tyr102 может отвечать за антагонистическую активность этого липида А из-за его перевернутого встраивания в комплексе MD-2/липид А [10]. MD-2 также участвует в TLR2-опосредованных ответах клеток крови на компоненты клеточной стенки грамположительных бактерий. MD-2 связывается с TLR2, но эта связь слабее, чем с TLR4 [11].

Для распознавания три- или диацелированных липопептидов TLR2 образует рецепторные гетеродимеры с TLR1 или с TLR6 [12]. Известно, что атипичные LPS *Legionella pneumophila* или *Rhizobium* spp. индуцируют воспалительные ответы скорее через TLR2, чем через TLR4 [13]. В нашей работе установлено, что LPS *R. capsulatus* PG блокирует активацию синтеза цитокинов в клетках крови агонистами не только TLR4, но также TLR2/6 и TLR2/1. Это указывает на то, что из-за особенностей состава и структуры липида А LPS *R. capsulatus* PG может связываться не только с TLR4, но и с TLR2. По-видимому, в противоположность классическим агонистам, структура липида А *R. capsulatus* PG не стимулирует образование гомодимера (TLR4)<sub>2</sub> или комплексов TLR2/TLR1 и TLR2/TLR6, необходимых для активации клеток с последующим синтезом провоспалительных цитокинов. Возможно, LPS *R. capsulatus* образует комплекс TLR2/MD-2/LPS<sub>Rb</sub>, блокирующий формирование гетерокомплексов TLR2/6 или TLR2/1 и по-

следующую TLR2-опосредованную активацию клеток посредством LTA или Pam3CSK4 с повышением синтеза цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-8.

В связи с тем, что LPS *R. capsulatus* PG блокирует активацию TLR4 и TLR2, нельзя исключить механизм его антагонистической активности, предложенный для LPS *Ochrobactrum intermedium* [14]. Этот низкотоксичный атипичный LPS при активации клеток крови индуцирует взаимодействие рецепторов TLR4 и TLR2 и образование гетеродимера TLR4/TLR2. Бактерии *R. capsulatus* PG и *O. intermedium* относятся к  $\alpha$ -подгруппе Proteobacteria [15]. LPS обеих бактерий обладают низкой эндотоксической активностью. В состав LPS этих бактерий входят липиды А, содержащие ненасыщенный жирнокислотный остаток, внутренний кор, внешний кор и О-антиген. Показано также, что сахара кора также участвуют в формировании низкоактивного комплекса TLR2/TLR4/MD-2 при ответе на LPS *O. intermedium* [14]. Нельзя исключить, что взятый в избытке LPS *R. capsulatus* PG также индуцирует формирование низкоактивного комплекса TLR4/MD-2/TLR2, который блокирует последующий синтез TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-8 в ответ на LPS *E. coli*, LTA *S. pyogenes* или Pam3CSK4.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов следует, что LPS *R. capsulatus* PG проявляет антагонистическую активность в отношении не только лигандов TLR4, но и лигандов TLR2 разной структуры, таких как три- и диацелированные липопептиды. Предложены возможные механизмы блокирующего действия LPS *R. capsulatus* PG в отношении активации TLR2 и TLR4.

LPS *R. capsulatus* PG может служить прототипом препаратов, защищающих как от грамотрицательных, так и от грамположительных бактерий. ●

*Авторы выражают благодарность  
Больнице Пуцинского научного центра РАН  
за сотрудничество.*

*Работа выполнена в рамках Госзадания  
1023033100509-9-1.6.7 и 122041200039-0, созданного  
Министерством науки и высшего образования  
Российской Федерации на базе Института  
биологического приборостроения и Института  
фундаментальных проблем биологии  
РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН.*

