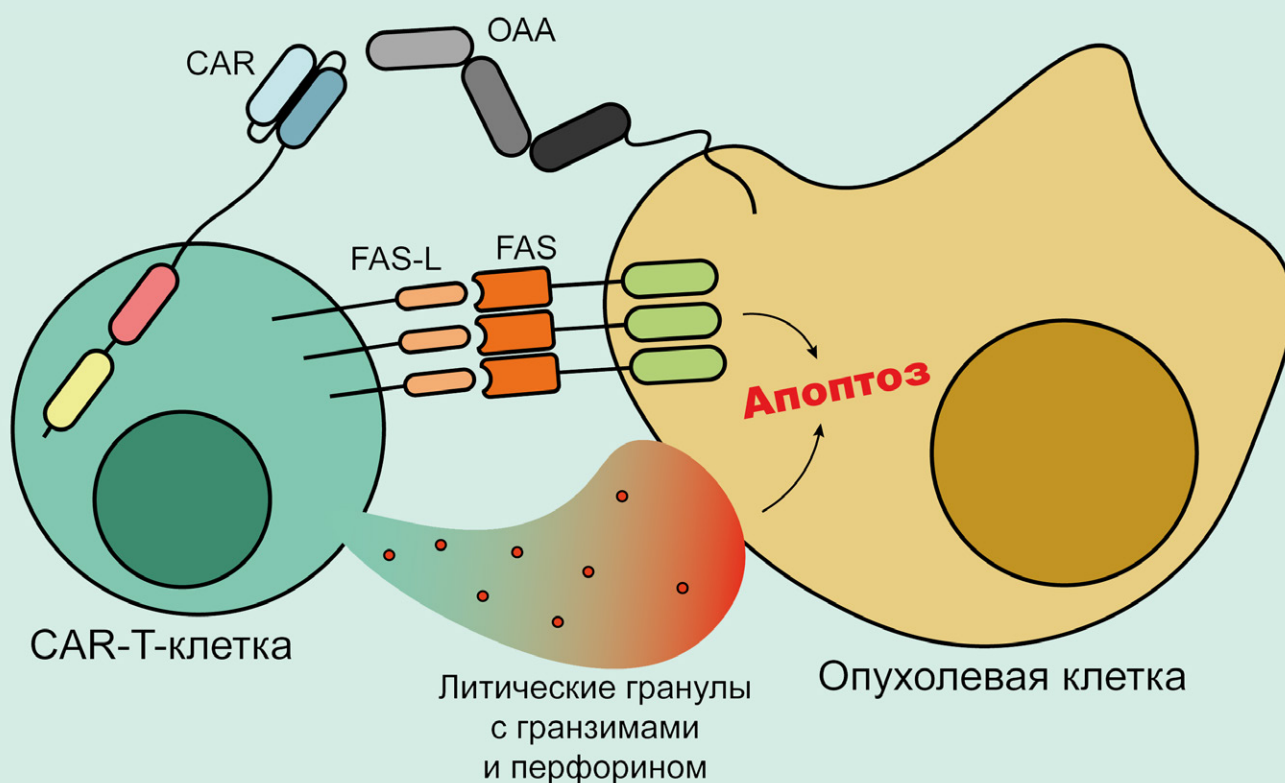


Acta Naturae

Влияние внутриклеточных доменов химерных антигенных рецепторов на свойства CAR-T-клеток



РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ГЕНОВ,
АССОЦИИРОВАННЫХ
С ИНВАЗИЕЙ ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

СТР. 18

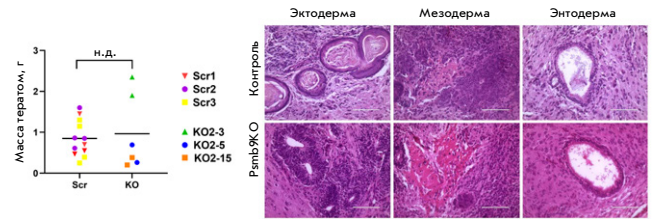
ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД
КАЛЬЦИЯ – КАК ВАЖНЫЙ МЕХАНИЗМ
АДАПТАЦИИ ОПУХОЛИ
К АГРЕССИВНОМУ МИКРООКРУЖЕНИЮ

СТР. 28

Получение и характеристика линии эмбриональных стволовых клеток мыши с нокаутом гена иммунопротеасомы *Psmb9*

Д. В. Кригер, У. И. Поденкова, А. А. Кузьмин, Н. Д. Аксенов, А. В. Кропачева, А. С. Зиновьева, А. В. Селенина, А. Н. Томилин, А. С. Цимоха

С использованием технологии CRISPR/Cas9 создана линия эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши с нокаутом гена *Psmb9*, кодирующего каталитическую субъединицу иммунопротеасомы – Lmp2 ($\beta 1i$). Установлено, что отсутствие Lmp2 не влияет на морфологию и пролиферативную активность ЭСК, а также на их плюрипотентный статус. Данная клеточная линия представляет перспективный инструмент для изучения роли гена *Psmb9* и иммунопротеасом в последующих этапах дифференцировки ЭСК *in vitro*.



Оценка плюрипотентных свойств *in vivo* линий ЭСК с нокаутом гена *Psmb9* с помощью тератомного теста

Сервер PepString для поиска коротких аминокислотных подпоследовательностей: определение возможных мишеней бета-амилоида



Форма запроса для поиска последовательностей белков, содержащих точные вхождения коротких пептидов, с помощью сервера PepString (<http://pepstring.eimb.ru>)

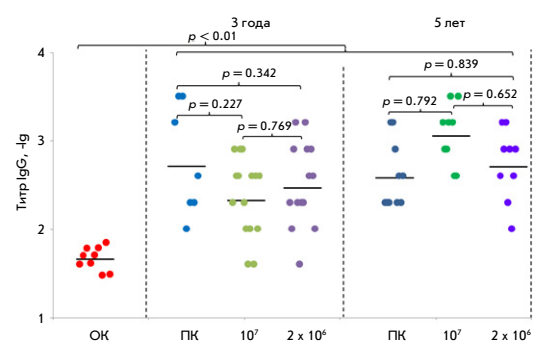
С. А. Козин, А. А. Анашкина, Д. Г. Мацуга, Б. С. Суваан, В. Г. Туманян, В. А. Митькевич, А. А. Макаров

Представлен новый биоинформатический инструмент для поиска коротких аминокислотных последовательностей в белковых молекулах, аннотированных в публичных базах данных (UniProtKB, SwissProt). Продемонстрировано его использование на примере поиска в протеоме человека тетрапептида EVNH, который является молекулярной детерминантой бета-амилоида и участвует в критических для патогенеза болезни Альцгеймера взаимодействиях. Представленная программа (сервер PepString, <http://pepstring.eimb.ru>) позволяет с помощью интуитивно понятных запросов получить информацию обо всех возможных белках, в которых присутствуют интересующие последовательности и их комбинации.

Гуморальный и клеточный иммунный ответ на введение добровольцам вакцины ОртопоксВак

С. Н. Щелкунов, Е. Ю. Прудникова, А. А. Шестакова, С. Н. Якубический, С. А. Пьянков, А. Е. Нестеров, С. В. Усова, М. П. Богрянцева, Е. А. Нечаева, Т. В. Трегубчак, А. П. Агафонов

Первая в мире противооспенная вакцина четвертого поколения ОртопоксВак проявила себя как безопасная слабо реактогенная по сравнению с живой оспенной вакциной первого поколения, но сохранившая на том же уровне иммуногенные свойства. В представленной работе анализировали уровни специфического гуморального и Т-клеточного иммунных ответов на внутрикожное введение добровольцам вакцины ОртопоксВак однократно в дозе 10^7 ООЕ или двукратно в дозе 10^6 ООЕ через 1,5, 3 и 5 лет после вакцинации. На основании полученных результатов можно заключить, что вакцина ОртопоксВак при внутрикожном однократном введении в дозе 10^7 ООЕ обеспечивает выраженный специфический гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ в течение, по крайней мере, трех лет.



Логарифмы титров ИФА специфических IgG к антигенам ВОВ в сыворотках крови добровольцев, участвующих в клинических испытаниях вакцины ОртопоксВак

Acta Naturae

ТОМ 17, № 3 (66), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 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

Корректур: 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 сентября 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

Д. В. Волков, В. М. Степанова, И. А. Ярошевич,
А. Г. Габибов, Ю. П. Рубцов

Влияние внутриклеточных доменов
химерных антигенных рецепторов
на свойства CAR-T-клеток 4

М. А. Дымова, О. А. Картина, Д. В. Дроков,
Е. В. Кулигина, В. А. Рихтер
РНК-интерференция генов,
ассоциированных с инвазией опухолевых
клеток головного мозга 18

А. Ю. Скопин, Е. В. Казначеева Депо-управляемый вход кальция — как важный механизм адаптации опухоли к агрессивному микроокружению	28
---	----

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Д. О. Егорова, С. В. Гейн, Н. А. Королев, Н. П. Логинова Орто- и мета-моноклорированные бифенилы угнетают гуморальный иммунитет и оказывают токсическое воздействие на клетки печени мышей.	40
---	----

Т. Н. Ерохина, Е. В. Рябухина, И. С. Ляпина, Д. Ю. Рязанцев, С. К. Завриев, С. Ю. Морозов Пептид mPER-156a капусты повышает уровень накопления собственной мРНК в трансгенном мхе <i>Physcomitrium patens</i>	44
--	----

А. С. Зеленцова, В. М. Покровский, Е. А. Патраханов, В. С. Шмигера, М. Ю. Скоркина, А. В. Дейкин У мышей с нокаутом гена <i>p2rx3</i> изменен энергетический метаболизм нейронов гиппокампа	49
--	----

А. А. Клеймёнова, И. А. Абрамов, Я. В. Ткачев, П. С. Галеева, В. А. Клеймёнова, Н. Ф. Закирова, С. Н. Кочетков, М. В. Козлов Дизайн, синтез и оценка биологической активности гидроксамовых производных сорафениба	56
---	----

С. А. Козин, А. А. Анашкина, Д. Г. Мацуга, Б. С. Суваан, В. Г. Туманян, В. А. Митькевич, А. А. Макаров Сервер PepString для поиска коротких аминокислотных подпоследовательностей: определение возможных мишеней бета-амилоида	67
---	----

Д. В. Кригер, У. И. Поденкова, А. А. Кузьмин, Н. Д. Аксенов, А. В. Кропачева, А. С. Зиновьева, А. В. Селенина, А. Н. Томилин, А. С. Цимоха Получение и характеристика линии эмбриональных стволовых клеток мыши с нокаутом гена иммунопротеасомы <i>Psmb9</i>	77
---	----

Г. М. Прошкина, Е. И. Шрамова, А. Б. Миркасымов, И. Н. Завестовская, С. М. Деев Адресные нанолипосомы для доставки бор-фенилаланина к HER2-положительным клеткам	88
---	----

Е. А. Цымбалова, Е. А. Чернявская, Г. Н. Бисага, А. Ю. Полушин, Е. И. Лопатина, И. Н. Абдурасулова, В. И. Людыно Статус метилирования LINE-1 у пациентов с рассеянным склерозом ассоциирован с изменениями фолатного обмена	94
--	----

С. Н. Щелкунов, Е. Ю. Прудникова, А. А. Шестакова, С. Н. Якубицкий, С. А. Пьянков, А. Е. Нестеров, С. В. Усова, М. П. Богрянцева, Е. А. Нечаева, Т. В. Трегубчак, А. П. Агафонов Гуморальный и клеточный иммунный ответ на введение добровольцам вакцины ОртопоксВак	104
---	-----

А. Ю. Руденко, П. А. Зотова, О. А. Аверина, А. В. Приймак, М. П. Рубцова, С. С. Марьясина, Р. М. Ожиганов, О. А. Донцова, П. В. Сергиев Тест-система для изучения транспорта биотина при инаktivации гена <i>SLC5A6</i>	119
--	-----

Правила для авторов	130
---------------------------	-----

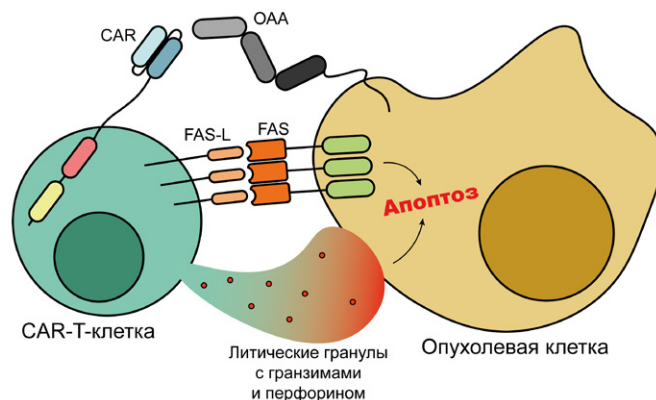


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Волкова и др.)

Влияние внутриклеточных доменов химерных антигенных рецепторов на свойства CAR-T-клеток

Д. В. Волков^{1*}, В. М. Степанова¹, И. А. Ярошевич^{1,2}, А. Г. Габибов¹, Ю. П. Рубцов¹

¹ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

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

*E-mail: ya.wolf.otl@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.06.2025

Принята к печати 02.07.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27728

РЕФЕРАТ Технология модификации Т-клеток химерными антигенными рецепторами (CAR – chimeric antigen receptor) расширила возможности терапии онкогематологических заболеваний и изменила вектор развития исследований в области инженерии иммунных клеток и иммунотерапии. К сожалению, успехи терапии Т-клетками, модифицированными химерными антигенными рецепторами (CAR-T-cell – chimeric antigen receptor modified T cell), в отдельных случаях онкогематологических заболеваний и солидных опухолей ограничены рядом факторов, а именно: (1) избыточным или недостаточным ответом CAR-T-клеток, развивающимся как из-за резистентности опухолевых клеток или их микроокружения, так и за счет неоптимальной структурно-функциональной организации химерного рецептора; (2) не самым функциональным фенотипом готового CAR-T-клеточного продукта, формирование которого является прямым следствием процесса получения CAR-T-клеток и их экспансии; (3) отсутствием адекватной системы управления CAR-T-клетками после введения пациенту. Поэтому актуальные задачи современных исследований включают оптимизацию структуры CAR и технологий их получения, а также дополнительные модификации CAR-T-клеток. Одно из главных направлений повышения эффективности терапии с помощью CAR-T-клеток – это оптимизация структуры CAR с целью улучшения функционирования модифицированных клеток. С момента появления первых CAR-T-клеток создано пять поколений CAR, в которых использованы как новые сочетания сигнальных и структурных доменов в одной молекуле, так и новые системы из нескольких химерных молекул, представленных одновременно на поверхности Т-клеток. Рациональная комбинация составных частей CAR должна обеспечивать высокую чувствительность рецептора к антигену, образование устойчивого иммунного синапса (ИС), эффективную костимуляцию и продуктивную активацию CAR-T-клетки. Сочетание современных технологий – машинного обучения для предсказания трехмерной структуры и свойств биополимеров, а также высокопроизводительного секвенирования и омиксных технологий – открывает новые горизонты для направленной модификации структуры CAR. Ключевым становится выбор конкретных модификаций и сочетаний костимулирующих и сигнальных доменов с целью повышения цитотоксичности, пролиферации и персистенции CAR-T-клеток. В представленном обзоре обсуждаются последние достижения в области оптимизаций CAR с акцентом на изменения, которые должны улучшать функции терапевтических CAR-T-клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА CAR-T, костимуляторные молекулы, CD3, внутриклеточный сигналинг, Т-клеточные рецепторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CAR – химерный антигенный рецептор; CAR-T-клетки – Т-клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором; ИС – иммунный синапс; OAA – опухоль-ассоциированный антиген; FAS-L – Fas-лиганд; FAS – Fas-рецептор; ICD – внутриклеточный домен; scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент; VHH – вариабельный фрагмент наноантитела; CD – кластер дифференцировки; BCMA – антиген созревания В-клеток; IgSF – суперсемейство иммуноглобулинов; TNFRSF – суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли; TNFSF – суперсемейство фактора некроза опухоли; АПК – антигенпрезентирующая клетка; ГКГCI/II – главный комплекс гистосовместимости I и II типа; ТКР – Т-клеточный рецептор; α , β – распознающие цепи Т-клеточного рецеп-

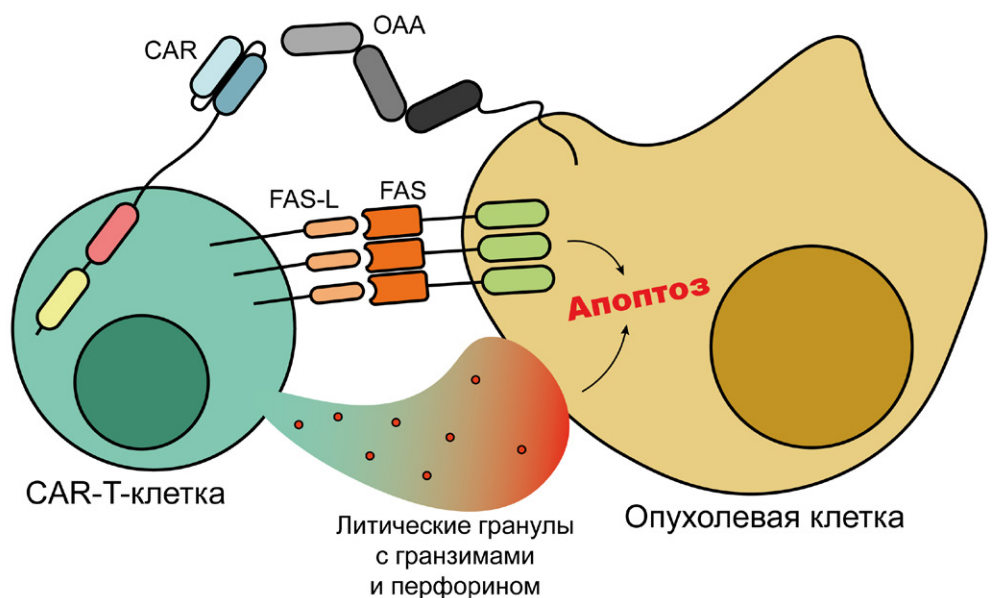
тора; ξ , γ , δ , ε – белки группы CD3 Т-клеточного рецептора; ITAM – иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив; АК – аминокислота; Y – тирозин; Тn-клетки – наивные Т-клетки; ICOSL – лиганд рецептора ICOS; ИЛ – интерлейкин; ИФН- γ – интерферон-гамма; TNF- α – фактор некроза опухоли-альфа; Treg-клетки – регуляторные Т-клетки; FAP – белок, активирующий фибробласты; Th-клетки – Т-хелперы; Тm-клетки – Т-клетки памяти; TRAF – рецепторы, связывающие факторы, ассоциированные с рецептором фактора некроза опухоли; Тcm-клетки – Т-клетки центральной памяти; HVEM – медиатор проникновения вируса герпеса; Тем-клетки – Т-клетки эффекторной памяти; GITR – глюкокортикоид-индуцированный TNF-рецептор-связанный белок; BRS – участки некоторых молекул CD3, обогащенные положительно заряженными АК; RK – рецепторная киназа; PRS – богатая пролином последовательность CD3 ε ; PKC – протеинкиназа C; bCAR – химерные антигенные рецепторы, в которых сигнальные домены представлены частями различных внутриклеточных сигнальных партнеров ТКР; ZAP70KD – киназный домен ZAP70.

ВВЕДЕНИЕ

Традиционные методы лечения опухолевых заболеваний – химио- и лучевая терапия – в настоящее время достаточно часто сочетаются с относительно новыми – иммунотерапевтическими. К ним относятся терапия препаратами моноклональных антител, биспецифическими активаторами Т-клеток, а также клеточная терапия, в том числе CAR-T-клетками, на которых сфокусирован наш обзор. Постепенный сдвиг в сторону более специфичных или, как их называют, таргетных методов лечения объясняется низкой эффективностью и тяжелыми побочными реакциями традиционных методов терапии (например, системной генотоксичностью) [1], а также возросшим потенциалом новых методов терапии, что особенно ярко демонстрирует технология CAR-T-терапии в случае онкогематологических заболеваний [2]. Принцип действия CAR-T-терапии основан на распознавании поверхностных маркеров опухолевых клеток, что позволяет специфично воздействовать на них цитотоксическими CAR-T-клетками (рис. 1).