*Авторы заявляют об отсутствии  
конфликта интересов.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mukherjee S., Karmakar S., Babu S.P.S. // *Braz. J. Infect. Dis.* 2016. V. 20. № 2. P. 193–204.
- Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.-S., Lee H., Lee J.-O. // *Nature*. 2009. V. 458. № 7242. P. 1191–1195.
- Hoebe K., Georgel P., Rutschmann S., Du X., Mudd S., Crozat K., Sovath S., Shamel L., Hartung T., Zähringer U., et al. // *Nature*. 2005. V. 433. № 7025. P. 523–527.
- Triantafilou M., Gamper F.G.J., Haston R.M., Mouratis M.A., Morath S., Hartung T., Triantafilou K. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 41. P. 31002–31011.
- Maeshima N., Fernandez R.C. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013. V. 3. № 3. P. 1–13.
- Прохоренко И.П., Грачев С.В., Зубова С.В. Патент на изобретение RU № 2392309 от 20.06.2010.
- Kawata T., Bristol J.R., Rossignol D.P., Rose J.R., Kobayashi S., Yokohama H., Ishibashi A., Christ W.J., Katayama K., Yamatsu I., et al. // *Br. J. Pharmacol.* 1999. V. 127. № 4. P. 853–862.
- Махнева З.К., Вишневецкая Т.А., Прохоренко И.П. // *Прикл. биохим. и микробиол.* 1996. Т. 32. № 4. С. 444–447.
- Prokhorenko I., Zubova S., Kabanov D., Grachev S. // *Crit. Care*. 2014. V. 18. № 2. P. 7–8.
- Anwar M.F., Panneerselvam S., Shah M., Choi S. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 7657. P. 1–11.
- Dziarski R., Wang Q., Miyake K., Gupta D. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 3. P. 1938–1944.
- Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R.L., Akira S. // *J. Immunol.* 2002. V. 169. № 1. P. 10–14.
- Girard R., Pedron T., Uematsu S., Balloy V., Chignard M., Akira S., Chaby R. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. Pt 2. P. 93–302.
- Francisco S., Billod J.-M., Merino J., Punzon C., Gallego A., Arranz A., Martin-Santamaria S., Fresno M. // *Front. Immunol.* 2022. V. 12. № 748303. P. 1–12.
- Velasco J., Romero C., López-Goñi I., Leiva J., Díaz R., Moriyón I. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998. V. 48. Pt 3. P. 759–768.

УДК 575.858

# Межродовая геномная интрогрессия повышает адаптивный потенциал у девятииглой колюшки (*Pungitius pungitius*)

А. В. Недолужко<sup>1\*</sup>, Ф. С. Шарко<sup>1,2</sup>, С. М. Расторгуев<sup>3\*\*</sup><sup>1</sup>Европейский Университет в Санкт-Петербурге, Санкт-Петербург, 191187 Россия<sup>2</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, 123182 Россия<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 117997 Россия

\*E-mail: nedoluzhko@gmail.com

\*\*E-mail: rastorgueff@gmail.com

Поступило в редакцию 03.10.2024

Принято к печати 30.01.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27528

**РЕФЕРАТ** За последние десятилетия проведено значительное количество наблюдений, демонстрирующих важность геномной интрогрессии между относительно отдаленными видами позвоночных животных. В том числе, интрогрессия описана между двумя видами костистых рыб – трехиглой (*Gasterosteus aculeatus*) и девятииглой (*Pungitius pungitius*) колюшками. Полученные ранее полногеномные данные для обоих видов позволяют предположить, что морские популяции девятииглой колюшки увеличивают свой адаптивный потенциал к морской среде благодаря интрогрессивной гибридизации с проходной трехиглой колюшкой. Эти результаты требуют переосмысления механизмов эволюционного процесса, при которых новые признаки у организмов появляются не только путем долгого накопления случайных мутаций, но и через заимствования у других видов и экологических форм.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** интрогрессия, гибридизация, девятииглая колюшка, *Pungitius pungitius*, адаптация, трехиглая колюшка, *Gasterosteus aculeatus*.

## ВВЕДЕНИЕ

Естественная межвидовая гибридизация, которая приводит к появлению жизнеспособного и плодотворного потомства, происходит относительно часто даже между генетически отдаленными видами растений [1–3] и животных [4–8]. В большинстве случаев остается неясным, является ли такой обмен генами следствием случайных процессов или он играет значимую роль в адаптации видов к меняющимся условиям окружающей среды или при завоевании ими новых экологических ниш [9, 10].