Это воздействие обеспечивается CAR, который состоит из трех основных доменов – внеклеточного, ответственного за распознавание антигена и подвижность распознающей части, трансмембранного, участвующего в формировании ИС, и внутриклеточного, содержащего костимулирующие и сигнальные домены, которые определяют весь спектр ответов CAR-T-клеток на специфическую активацию при связывании антигена. При этом внеопухолевая токсичность таких иммунотерапевтических препаратов существенно ниже по сравнению с традиционной терапией [3]. Кроме того, CAR-T-терапия, в случае успеха, позволяет сформировать популяцию специфичных клеток памяти, что обеспечивает долгую ремиссию [4]. К сожалению, несмотря на отдельные успехи в применении CAR-T-клеток, остаются пациенты, которым CAR-T-терапия в существующем виде помогает лишь временно, в силу недостаточной персистенции или цитотоксичности высокоперсонализированных клеточных препаратов. Поэтому усилия исследователей направлены на по-

Рис. 1. Механистический принцип CAR-T-терапии. Взаимодействие CAR-T-клетки с опухолевой клеткой обеспечивается специфичным распознаванием опухоль-ассоциированного антигена (ОАА) химерным рецептором. Это приводит к активации цитотоксических функций CAR-T-клетки, опосредованных выделением литических гранул с гранзимами и перфорином, а также взаимодействием Fas-лиганда (FAS-L) и Fas-рецептора (FAS). В результате наблюдается апоптоз опухолевой клетки



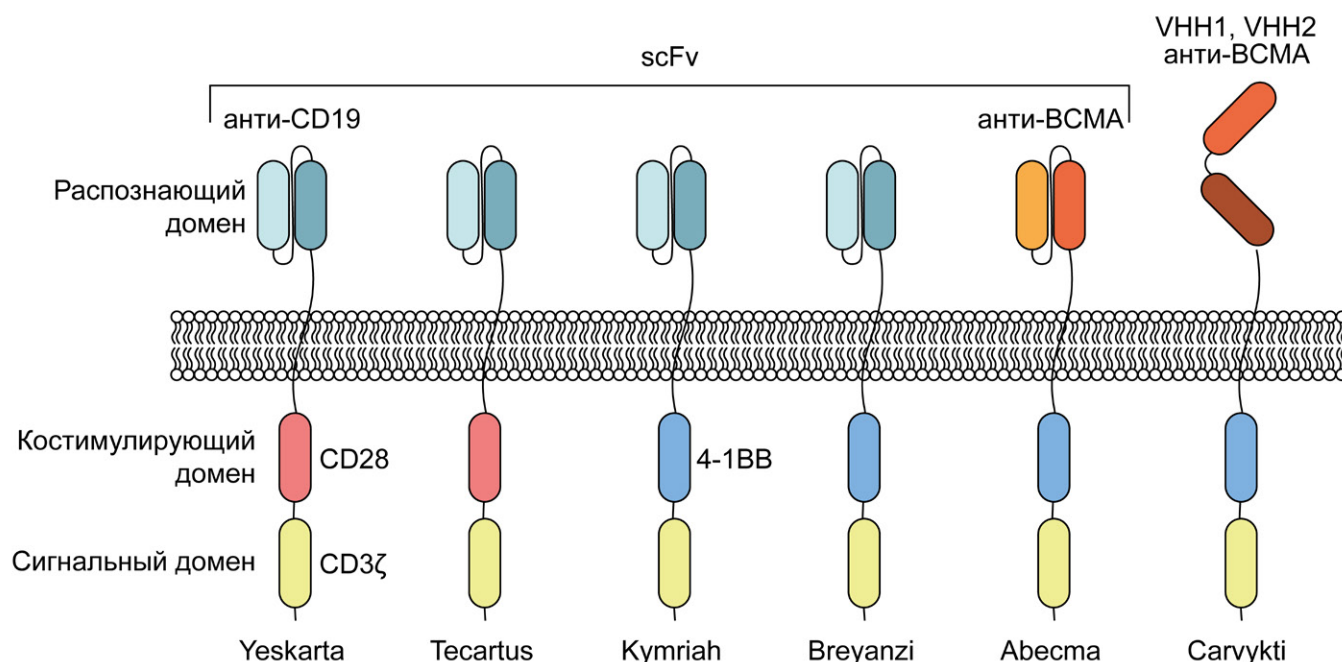


Рис. 2. Одобренные к применению CAR-T-клеточные препараты. Показаны основные домены, обеспечивающие распознавание и передачу сигнала внутриклеточным партнерам. scFv – одноцепочечный переменный фрагмент; VHH – переменный фрагмент наноклона; CD – кластер дифференцировки; BCMA – антиген созревания В-клеток

вышение эффективности CAR-T-терапии. Одним из ключевых факторов этого является эффективность передачи сигнала от CAR на мембране внутрь клеток, что вызывает активацию транскрипционных программ, ответственных за цитотоксичность, выживание активированных клеток, их пролиферацию, секрецию цитокинов и литических гранул, метаболизм и другие функции. За передачу сигнала отвечают внутриклеточные домены (ICD – intracellular domain) CAR, оптимизации структуры которых посвящен данный обзор.

КОСТИМУЛИРУЮЩИЕ ДОМЕНЫ

В CAR-T-клеточных препаратах, одобренных для клинического применения, роль костимулирующих доменов выполняют внутриклеточные части достаточно хорошо изученных костимулирующих мембранных молекул Т-клеток – CD28 и 4-1BB [5] (рис. 2).

Эти мембранные белки относятся к двум суперсемействам – иммуноглобулиновому (IgSF – immunoglobulin superfamily) и семейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF – tumor necrosis factor receptor superfamily) соответственно. На разных стадиях разработки находятся CAR с другими костимулирующими доменами, которые также входят в эти семейства – ICOS, OX40, CD27 и др. (рис. 3).

Суперсемейство иммуноглобулинов

Среди рецепторов, относящихся к IgSF, молекулы CD28 и ICOS функционируют как стимуляторы Т-клеток за счет консервативного мотива YXXM (X – любая аминокислота (АК)), содержащего остаток тирозина (Y), который при активации фосфорилируется, что стимулирует взаимодействие с внутриклеточными сигнальными партнерами, в том числе с различными киназами.

CD28. CD28 был первым костимулятором, использованным для получения модифицированных Т-клеток, содержащих CAR второго поколения [6], которые обладали преимуществами в персистенции и секреции цитокинов по сравнению с клетками первого поколения, содержащими только сигнальный домен CD3ζ [7]. Сигналы CD28 критически важны для активации наивных Т-клеток (Tn – naive T cell), так как предохраняют эти клетки от анергии [8], а также поддерживают такие процессы, как секреция цитокинов, пролиферация Т-клеток и их дифференцировка в эффекторные клетки. Взаимодействие CD28 с несколькими лигандами, в числе которых CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) и B7-H2 (ICOSL), который одновременно является лигандом ICOS, приводит к его активации. Функциональные мотивы во внутриклеточной части CD28 – проксимальные (YMNМ, PRRP) и дистальный (PYAP)

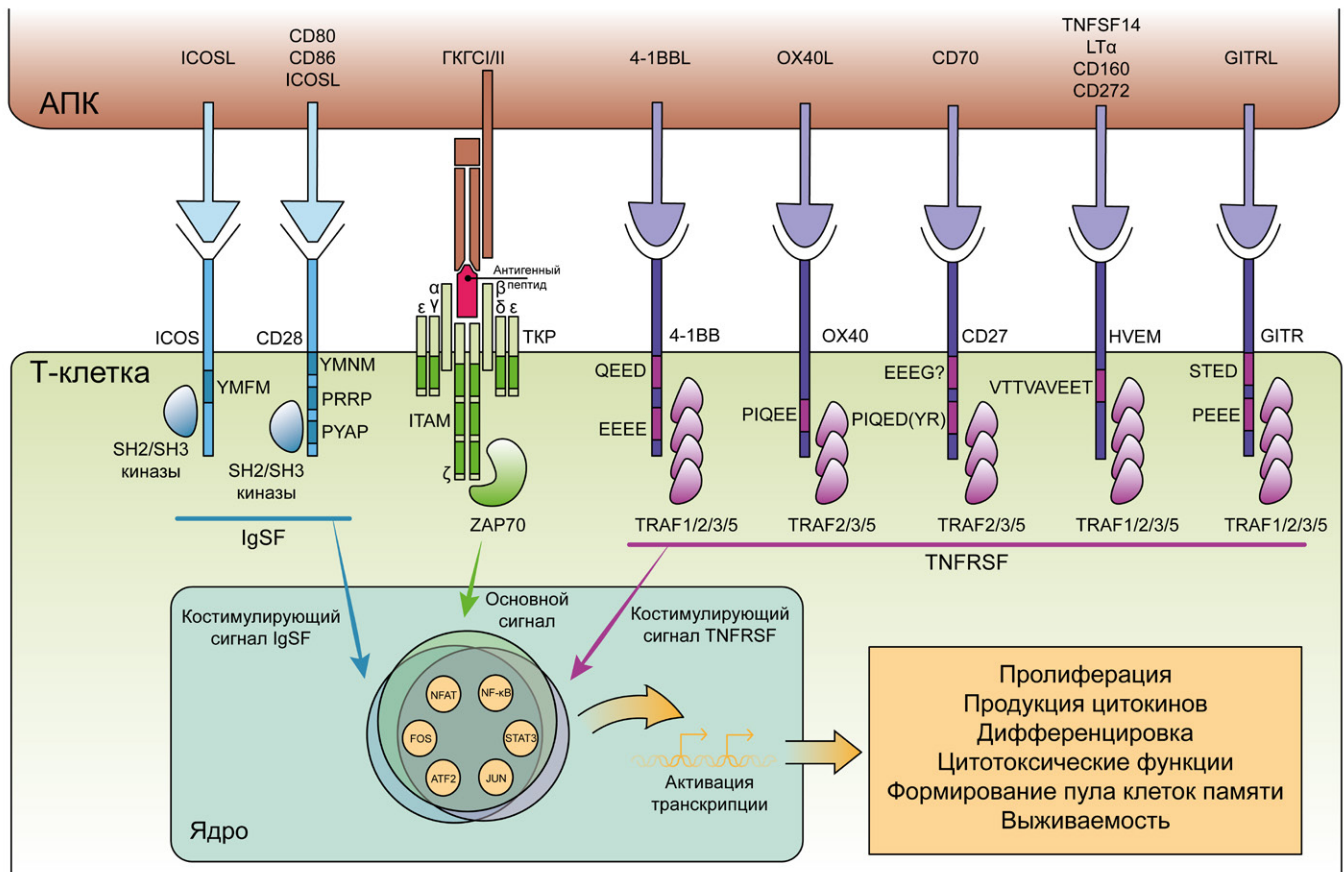


Рис. 3. Основные суперсемейства Т-клеточных костимулирующих рецепторов. Показана общая схема активации Т-клеток, для которой необходим основной сигнал и костимулирующие, обеспечиваемые взаимодействием как ТКР с главным комплексом гистосовместимости, так и активирующих рецепторов — представителей IgSF и TNFRSF — со своими лигандами. У рецепторов обозначены аминокислотные последовательности основных сигнальных мотивов. АПК — антигенпрезентирующая клетка; ГКГCI/II — главный комплекс гистосовместимости I и II типа; IgSF — суперсемейство иммуноглобулинов; TNFRSF — суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли; TNFSF — суперсемейство фактора некроза опухоли; ТКР — Т-клеточный рецептор; α , β — распознающие цепи Т-клеточного рецептора; ζ , γ , δ , ϵ — белки группы CD3 Т-клеточного рецептора; ITAM — иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив

(рис. 3) — связывают киназы с доменами SH2 и/или SH3 (YMNM — SHIP1, SLP76, GRAP, CBL, PI3K, GRB2 и GADS; PRRP — ITK; PYAP — PDK1, PKC θ , GRB2, STS1/2, CIN85, CD2AP, LCK и FLNA). Фиксация киназ на костимуляторе обеспечивает изменение их конформации, активацию и последующие взаимодействия киназ с нижележащими участниками сигнальных каскадов, которые, с одной стороны, приводят к активации транскрипционных факторов NFAT, AP-1 и NF- κ B, ассоциированных с синтезом интерлейкина-2 (ИЛ-2) и стимуляцией Bcl-XL, а с другой, стимулируют метаболизм Т-клеток, усиливая аэробный гликолиз, поступление питательных веществ и анаболические процессы [8–10].

В конструкции CAR используют ICD CD28, который при связывании антигена с химерным рецептором ведет к активации пути PI3K/АКТ, усиливая аэробный гликолиз, который позитивно влияет на эффекторные свойства Т-клеток [11]. В то же время высокий уровень гликолиза провоцирует истощение клеток и снижает их персистенцию [12]. Для преодоления этого пробуют вносить мутации в функциональные мотивы CD28. При этом мутации в каждом мотиве могут модифицировать характеристики полученных CAR-Т-клеток. Так, в модели ксенотрансплантата панкреатической опухоли замена мотива YMNM на YMFM в SS1-CAR-Т-клетках на основе CD28, нацеленных на мезотелин, снижает взаимодействие CD28 с GRB2, что уменьшает пе-

редачу сигналов через VAV1, снижает кальциевый ток и гиперактивацию NFAT, уменьшая истощение и дисфункцию Т-клеток и повышая их персистенцию и противоопухолевую эффективность [12]. CD28 с заменой мотивов PRRP и YNMN на ARRA и YFNM соответственно, усиливает секрецию клетками интерферона-гамма (ИФН- γ) и фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α – tumor necrosis factor alpha), снижает уровень связанного с истощением транскрипционного фактора Nur77 и повышает цитотоксичность CD19-CAR-Т-клеток, что, в результате, обеспечивает устойчивое ингибирование развития опухоли у мышей [13]. Kofler и соавт. показали, что замена в CD28 участка PYAP на AYAAA нарушает взаимодействие мотива PYAP с киназой LCK, что снижает секрецию ИЛ-2 и подавляет зависимую от него сигнализацию, а также ослабляет ИЛ-2-зависимую пролиферацию внутриопухолевых регуляторных Т-клеток (Treg – regulatory T cells), усиливая тем самым противоопухолевую активность таких CAR-Т-клеток в отношении солидных опухолей с высокой инфильтрацией Treg-клетками [14]. Кроме того, эта модификация CD28 усиливает пролиферацию, метаболизм, активацию и цитотоксичность CAR-Т-клеток, нацеленных на белок, активирующий фибробласты (FAP – fibroblast activation protein). Такие клетки эффективно элиминируют опухоли в комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек и длительно персистируют в гуманизированных мышах с ксенотрансплантатом и у пациентов со злокачественной плевральной мезотелиомой, демонстрируя высокий уровень безопасности [15]. Так как ICD CD28 часто включают в состав CAR вместе с трансмембранным доменом, стоит отметить, что за счет этого CAR может образовывать гетеродимеры с эндогенным CD28 [16], что приводит как к тоническому сигналингу, так и к усилению эффекторных функций соответствующих CAR-Т-клеток.

ICOS. Этот рецептор слабо экспрессируется в Т-клетках до активации Т-клеточного рецептора (ТКР), однако после активации экспрессия усиливается в течение нескольких часов [17]. ICOS активирует взаимодействие с лигандом – ICOSL, которое поддерживает жизнедеятельность Т-клеток, стимулируя пролиферацию и дифференцировку по сходным с CD28 механизмам. Эти рецепторы различаются по влиянию на синтез и секрецию цитокинов. Так, CD28 стимулирует продукцию ИЛ-2, а ICOS – ИЛ-10, характерного в большей степени для Treg-клеток [18]. Кроме ИЛ-10, ICOS также стимулирует секрецию ИФН- γ , TNF- α , ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-17, что усиливает эффекторные свойства Т-клеток

и дифференцировку наивных Т-хелперов (Th – T helper cell) в эффекторные клетки подтипов Th1, Th2 и Th17 [18, 19]. Как и CD28, ICOS активирует экспрессию Bcl-XL, что повышает жизнеспособность Т-клеток [20]. Функциональный тирозинсодержащий мотив ICOS YMFM (рис. 3) взаимодействует с регуляторной субъединицей PI3K p50 α , что приводит к более сильной активации PI3K по сравнению с эффектом CD28 [21]. В результате стимуляция ICOS приводит к фосфорилированию киназ AKT, PDK1, ERK1/2, p38 MAPK и активации транскрипционных факторов NFAT и NF- κ B, что отличает ICOS от CD28, который также вовлекает в сигнальный каскад киназу JNK и активирует транскрипционный фактор c-Jun [17].

Функциональную активность CAR-Т-клеток на основе ICOS первыми показали Shen и соавт., которые применили CAR-Т-клетки в лечении глиобластомы в мышинной модели [22]. Предполагается, что именно поляризация CD4+ CAR-Т-клеток в сторону Th1 и Th17 за счет вовлечения PI3K/AKT, p38 MAPK (и других механизмов) усиливает их персистенцию [23], что повышает противоопухолевую активность и CD8+ CAR-Т-клеток [23]. Перед введением животным CD4+ mesoCAR-Т-клеток, нацеленных на мезотелин, Wyatt и соавт. проводили низкоинтенсивную стимуляцию этих клеток с помощью магнитных шариков, покрытых антителами к CD3 и ICOS (соотношение шарики : клетки = 1 : 10), параллельно добиваясь поляризации клеток в Th17 с помощью коктейля цитокинов. Такая обработка обеспечивала (по сравнению со стимуляцией CD3 и CD28) получение менее дифференцированных CD4+ CAR-Т-клеток и сдвиг их метаболизма в сторону окислительного фосфорилирования, что характерно для Т-клеток памяти (Tm – memory T cell). Это подчеркивает преимущество именно ICOS-направленной стимуляции CD4+ mesoCAR-Т-клеток. Такая подготовка приводила к более эффективной элиминации опухоли у мышей с мезотелиомой с помощью комбинации CD4+ Th17 mesoCAR-Т-клеток и CD8+ mesoCAR-Т-клеток [24] по сравнению со стандартно активированными CAR-Т-клетками. Эти данные подчеркивают неодинаковую роль разных костимуляторов в зависимости от типа CAR-Т-клеток – CD4+ или CD8+. Оптимальная костимуляция может быть обеспечена с помощью модификации CD4+ и CD8+ Т-клеток генами CAR с разными костимулирующими доменами, что необходимо учитывать для получения наиболее эффективного CAR-Т-клеточного продукта. Исследование эффекта костимуляции CAR-Т-клеток с помощью ICOS показало, что замена YMFM на FMFM приводит к нарушению ко-

стимуляции CAR-T-клеток через ICOS. Это ведет к низкой секреции указанных ранее цитокинов CAR-T-клетками [25]. Модификации ICD ICOS, повышающие его эффективность, пока не описаны.

Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли

В состав этого обширного суперсемейства входит порядка 30 рецепторов, которые делятся на три группы: рецепторы, связывающие факторы, ассоциированные с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF – TNF receptor-associated factor) (1); рецепторы смерти (2) и молекулы с нефункциональным ICD или без него (3) [26]. В структуре CAR к этому моменту использовали внутриклеточные части только рецепторов группы (1) – это 4-1BB, OX40, CD27, HVEM, TNFRSF18. Консервативные мотивы рецепторов этой группы включают TRAF-связывающие (P/A/S/T)X(E/Q)E и PXQXXD (X – любая АК) [27].

4-1BB. 4-1BB очень часто включают в CAR при создании CAR-T-клеточных препаратов. Четыре из шести одобренных CAR-T-клеточных продуктов содержат в составе CAR именно 4-1BB [2]. Это не случайно, так как 4-1BB – это один из ключевых маркеров активации Т-клеток, который, благодаря взаимодействию с лигандом 4-1BBL и привлечению разных TRAF, инициирует сигнальные пути p38 MAPK, АКТ и ERK. Это приводит к активации транскрипции с NF-κB-зависимых промоторов, что повышает продукцию сурвивина, Bcl-XL, Bcl-1, Bcl-2 и снижает уровень Bim [28, 29]. Кроме того, сигнал от 4-1BB увеличивает количество митохондрий и трансмембранный потенциал, что усиливает аэробные процессы в Т-клетках, повышая их эффекторные функции [30]. TRAF-связывающие мотивы 4-1BB – это QEED и EEEE (рис. 3), с которыми взаимодействуют TRAF1, TRAF2, TRAF3 и TRAF5 [31].