В некоторых случаях показано, что геномная интрогрессия как следствие гибридизации может быть адаптивной, приводить к появлению морфологически и физиологически отличных форм при использовании генетического материала обоих родительских видов. Такие адаптивные механизмы продемонстрированы только в случае гибридных форм со значительным уровнем интрогрессии от обоих родителей [11–14]. В то же время до сих пор остается неясным, является ли не приводящая

к заметным морфологическим изменениям интрогрессия между видами адаптивной или она происходит случайно и со временем ее следы «вымываются» из генофонда видов.

Ранее интрогрессивная гибридизация была обнаружена нами в беломорских популяциях трехиглой (*Gasterosteus aculeatus*) и девятииглой (*Pungitius pungitius*) колюшек [15, 16]; предполагалось, что эта интрогрессия способствует появлению фенотипов девятииглой колюшки, адаптированных к морской воде. Следует отметить, что такой уровень интрогрессии не приводил к значительным морфологическим изменениям и мог идентифицироваться только с помощью полногеномного секвенирования. В этом случае также оставалось неясным, было ли появление интрогрессивных локусов у девятииглой колюшки следствием случайной гибридизации или же носило адаптивный характер [16].

В данной работе, опираясь на ранее опубликованные наборы геномных данных морских и пресноводных особей девятииглой колюшки [17] и используя

анализ D-статистики, известный также как ABBA-BAVA-тест [18], мы обнаружили следы интрогрессии трехиглой колюшки в генотипы голарктических популяций девятииглой колюшки. Кроме того, выявлен значительно более высокий уровень интрогрессии в морских, нежели чем в пресноводных популяциях девятииглой колюшки, что позволяет предположить, что интрогрессия между этими двумя видами имеет адаптивное значение.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Биоинформатический анализ

В данной работе использованы данные полногеномного секвенирования 870 особей девятииглой колюшки, ранее полученные Фенгом и соавт. для реконструкции филогеографической истории голарктических популяций девятииглой колюшки [17] и размещенные в Европейском нуклеотидном архиве, ENA (PRJEB39599).

Наборы геномных данных девятииглых колюшек были классифицированы нами в соответствии с их экотипом на морскую (271 экземпляр) и пресноводную (599 экземпляров) группы. Затем мы провели сравнительный анализ, направленный на оценку уровня геномной интрогрессии трехиглой колюшки в генотипы особей, относящихся к морскому и пресноводному экотипам девятииглой колюшки (рис. 1А).

Интрогрессию между двумя видами колюшек выявляли с помощью ABBA-BAVA-теста [18]; в качестве внешней группы для этого теста использовали геном обыкновенного лаврака (*Dicentrarchus labrax*, diclab1, PRJEB5099). Первоначально данные секвенирования каждой особи девятииглой колюшки, а также проходной трехиглой колюшки (SRR11611415) были откартированы на референсный геном *D. labrax* с использованием программного пакета bowtie2 (версия 2.3.4.1) с параметром *very-sensitive-local* [19] (Приложение 1). Затем откартированные данные были преобразованы из формата SAM в формат BAM, отсортированы и проиндексированы с помощью пакета SAMtools (версия 0.1.19) [20]. Полученные BAM-файлы анализировали при помощи программного пакета ANGSD [21] для оценки интрогрессии между проходной трехиглой колюшкой и двумя экотипами девятииглой колюшки. Значимость результатов тестов на интрогрессию оценивали с помощью непараметрического критерия Уилкоксона.

Для выявления локусов интрогрессии использовали таблицу SNP-генотипов, полученную при картировании данных геномного секвенирования на референсный геном *D. labrax*. В качестве референсного генома *P. pungitius* был выбран пресноводный об-

разец ERR9997510, который показал минимальное значение D-статистики. В качестве референса *G. aculeatus* использовали геномные данные особи SRR11611426, полученные Недолужко и соавт. [16]. Анализировали только те локусы, которые имели гомозиготное состояние по референсному аллелю у образца ERR9997510 и гомозиготное состояние по альтернативному аллелю у SRR11611426. Во всех отфильтрованных локусах вычисляли частоту альтернативного аллеля у всех особей морского экотипа девятииглой колюшки. В локусах, частота альтернативного аллеля в которых превышала 0,5, определяли гены с помощью картирования на референсную базу данных данио рерио (*Danio rerio*) GRCz11 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_000002035.6/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000002035.6/)) и программы blastx v2.12.0+ [22]. Анализ генных онтологий проводили с помощью веб-сервиса ShinyGO v0.81 [23].