Включение 4-1BB в структуру CAR увеличивает персистенцию CAR-T-клеток, которые фенотипически становятся очень похожими на Т-клетки центральной памяти (T_{cm} – central memory T cell). Они слабо экспонируют на своей поверхности один из наиболее характерных маркеров истощения Т-клеток – PD-1 [32, 33]. Отчасти это объясняет характер метаболизма клеток, который при костимуляции через 4-1BB смещается в сторону усиления митохондриальных процессов и повышенного синтеза митохондрий. Кроме того, в клетках, CAR которых содержат 4-1BB, экспрессия генов антиапоптотических факторов повышена, а проапоптотических снижена. В то же время CAR-T-клетки

слабее активируются при костимуляции 4-1BB, чем CD28 [34]. Это объясняется привлечением тандема фосфатаз THEMIS-SHP1, который формирует комплекс с 4-1BB за счет мотива из 10 АК на С-конце 4-1BB. Образующийся комплекс препятствует фосфорилированию сигнального домена CAR – CD3ζ. Мутации в QEED и EEEE снижают секрецию цитокинов, долю T_{cm}-клеток и противоопухолевую активность CAR-T-клеток [25, 35]. Однако опубликованы данные, согласно которым включение 4-1BB в состав CAR приводит к повышенной агрегации CAR-T-клеток, что снижает их жизнеспособность [36]. Примечательно, что удаление упомянутых 10 АК с С-конца 4-1BB в этом случае препятствует агрегации и восстанавливает функциональность CAR-T-клеток. Кроме того, установлено, что 4-1BB индуцирует тонический сигналинг, который способствует апоптозу CAR-T-клеток [37]. Снижение продукции таких CAR позволяет нормализовать активность CAR-T-клеток.

OX40. OX40 – это костимулирующий рецептор, который появляется на поверхности Т_n-клеток только после их активации. Связывание OX40 со своим лигандом OX40L обеспечивает привлечение TRAF2, 3, 5 через мотив PIQEE (рис. 3) [38, 39]. Адаптеры TRAF2, 3, 5 индуцируют сигнальный путь NF-κB, который способствует синтезу в клетках антиапоптотических факторов Bcl-XL и Bcl-1 [40]. Активируются также киназы PI3K/АКТ, вовлеченные в синтез сурвивина и киназы Аврора В, что ингибирует апоптоз и способствует пролиферации Т-клеток [41, 42].

Костимуляция CAR-T-клеток второго поколения через OX40 способствует более длительной их персистенции по сравнению с клетками, в которых за костимуляцию в CAR отвечают CD28 и 4-1BB. При этом противоопухолевая активность CAR-T-клеток *in vivo* практически не зависит от костимулирующего домена CAR. *In vitro* CAR-T-клетки, в которых за костимуляцию отвечает OX40, лучше убивают таргетные клетки [43]. Транскриптомный анализ таких CAR-T-клеток выявил в них повышенную экспрессию генов, ответственных за репарацию ДНК, окислительное фосфорилирование, ингибирование апоптоза, дифференцировку в клетки памяти и пролиферацию. Данные о так называемой «специализации» OX40 и 4-1BB показывают, что 4-1BB преимущественно стимулирует формирование CD8⁺ Т_m-клеток, а OX40 – CD4⁺ Т_m-клеток [39]. Вместе с информацией о том, что ICOS способствует дифференцировке CD4⁺ Т-клеток в эффекторы типа Th1, Th2 и Th17, это, по-видимому, свидетельствует о том, что наиболее рациональная

комбинация для костимуляции CD4⁺ CAR-T-клеток включает ICOS и OX40. В то же время комбинация CD28 и 4-1BB, возможно, будет более подходящим вариантом для костимуляции CD8⁺ CAR-T-клеток.

CD27. CD27 связывает лиганд CD70 и способствует пролиферации и дифференцировке Т-клеток за счет активации сигнальных путей NF- κ B, PI3K/AKT, SAPK/JNK [44, 45]. Стимуляция через CD27 приводит к уменьшению количества FasL в CD4⁺ Т-клетках и повышению Bcl-XL и Pim-1 в CD8⁺ Т-клетках, что ингибирует апоптоз и способствует гликолизу в CD8⁺ Т-клетках [46–48]. Тем самым CD27 поддерживает пролиферацию и жизнеспособность эффекторных Т-клеток и формирование пула Тm-клеток на стадии первичной активации Тn-клеток, во время клональной экспансии и на эффекторной стадии (например, в опухоли). Для взаимодействия с TRAF2, 3, 5 CD27 использует функциональный мотив PIQED(YR) и, возможно, EEEG (рис. 3) [45, 49]. Уникальное свойство CD27, отличающее его от представителей семейства TNFRSF, – формирование гомодимеров за счет дисульфидных мостиков [49]. Именно в этой форме CD27 присутствует на поверхности покоящихся Т-клеток, в то время как их продолжительная активация повышает долю мономерной формы, что, вероятно, защищает Т-клетки от включения костимуляторов при спонтанной активации.

Изучение костимулирующего потенциала CD27 показало, что CD27 CAR-T-клетки способны более эффективно уничтожать опухоли, подобно тому, как это делают CAR-T-клетки с костимуляторами CD28 или 4-1BB, чем CAR-T-клетки первого поколения. Продолжительность персистенции CAR-T-клеток с костимулятором CD27 сходна с персистенцией CAR-T-клеток с костимулятором 4-1BB [50, 51]. В то же время прямое сравнение способности CAR-T-клеток второго поколения с 4-1BB или CD27 элиминировать солидную опухоль у мышей выявило более высокую противоопухолевую активность именно CAR-T-клеток с CD27 [52]. Наиболее эффективной оказалась комбинация сразу трех костимулирующих доменов – CD28, 4-1BB и CD27 – в составе CAR, что усилило пролиферацию, повысило устойчивость клеток к потере CAR, ослабило истощение CAR-T-клеток по сравнению с костимуляцией одним или двумя доменами [53, 54].

HVEM. Аббревиатура HVEM расшифровывается как Herpes Virus Entry Mediator, или медиатор проникновения вируса герпеса, так как первоначально эта молекула была открыта в качестве рецептора вируса простого герпеса-1 [55]. HVEM – это доволь-

но необычный представитель своего суперсемейства, так как он связывает и молекулы, относящиеся к семейству TNFSF – TNFSF14 и лимфотоксин- α , и иммуноглобулин-подобные молекулы – CD272 и CD160 [56]. При этом HVEM костимулирует Т-клетки при *транс*-взаимодействиях, в то время как *цис*-взаимодействие препятствует костимуляции, формируя изолированный от других взаимодействий комплекс HVEM с CD272 или CD160 [57]. При активации HVEM связывает TRAF1, 2, 3, 5, что активирует передачу сигнала по путям NF- κ B, JNK/AP-1 и PI3K/AKT и приводит к повышению синтеза как различных цитокинов, так и Bcl-2 [58, 59]. Это усиливает эффекторные свойства, пролиферацию и жизнеспособность Т-клеток. Молекулы TRAF, как предполагают, взаимодействуют с HVEM за счет мотива VTTVAVEET (рис. 3), который частично соответствует консервативному мотиву (P/A/S/T)X(E/Q)E [58].

Потенциал HVEM-зависимой костимуляции CAR-T-клеток оценили сравнительно недавно [60, 61]. Показано, что HVEM сочетает свойства рецепторов суперсемейств IgSF и TNFRSF. Так, если CD28 обеспечивает преимущественную дифференцировку модифицированных клеток в Т-клетки эффекторной памяти (Tem – effector memory T cell), а 4-1BB – в Тcm-клетки, то HVEM приводит к формированию сбалансированной популяции с практически одинаковыми долями как Тcm-, так и Tem-клеток. Кроме того, если костимуляция через CD28 активирует в основном гликолитический метаболизм, а через 4-1BB – окислительное фосфорилирование, то HVEM усиливает оба метаболических пути, формируя наиболее эффективное функциональное состояние CAR-T-клеток. Вовлечение в костимуляцию HVEM также способствует наименьшему истощению CAR-T-клеток по сравнению с CD28 и 4-1BB. CAR-T-клетки с HVEM показали наибольшую эффективность в случае солидных опухолей у мышей [61]. Кроме того, одновременная продукция CAR и лиганда HVEM TNFSF14 способствует проникновению CAR-T-клеток в опухоль за счет интенсивной секреции хемокинов [62].

TNFRSF18. TNFRSF18, больше известный как GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein), конститутивно присутствует на низком уровне на мембране покоящихся Т-клеток. При активации уровень GITR на поверхности Т-клеток существенно возрастает. Уровень GITR в Treg-клетках выше, чем в обычных Т-клетках, даже без стимуляции [63]. Взаимодействие GITR с лигандом GITRL ослабляет иммуносупрессивную активность Treg-клеток, а в эффекторных Т-клетках стимулирует пролифе-

рацию и секрецию цитокинов, оказывает антиапоптотический эффект [64, 65]. Внутриклеточный сигналинг от GITR включает взаимодействие с TRAF1, 2, 3, 5 за счет мотивов STED и PEEE (рис. 3) [66]. Показано, что стимуляция Т-клеток антителами к CD3, CD28 и GITR вызывает как сходные реакции, которые приводят к сигнальному синергизму в случае костимуляции, так и индивидуальные эффекты (например, стимуляция GITR вызывает усиленную продукцию ИЛ-27) [67]. Основные сигнальные пути, задействованные в костимуляции через GITR, – это NF- κ B и MAPK [63].

Показано, что CAR-T-клетки, костимулированные через GITR, по эффективности уничтожения опухолей сравнимы с CAR-T-клетками на основе CD28 и 4-1BB [68, 69]. Кроме того, дополнительная продукция GITRL на CAR-T-клетках усиливает секрецию цитокинов, инфильтрацию опухолей и противоопухолевую активность [70].

Что касается других представителей TNFRSF, то появились работы по включению в состав CAR новых костимулирующих доменов рецепторов этого суперсемейства, например BAFF-R, CD30 и CD40 [35, 71, 72]. Костимуляция через CD40, как показано, ведет к более сильной активации пути NF- κ B, чем костимуляция через 4-1BB, что может способствовать лучшей персистенции CD40 CAR-T-клеток *in vivo*.

Остальные костимулирующие домены

Костимулирующие молекулы, не входящие в суперсемейства иммуноглобулинов и рецепторов TNF, привлекают все большее внимание, так как интерес постепенно переключается на сигнальные процессы, происходящие в других иммунных клетках, таких как естественные киллеры, макрофаги и другие. Среди перспективных сигнальных молекул можно выделить Dap10 [73] и дектин-1 [74]. Современные технологии геной и клеточной инженерии позволяют достаточно легко создать библиотеки CAR с различными сочетаниями костимулирующих рецепторов или их частей [71, 75]. В сочетании с высокопроизводительным секвенированием это позволяет глубже оценить эффекты различных костимуляторов, не ограничиваясь наиболее изученными представителями семейств IgSF и TNFRSF, а также подобрать конкретные сочетания костимуляторов, ориентируясь на тип Т-клеток – CD4+ или CD8+.

СИГНАЛЬНЫЙ ДОМЕН CD3 ζ И ЕГО АНАЛОГИ

На заре разработки в качестве сигнального домена в структуре CAR использовали только внутриклеточную часть CD3 ζ [76, 77]. Это связано

с концепцией самого рецептора, которая основывалась на комбинации В- и Т-клеточных рецепторов для таргетного распознавания антигенов и последующей активации Т-клетки. Так, ранние исследования показали, что ICD CD3 ζ подходит для активации Т-клеток, что заложило основу для конструирования CAR [78]. CD3 ζ прочно «укоренился» в структуре рецептора и «кочевал» из поколения в поколение, обеспечивая основной сигнал активации для CAR-T-клеток [79]. Все одобренные к клиническому применению CAR-T-клеточные препараты несут в составе CAR именно CD3 ζ (рис. 2), что подчеркивает важность этого домена для разработчиков и, как казалось до недавнего времени, отсутствие альтернатив [5].

Остальные белки группы CD3

Однако интерес к этой части CAR значительно повысился со временем. Так, в 2018 году Sadelain и соавт. показали, что для полноценного функционирования CAR в CD3 ζ достаточно оставить один активный иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activation motif) из трех [80]. Важную роль при этом играет как его расположение, так и аминокислотный состав. Наиболее функциональным вариантом для элиминирования опухолей оказался 1XX (1 – позиция активного ITAM относительно мембраны клетки, X – неактивный ITAM), в то время как XX3 умеренно поддерживал персистенцию CAR-T-клеток. Эти данные подчеркнули, что необходимо пересмотреть отношение к казалось бы незаменимому CD3 ζ .

В результате были проведены исследования возможных аналогов CD3 ζ , а именно, других представителей группы CD3 – ϵ , δ , γ [81, 82]. В отличие от CD3 ζ , эти молекулы в ICD содержат только один ITAM [83]. Хотя все ITAM содержат консервативную последовательность YXXL/I-X6-8-YXXL/I (X – любая АК), состав АК каждого ITAM уникален, что определяет различия в аффинности связывания сигнальных молекул (рис. 4) [84].

Всего мультисубъединичный комплекс ТКР–CD3 содержит 10 ITAM. Высокая концентрация тирозиновых мотивов, вероятно, способствует усилению сигнала, поскольку уменьшение их числа приводит к нарушению функции комплекса ТКР–CD3 у мышей [85]. Кроме того, различия между CD3 и ITAM, содержащихся в них, также важно для передачи сигнала и развития зрелых Т-клеток [86].

Помимо уникальных аминокислотных последовательностей в ITAM, внутриклеточные части каждой субъединицы CD3 имеют свои особенности (рис. 4). CD3 ζ и CD3 ϵ содержат участки, обогащен-

Внутриклеточные части белков CD3:

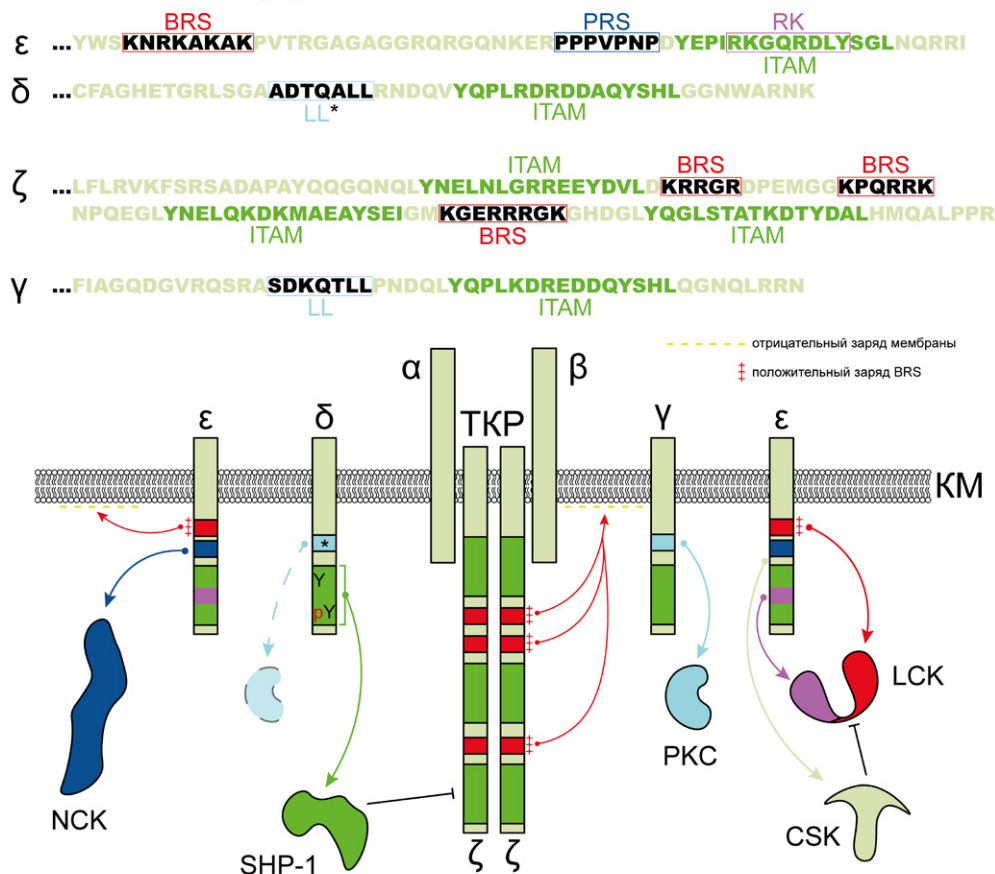


Рис. 4. Структура и функциональные особенности белков группы CD3. Показана организация внутриклеточных доменов CD3ε, δ, ζ, γ, которые содержат уникальные мотивы для взаимодействия с внутриклеточными сигнальными партнерами. ζ, γ, δ, ε – представители группы CD3 Т-клеточного рецептора; ITAM – иммунорецепторный тирозин-активирующий мотив; BRS – участок, богатый основными аминокислотами; PRS – участок, богатый пролином; RK – мотив рецепторной киназы; LL – серинзависимый дилейциновый мотив (* указывает на отсутствие серина перед LL, что снижает вовлечение LL в регуляцию Т-клеточного рецептора); TKP – Т-клеточный рецептор; α, β – распознающие цепи Т-клеточного рецептора; KM – клеточная мембрана; Y – тирозин; pY – фосфорилированный тирозин

ные положительно заряженными АК (BRS – basic-rich stretch), с помощью которых взаимодействуют с внутренней стороной клеточной мембраны [87, 88]. CD3ε взаимодействует с киназой LCK либо через ионные связи между BRS и кислыми остатками в уникальном домене LCK, либо с помощью мотива рецепторной киназы (RK – receptor kinase) и SH3-домена LCK [89, 90]. CD3ε также содержит богатую пролином последовательность (PRS – proline-rich sequence), которая взаимодействует с адаптерным белком NCK, что необходимо для созревания ИС и активации Т-клеток [91]. В CD3γ присутствует проксимальный серинзависимый дилейциновый (SDKQTLL) мотив, который участвует в уменьшении количества ТКР на мембране клетки посредством механизма, зависящего от протеинкиназы С (PKC – protein kinase C) [92]. В CD3δ, кроме ITAM, также есть похожий мотив (ADTQALL), в котором, однако, отсутствует серин, требующийся для взаимодействия с PKC, поэтому CD3δ считается менее значимым для регуляции количества ТКР на мембране в отличие от CD3γ [93].

Уникальные мотивы в структуре каждого представителя белков CD3 играют важную роль в контексте CAR, хотя каждый вариант CD3 по отдельности может быть достаточным для создания функциональной структуры CAR. Это показано путем включения CD3ε, δ или γ в структуру CAR в качестве сигнального домена вместо CD3ζ [81, 82]. Обнаружено, что CD3δ, CD3ε или CD3γ CAR-Т-клетки более эффективно элиминируют опухоли *in vivo* по сравнению с CD3ζ. Это связано с уникальными особенностями конкретных представителей группы CD3. Так, ICD CD3ε связывает киназу CSK, которая ингибирует активацию киназы LCK, что снижает истощение CAR-Т-клеток и способствует их персистенции; монофосфорилированный по второму тирозину ICD CD3δ связывает фосфатазу SHP-1, что также снижает интенсивность сигналинга и секрецию цитокинов, вероятно, за счет ослабления активации пути NF-κB. Результаты транскриптомного анализа свидетельствуют о снижении экспрессии генов, продукты которых участвуют в гликолизе, повышении экспрессии генов,

продукты которых вовлечены в митохондриальный метаболизм, что характеризует фенотип Тm-клеток. Кроме того, в случае CD3δ интенсивно экспрессируется TCF-1, ассоциированный со стволовыми Т-клетками памяти [94]. Клетки этого типа, наряду с Тn-клетками, обладают наибольшим потенциалом к самообновлению и способны дифференцироваться в любой тип клеток памяти [95]. Также, вероятно, CD3ε, который обладает большим соотношением положительно заряженных и кислых АК, связывается с мембранными фосфолипидами с более высокой интенсивностью, чем CD3ζ, снижая доступность CAR для внутриклеточных сигнальных партнеров, что наблюдается в случае ТКР и других белков [88, 96]. Это, в свою очередь, снижает вероятность возникновения неспецифического и тонического сигналинга. За счет использования в структуре CAR шарнирного домена из CD8α, способного к димеризации, удалось также показать, что димерные формы CD3δ и CD3γ усиливают секрецию цитокинов CAR-Т-клетками, а также количество поверхностных CD69 и 4-1BB, особенно в случае мутации дилейциновых мотивов (SDKQTAL и ADTQAAL) [81].

Сигнальные партнеры ТКР

Новый формат CAR, названных bypassCAR (bCAR), появился благодаря изучению отдельных элементов сигнальных каскадов при активации ТКР. В структуру bCAR были интегрированы части внутриклеточных сигнальных партнеров ТКР вместо доменов, содержащих ITAM. Первые bCAR-подобные химерные молекулы были созданы в конце прошлого века для определения ключевых киназ, необходимых для активации Т-клеток [97]. В структуре таких рецепторов CD16 использовали в сочетании с LCK, FYN, SYK или ZAP70. При этом только в случае домена SYK модифицированные клетки могли лизировать клетки-мишени в ответ на стимуляцию. При замене CD16 на scFv к соответствующему антигену сохранялась уникальная способность SYK активировать bCAR-Т-клетку, минуя ТКР [98].