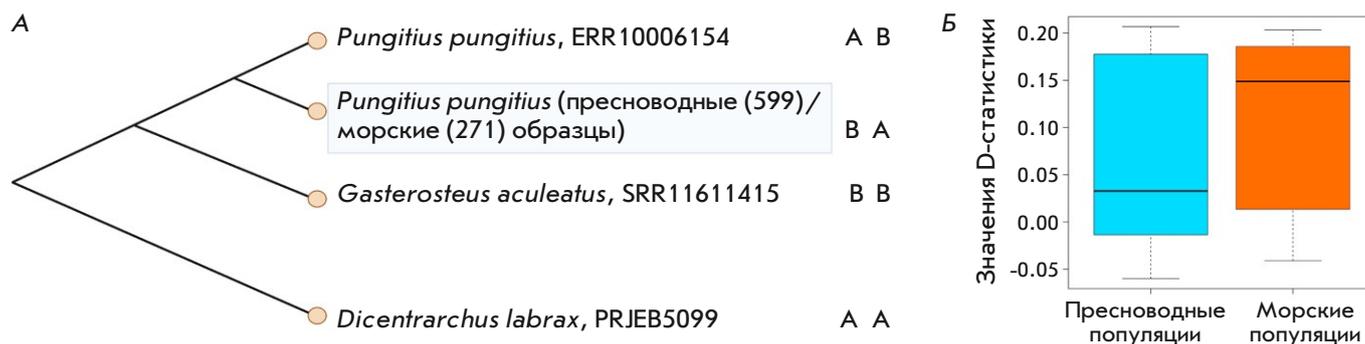
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Используя ABBA-BAVA-тест, мы оценили уровень интрогрессии трехиглой колюшки в генотипы особей девятииглой колюшки, относящихся к морскому и пресноводному экотипам. Интрогрессию оценивали путем вычисления значения D-статистики для каждой особи из обеих выборок (Приложение 1). Среднее распределение значений D-статистики в морских популяциях девятииглой колюшки составило 0.1488593, в то время как у пресноводных оно равнялось 0.03277605, что близко к нулю (рис. 1Б).

Таким образом, уровень интрогрессии от трехиглой колюшки к девятииглой был значительно выше в группе морских особей, чем в группе пресноводных особей (Приложение 1; рис. 1Б). Это открытие подтверждает гипотезу о том, что геномная интрогрессия от трехиглой колюшки к девятииглой, которая эволюционировала в основном в пресной воде [24] и, возможно, не очень хорошо адаптирована к морской среде, имеет адаптивный эффект [16].

Использование непараметрического критерия Уилкоксона позволило нам оценить статистическую значимость разницы значений D-статистики между морскими и пресноводными особями девятииглой колюшки ( $p$ -value = 1.004e-07), показав высокую достоверность различий в уровне интрогрессии в геномах морских и пресноводных особей девятииглой колюшки.

Предполагается, что более высокий уровень интрогрессии в морских популяциях может быть объяснен наличием в их геномах аллелей проходной трехиглой колюшки, которые закрепились в морских популяциях девятииглой колюшки, помогая их носителям быстрее адаптироваться к повышенной солености.



**Рис. 1.** ABBA-BABA-тест. А – схематическая интерпретация ABBA-BABA-теста для четырех таксонов, используемых для выявления интрогрессии между пресноводными и морскими популяциями девятиглай колюшки и трехиглой колюшки. АВ – случайно выбранная пресноводная девятиглая колюшка из набора данных, полученного Фенгом и соавт. [17]. ВА – особи морской и пресноводной девятиглай колюшки, изученные Фенгом и соавт. [17]. ВВ – геномные данные особи трехиглой колюшки, ранее опубликованные Недолужко и соавт. [16], АА – обыкновенный лаврак (*Dicentrarchus labrax*), внешняя группа. Б – распределение значений D-статистики среди пресноводных и морских особей девятиглай колюшки

Анализ участков интрогрессии выявил 715 локусов, в которых частота аллеля, характерного для трехиглой колюшки, превышает 0.5 в морских популяциях девятиглай колюшки. Эти локусы расположены в 432 генах. Список генов представлен в Приложении 2. Анализ обогащения генных категорий (gene ontology, GO analysis) показал, что список генов интрогрессии обогащен группами категорий, связанных с процессами развития организма, регуляции транскрипции, клеточной адгезии и трансмембранного ионного транспорта (Приложения 3–5). Эти группы генов, в первую очередь функционально связанные с клеточной адгезией и ионным транспортом, потенциально могут быть связаны с адаптацией к солености.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогресс и удешевление использования технологий глубокого секвенирования ДНК, а также появление принципиально новых методов биоинформатического анализа позволяют оценить причины взрывного видообразования, множественные экологические радиации, быструю адаптацию к изменяющейся среде обитания или же описать следы древней гибридизации в геномах [12, 14, 25].

Возможность интрогрессивной гибридизации между трехиглой и девятиглай колюшками в бассейне Белого моря была продемонстрирована ранее [15, 16]. Интересно, что большинство геномов изученных особей девятиглай колюшки имели слабые, но отчетливые сигналы интрогрессии от трехиглой колюшки [16], однако в отсутствие морских особей девятиглай колюшки не представлялось

возможным доказать адаптивный потенциал подобной межродовой интрогрессии. В настоящем исследовании, используя геномные данные морских и пресноводных популяций девятиглай колюшки и статистические тесты, наглядно показано, что морские популяции этого вида повышают адаптивность к солености за счет интрогрессии от преимущественно морского вида – трехиглой колюшки.

Полученные нами результаты подразумевают необходимость переосмысления имеющихся геномных данных с точки зрения того, что разрушение репродуктивных барьеров между видами, в том числе эволюционно отдаленными, происходит чаще, чем считалось ранее. Кроме того, интрогрессивная гибридизация может иметь значительный адаптивный потенциал в периоды изменений окружающей среды, глобальных катаклизмов и массового вымирания видов [11]. Другой вывод, вытекающий из полученных нами результатов, – необходимость более внимательного рассмотрения событий геномной интрогрессии как одного из существенных факторов эволюции. Кроме того, интрогрессию следует учитывать при проведении филогенетических исследований и оценки демографической истории видов, поскольку явления интрогрессивной гибридизации вносят значительный вклад в них. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-76-10054).

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27528>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hu L., Yang R., Wang Y.-H., Gong X. // *AoB PLANTS*. 2021. V. 13. № 2. P. plab012. doi: 10.1093/aobpla/plab012
2. Martin G., Cottin A., Baurens F.C., Labadie K., Hervouet C., Salmon F., Paulo-de-la-Reberdiere N., Van den Houwe I., Sardos J., Aury J.M., et al. // *Plant J*. 2022. V. 113. № 4. P. 802–818. doi: 10.1111/tpj.16086
3. Zhang H., Zhang X., Wu G., Dong C., Liu J., Li M. // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2022. V. 180. P. 107686. doi: 10.1016/j.ympev.2022.107686
4. Chiba S. // *Evolution*. 2005. V. 59. P. 1712–1720.
5. Nichols P., Genner M.J., van Oosterhout C., Smith A., Parsons P., Sungani H., Swanstrom J., Joyce D.A. // *Proc. Biol. Sci.* 2015. V. 282. P. 20142272. doi: 10.1098/rspb.2014.2272
6. Pereira R.J., Barreto F.S., Burton R.S. // *Evolution*. 2014. V. 68. P. 204–215. doi: 10.1111/evo.12254
7. Korniienko Y., Nzimora K.C., Vater M., Tiedemann R., Kirschbaum F. // *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens Neural Behav. Physiol.* 2022. V. 208. P. 355–371. doi: 10.1007/s00359-022-01542-5
8. Wang Y., Wang Y., Cheng X., Ding Y., Wang C., Merila J., Guo B. // *Mol. Biol. Evolution*. 2023. V. 40. № 2. P. msad026. doi: 10.1093/molbev/msad026
9. Frei D., Reichlin P., Seehausen O., Feulner P.G.D. // *Mol. Ecol.* 2022. V. 32. P. 841–853. doi: 10.1111/mec.16791
10. Heliconius Genome C. // *Nature*. 2012. V. 487. P. 94–98. doi: 10.1038/nature11041
11. Brauer C.J., Sandoval-Castillo J., Gates K., Hammer M.P., Unmack P.J., Bernatchez L., Beheregaray L.B. // *Nat. Climate Change*. 2023. V. 13. P. 282–289. doi: 10.1038/s41558-022-01585-1
12. Lamichhaney S., Han F., Webster M.T., Andersson L., Grant B.R., Grant P.R. // *Science*. 2018. V. 359. P. 224–228. doi: 10.1126/science.aao4593
13. Levin B., Simonov E., Gabrielyan B.K., Mayden R.L., Rastorguev S.M., Roubenyan H.R., Sharko F.S., Nedoluzhko A.V. // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2022. V. 167. P. 107346. doi: 10.1016/j.ympev.2021.107346
14. Meier J.I., Marques D.A., Mwaiko S., Wagner C.E., Excoffier L., Seehausen O. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 14363. doi: 10.1038/ncomms14363
15. Nedoluzhko A., Sharko F., Tsygankova S., Boulygina E., Ibragimova A., Teslyuk A., Galindo-Villegas J., Rastorguev S. // *Heliyon*. 2021. V. 7. № 2. P. e06160. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06160
16. Nedoluzhko A., Sharko F., Tsygankova S., Boulygina E., Slobodova N., Teslyuk A., Galindo-Villegas J., Rastorguev S. // *Front Genet.* 2022. V. 13. P. 863547. doi: 10.3389/fgene.2022.863547
17. Feng X., Merila J., Loytynoja A. // *Mol. Ecol.* 2022. V. 31. P. 5386–5401. doi: 10.1111/mec.16651
18. Green R.E., Krause J., Briggs A.W., Maricic T., Stenzel U., Kircher M., Patterson N., Li H., Zhai W., Fritz M.H., et al. // *Science*. 2010. V. 328. P. 710–722. doi: 10.1126/science.1188021
19. Langmead B., Salzberg S.L. // *Nat. Meth.* 2012. V. 9. P. 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
20. Li H. // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2987–2993. doi: 10.1093/bioinformatics/btr509
21. Korneliussen T.S., Albrechtsen A., Nielsen R. // *BMC Bioinformatics*. 2014. V. 15. P. 356. doi: 10.1186/s12859-014-0356-4
22. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. P. 421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421
23. Ge S.X., Jung D., Yao R. // *Bioinformatics*. 2020. V. 36. P. 2628–2629. doi: 10.1093/bioinformatics/btz931
24. Wang C., Shikano T., Persat H., Merilä J. // *J. Biogeography*. 2015. V. 42. P. 2334–2348. doi: https://doi.org/10.1111/jbi.12591
25. Brawand D., Wagner C.E., Li Y.I., Malinsky M., Keller I., Fan S., Simakov O., Ng A.Y., Lim Z.W., Bezault E., et al. // *Nature*. 2014. V. 513. P. 375–381. doi: 10.1038/nature13726

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и все необходимые файлы следует загрузить на сайт [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru):

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru)).

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).

- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком \*.
- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А.А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах:  $T_{\text{пл}}$  – температура плавления,  $T_{\text{ф.п}}$  – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не  $\mu\text{M}$ ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « $\times$ ». Знак « $\times$ » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « $\cdot$ » обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК-РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращением (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам

в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте цифрами в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

*Для книг:* фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

*Для периодических изданий:* фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи, doi. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337. doi: 10.1038/nature03440.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. Дис. ... канд. мед. наук. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

**Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.**