Позднее была сконструирована панель противоопухолевых bCAR с CSK, FYN, киназным доменом ZAP70 (ZAP70KD – ZAP70 kinase domain), LAT, SLP76 или PLCγ1 без костимулирующих доменов [99]. bCAR на основе ZAP70KD и PLCγ1 активировали модифицированные Т-клетки, хотя PLCγ1 bCAR экспрессировался значительно слабее. В *in vivo* экспериментах ZAP70KD bCAR-Т-клетки эффективнее элиминировали солидную опухоль, чем CD3ζ CAR-Т-клетки с костимулирующим доменом 4-1BB. bCAR на основе ZAP70KD активировал Т-клетки с нокаутом ТКР и LCK, но не в отсут-

ствии SLP76 или LAT, что подтверждает сохранение структуры сигнальных путей после ТКР.

Недавно были разработаны bCAR второго поколения, где дополнительно встроили адаптерный домен из LAT или SLP76 по аналогии с костимулирующими доменами традиционных CAR. Однако Т-клетки, модифицированные такими конструкциями, обладали чрезмерно высоким уровнем тонического сигналинга [100]. При этом добавление сигнального домена CD28 перед киназным доменом ZAP70 привело к более длительной ремиссии В-клеточной опухоли у мышей под действием bCAR-Т-клеток по сравнению с традиционными CAR-Т-клетками второго поколения с CD3ζ и костимулирующим доменом CD28.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование комбинаций костимулирующих и сигнальных доменов CAR – это динамично развивающееся направление изучения механизмов функционирования CAR-Т-клеток и расширения возможностей применения этих клеток. Разнообразие этих доменов открывает широкие возможности для конструирования CAR-Т-клеток нового поколения с улучшенными функциональными характеристиками.

Анализ накопленных данных демонстрирует, что выбор того или иного костимулирующего домена оказывает значительное влияние не только на активацию и цитотоксическую активность CAR-Т-клеток, но и определяет тип их метаболической активности, способность к долговременной персистенции *in vivo* и устойчивость к функциональному истощению. При этом комбинация различных доменов или создание модульных конструкций может позволить преодолеть ключевые ограничения текущих подходов к созданию терапевтических CAR-Т-продуктов и их применения, таких как гетерогенность опухолевых антигенов, иммуносупрессивное микроокружение и ассоциированную с адоптивным переносом токсичность.

Кроме того, существует потребность в уменьшении размера CAR с сохранением функциональности и поиске минимально активной структуры рецептора, что должно благоприятствовать успеху модификации и способствовать повышенной и стабильной продукции рецептора CAR-Т-клетками. Такие исследования тоже ведутся [101].

Дальнейшая оптимизация сигнальных доменов CAR-Т-клеток требует не только углубленного понимания молекулярных механизмов активации Т-лимфоцитов, но и применения передовых технологий, включая CRISPR-скрининг, транскриптомику, протеомику и компьютерное моделирование [75, 102–105]. Это позволит создавать персонализи-

рованные клеточные продукты, максимально адаптированные к биологии конкретного типа опухоли. Наряду с совершенствованием поколений рецептора и созданием модульных систем [106–108], исследования в этой области могут привести к прорывным терапевтическим решениям, расширяющим спектр применения технологии CAR-T и повышающим ее

эффективность при лечении как онкологических, так и, возможно, аутоиммунных и инфекционных заболеваний. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2024-536).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yazbeck V, Alesi E, Myers J, et al. An overview of chemotoxicity and radiation toxicity in cancer therapy. *Adv. Cancer Res.* 2022;1–27.
2. Cappell KM, Kochenderfer JN. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far. *Nat Rev Clin Oncol.* 2023;20(6):359–371. doi: 10.1038/s41571-023-00754-1
3. Li Q, Lei X, Zhu J, et al. Radiotherapy/chemotherapy-immunotherapy for cancer management: From mechanisms to clinical implications. *Oxid Med Cell Longev.* 2023;2023:7530794. doi: 10.1155/2023/7530794
4. McLellan AD, Ali Hosseini Rad SM. Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation. *Immunol Cell Biol.* 2019;97(7):664–674. doi: 10.1111/imcb.12254
5. Mitra A, Barua A, Huang L, et al. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Front Immunol.* 2023;14:1188049. doi: 10.3389/fimmu.2023.1188049
6. Finney HM, Lawson ADG, Bebbington CR, Weir ANC. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol.* 1998;161(6):2791–2797. doi: 10.4049/jimmunol.161.6.2791
7. Krause A, Guo HF, Latouche JB, et al. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *J Exp Med.* 1998;188(4):619–626. doi: 10.1084/jem.188.4.619
8. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, et al. CD28 costimulation: From mechanism to therapy. *Immunity.* 2016;44(5):973–988. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.020
9. Honikel MM, Olejniczak SH. Co-stimulatory receptor signaling in CAR-T cells. *Biomolecules.* 2022;12(9):1303. doi: 10.3390/biom12091303
10. Kunkl M, Sambucci M, Ruggieri S, et al. CD28 autonomous signaling up-regulates C-myc expression and promotes glycolysis enabling inflammatory T cell responses in multiple sclerosis. *Cells.* 2019;8(6):575. doi: 10.3390/cells8060575
11. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells. *Immunity.* 2016;44(2):380–390. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.021
12. Guedan S, Madar A, Casado-Medrano V, et al. Single residue in CD28-costimulated CAR-T cells limits long-term persistence and antitumor durability. *J Clin Invest.* 2020;130(6):3087–3097. doi: 10.1172/JCI133215
13. Boucher JC, Li G, Kotani H, et al. CD28 costimulatory domain-targeted mutations enhance chimeric antigen receptor T-cell function. *Cancer Immunol Res.* 2021;9(1):62–74. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0253
14. Kofler DM, Chmielewski M, Rappl G, et al. CD28 costimulation impairs the efficacy of a redirected t-cell antitumor attack in the presence of regulatory t cells which can be overcome by preventing Lck activation. *Mol Ther.* 2011;19(4):760–767. doi: 10.1038/mt.2011.9
15. Gulati P, Rühl J, Kannan A, et al. Aberrant lck signal via CD28 costimulation augments antigen-specific functionality and tumor control by redirected T cells with PD-1 blockade in humanized mice. *Clin Cancer Res.* 2018;24(16):3981–3993. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-17-1788
16. Ferreira LMR, Muller YD. CAR T-cell therapy: Is CD28-CAR heterodimerization its Achilles' heel? *Front Immunol.* 2021;12:766220. doi: 10.3389/fimmu.2021.766220
17. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature.* 1999;402(6763):827–832. doi: 10.1038/45582
18. van Berkel MEAT, Oosterwegel MA. CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunol Lett.* 2006;105(2):115–122. doi: 10.1016/j.imlet.2006.02.007
19. Paulos CM, Carpenito C, Plesa G, et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human TH17 cells. *Sci Transl Med.* 2010;2(55):55ra78–55ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.3000448
20. Parry RV, Rumbley CA, Vandenberghe LH, et al. CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol.* 2003;171(1):166–174. doi: 10.4049/jimmunol.171.1.166
21. Fos C, Salles A, Lang V, et al. ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol.* 2008;181(3):1969–1977. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.1969
22. Shen C-J, Yang Y-X, Han EQ, et al. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma. *J Hematol Oncol.* 2013;6(1):33. doi: 10.1186/1756-8722-6-33
23. Guedan S, Chen X, Madar A, et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood.* 2014;124(7):1070–1080. doi: 10.1182/blood-2013-10-535245
24. Wyatt MM, Huff LW, Nelson MH, et al. Augmenting TCR signal strength and ICOS costimulation results in metabolically fit and therapeutically potent human CAR Th17 cells. *Mol Ther.* 2023;31(7):2120–2131. doi: 10.1016/j.yymthe.2023.04.010
25. Fujiwara K, Kitauro M, Tsunei A, et al. Structure of the signal transduction domain in second-generation CAR regulates the input efficiency of CAR signals. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2476. doi: 10.3390/ijms22052476
26. Vanamee ES, Faustman DL. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Sci Signal.* 2018;11(511):eaao4910. doi: 10.1126/scisignal.aao4910
27. Ye H, Park YC, Kreishman M, et al. The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell.* 1999;4(3):321–330. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80334-2
28. Ward-Kavanagh LK, Lin WW, Šedý JR, Ware CF. The TNF receptor superfamily in co-stimulating and co-inhibitory responses. *Immunity.* 2016;44(5):1005–1019. doi:

- 10.1016/j.immuni.2016.04.019
29. Craxton A, Draves KE, Gruppi A, Clark EA. BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J Exp Med.* 2005;202(10):1363–1374. doi: 10.1084/jem.20051283
 30. Teixeira A, Labiano S, Garasa S, et al. Mitochondrial morphological and functional reprogramming following CD137 (4-1BB) costimulation. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(7):798–811. doi: 10.1158/2326-6066.cir-17-0767
 31. Glez-Vaz J, Azpilikueta A, Ochoa MC, et al. CD137 (4-1BB) requires physically associated cIAPs for signal transduction and antitumor effects. *Sci Adv.* 2023;9(33):eadf6692. doi: 10.1126/sciadv.adf6692
 32. Cappell KM, Kochenderfer JN. A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(11):715–727. doi: 10.1038/s41571-021-00530-z
 33. Boroughs AC, Larson RC, Marjanovic ND, et al. A distinct transcriptional program in human CAR T cells bearing the 4-1BB signaling domain revealed by scRNA-seq. *Mol Ther.* 2020;28(12):2577–2592. doi: 10.1016/j.jymthe.2020.07.023
 34. Sun C, Shou P, Du H, et al. THEMIS-SHP1 recruitment by 4-1BB tunes LCK-mediated priming of chimeric antigen receptor-redirected T cells. *Cancer Cell.* 2020;37(2):216–225. e6. doi: 10.1016/j.ccell.2019.12.014
 35. Mamonkin M, Mukherjee M, Srinivasan M, et al. Reversible transgene expression reduces fratricide and permits 4-1BB costimulation of CAR T cells directed to T-cell malignancies. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(1):47–58. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0126
 36. Dou Z, Bonacci TR, Shou P, et al. 4-1BB-encoding CAR causes cell death via sequestration of the ubiquitin-modifying enzyme A20. *Cell Mol Immunol.* 2024;21(8):905–917. doi: 10.1038/s41423-024-01198-y
 37. Gomes-Silva D, Mukherjee M, Srinivasan M, et al. Tonic 4-1BB costimulation in chimeric antigen receptors impedes T cell survival and is vector-dependent. *Cell Rep.* 2017;21(1):17–26. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.015
 38. Willoughby J, Griffiths J, Tews I, Cragg MS. OX40: Structure and function - What questions remain? *Mol Immunol.* 2017;83:13–22. doi: 10.1016/j.molimm.2017.01.006
 39. Croft M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):265–273. doi: 10.1016/s1359-6101(03)00025-x
 40. Kawamata S, Hori T, Imura A, et al. Activation of OX40 signal transduction pathways leads to tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2- and TRAF5-mediated NF- κ B activation. *J Biol Chem.* 1998;273(10):5808–5814. doi: 10.1074/jbc.273.10.5808
 41. Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol.* 2010;28(1):57–78. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101243
 42. Song J, So T, Croft M. Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *J Immunol.* 2008;180(11):7240–7248. doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7240
 43. Tan J, Jia Y, Zhou M, et al. Chimeric antigen receptors containing the OX40 signalling domain enhance the persistence of T cells even under repeated stimulation with multiple myeloma target cells. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):39. doi: 10.1186/s13045-022-01244-0
 44. Starzer AM, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7). *ESMO Open.* 2020;4(Suppl 3):e000629. doi: 10.1136/esmoopen-2019-000629
 45. Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, et al. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem.* 1998;273(21):13353–13358. doi: 10.1074/jbc.273.21.13353
 46. Dolfi DV, Boesteanu AC, Petrovas C, et al. Late signals from CD27 prevent Fas-dependent apoptosis of primary CD8+ T cells. *J Immunol.* 2008;180(5):2912–2921. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.2912
 47. van de Ven K, Borst J. Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential. *Immunotherapy.* 2015;7(6):655–667. doi: 10.2217/imt.15.32
 48. Peperzak V, Veraar EAM, Keller AM, et al. The Pim kinase pathway contributes to survival signaling in primed CD8+ T cells upon CD27 costimulation. *J Immunol.* 2010;185(11):6670–6678. doi: 10.4049/jimmunol.1000159
 49. Yamamoto H, Kishimoto T, Minamoto S. NF- κ B activation in CD27 signaling: Involvement of TNF receptor-associated factors in its signaling and identification of functional region of CD27. *J Immunol.* 1998;161(9):4753–4759. doi: 10.4049/jimmunol.161.9.4753
 50. Song D-G, Ye Q, Poussin M, et al. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo*. *Blood.* 2012;119(3):696–706. doi: 10.1182/blood-2011-03-344275
 51. Song D-G, Powell DJ. Pro-survival signaling via CD27 costimulation drives effective CAR T-cell therapy. *Oncoimmunology.* 2012;1(4):547–549. doi: 10.4161/onci.19458
 52. Han Y, Xie W, Song D-G, Powell DJ, Jr. Control of triple-negative breast cancer using ex vivo self-enriched, costimulated NKG2D CAR T cells. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):92. doi: 10.1186/s13045-018-0635-z
 53. Zhang C, Jia J, Heng G, et al. CD27 agonism coordinates with CD28 and 4-1BB signal to augment the efficacy of CAR-T cells in colorectal tumor. *Med Oncol.* 2023;40(4):123. doi: 10.1007/s12032-023-01959-1
 54. Supimon K, Sangsuwannukul T, Sujitjoo J, et al. Anti-mucin 1 chimeric antigen receptor T cells for adoptive T cell therapy of cholangiocarcinoma. *Sci Rep.* 2021;11(1):6276. doi: 10.1038/s41598-021-85747-9
 55. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell.* 1996;87(3):427–436. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81363-x
 56. Šedý JR, Ramezani-Rad P. HVEM network signaling in cancer. *Advances in Cancer Research.* 2019;142:145–186. doi:10.1016/bs.acr.2019.01.004
 57. Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev.* 2011;244(1):169–187. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x
 58. Hsu H, Solovyyev I, Colombero A, et al. ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J Biol Chem.* 1997;272(21):13471–13474. doi: 10.1074/jbc.272.21.13471
 59. Soroosh P, Doherty TA, So T, et al. Herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) regulates the persistence of T helper memory cell populations. *J Exp Med.* 2011;208(4):797–809. doi: 10.1084/jem.20101562
 60. Nunoya J-I, Masuda M, Ye C, Su L. Chimeric antigen receptor T cell bearing herpes virus entry mediator co-stimulatory signal domain exhibits high functional potency. *Mol Ther Oncolytics.* 2019;14:27–37. doi: 10.1016/j.omto.2019.03.002

61. Sun S, Huang C, Lu M, et al. Herpes virus entry mediator costimulation signaling enhances CAR T-cell efficacy against solid tumors through metabolic reprogramming. *Cancer Immunol Res.* 2023;11(4):515–529. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-22-0531
62. Zhang N, Liu X, Qin J, et al. LIGHT/TNFSF14 promotes CAR-T cell trafficking and cytotoxicity through reversing immunosuppressive tumor microenvironment. *Mol Ther.* 2023;31(9):2575–2590. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.06.015
63. Azuma M. Co-signal molecules in T-cell activation: Historical Overview and Perspective. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1189:3–23. doi: 10.1007/978-981-32-9717-3_1
64. Tian J, Zhang B, Rui K, Wang S. The role of GITR/GITRL interaction in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2020;11:588682. doi: 10.3389/fimmu.2020.588682
65. Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, et al. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol.* 2004;34(3):613–622. doi: 10.1002/eji.200324804
66. So T, Nagashima H, Ishii N. TNF receptor-associated factor (TRAF) signaling network in CD4(+) T-lymphocytes. *Tohoku J Exp Med.* 2015;236(2):139–154. doi: 10.1620/tjem.236.139
67. Kanamaru F, Youngnak P, Hashiguchi M, et al. Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells. *J Immunol.* 2004;172(12):7306–7314. doi: 10.4049/jimmunol.172.12.7306
68. Xi B, Berahovich R, Zhou H, et al. A real-time potency assay for chimeric antigen receptor T cells targeting solid and hematological cancer cells. *J Vis Exp.* 2019;153. doi: 10.3791/59033
69. Golubovskaya VM. GITR domain inside CAR co-stimulates activity of CAR-T cells against cancer. *Front Biosci.* 2018;23(12):2245–2254. doi: 10.2741/4703
70. Wang Y, Wang L, Seo N, et al. CAR-modified Vγ9Vδ2 T cells propagated using a novel bisphosphonate prodrug for allogeneic adoptive immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2023;24(13):10873. doi: 10.3390/ijms241310873
71. Goodman DB, Azimi CS, Kearns K, et al. Pooled screening of CAR T cells identifies diverse immune signaling domains for next-generation immunotherapies. *Sci Transl Med.* 2022;14(670):eabm1463. doi: 10.1126/scitranslmed.abm1463
72. Levin-Piaeda O, Levin N, Pozner S, et al. The intracellular domain of CD40 is a potent costimulatory element in chimeric antigen receptors. *J Immunother.* 2021;44(6):209–213. doi: 10.1097/CJI.0000000000000373
73. Li S, Zhao R, Zheng D, et al. DAP10 integration in CAR-T cells enhances the killing of heterogeneous tumors by harnessing endogenous NKG2D. *Mol Ther Oncolytics.* 2022;26:15–26. doi: 10.1016/j.omto.2022.06.003
74. Liang X, Huang Y, Li D, et al. Distinct functions of CAR-T cells possessing a dectin-1 intracellular signaling domain. *Gene Ther.* 2023;5 2023;30(5):411–420. doi: 10.1038/s41434-021-00257-7
75. Daniels KG, Wang S, Simic MS, et al. Decoding CAR T cell phenotype using combinatorial signaling motif libraries and machine learning. *Science.* 2022;378(6625):1194–1200. doi: 10.1126/science.abq0225
76. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(24):10024–10028. doi: 10.1073/pnas.86.24.10024
77. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;149(3):960–968. doi: 10.1016/0006-291x(87)90502-x
78. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(2):720–724. doi: 10.1073/pnas.90.2.720
79. Zheng Z, Li S, Liu M, et al. Fine-tuning through generations: Advances in structure and production of CAR-T therapy. *Cancers (Basel).* 2023;15(13):3476. doi: 10.3390/cancers15133476
80. Feucht J, Sun J, Eyquem J, et al. Calibrated CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):1412–1412. doi: 10.1182/blood-2018-99-117698
81. Velasco Cárdenas RMH, Brandl SM, Meléndez AV, et al. Harnessing CD3 diversity to optimize CAR T cells. *Nat Immunol.* 2023;24(12):2135–2149. doi: 10.1038/s41590-023-01658-z
82. Wang P, Wang Y, Zhao X, et al. Chimeric antigen receptor with novel intracellular modules improves antitumor performance of T cells. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10(1):20. doi: 10.1038/s41392-024-02096-5
83. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature.* 1989;338(6214):383–384. doi: 10.1038/338383b0
84. Love PE, Hayes SM. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(6):a002485. doi: 10.1101/cshperspect.a002485
85. Holst J, Wang H, Eder KD, et al. Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat Immunol.* 2008;9(6):658–666. doi: 10.1038/ni.1611
86. Bettini ML, Chou P-C, Guy CS, et al. Cutting edge: CD3 ITAM diversity is required for optimal TCR signaling and thymocyte development. *J Immunol.* 2017;199(5):1555–1560. doi: 10.4049/jimmunol.1700069
87. Aivazian D, Stern LJ. Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition. *Nat Struct Biol.* 2000;7(11):1023–1026. doi: 10.1038/80930
88. Xu C, Gagnon E, Call ME, et al. Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3ε cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell.* 2008;135(4):702–713. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.044
89. Li L, Guo X, Shi X, et al. Ionic CD3–Lck interaction regulates the initiation of T-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(29):E5891–E5899. doi: 10.1073/pnas.1701990114
90. Hartl FA, Beck-Garcia E, Woessner NM, et al. Noncanonical binding of Lck to CD3ε promotes TCR signaling and CAR function. *Nat Immunol.* 2020;21(8):902–913. doi: 10.1038/s41590-020-0732-3
91. Gil D, Schamel WWA, Montoya Ma, et al. Recruitment of nck by CD3ε reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell.* 2002;109(7):901–912. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00799-7
92. Dietrich J, Hou X, Wegener AM, Geisler C. CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J.* 1994;13(9):2156–2166. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06492.x
93. Wegener A-MK, Hou X, Dietrich J, Geisler C. Distinct domains of the CD3-γ chain are involved in surface expression and function of the T cell antigen receptor. *J Biol Chem.* 1995;270(9):4675–4680. doi: 10.1074/jbc.270.9.4675

94. Escobar G, Mangani D, Anderson AC. T cell factor 1: A master regulator of the T cell response in disease. *Sci Immunol.* 2020;5(53):eabb9726. doi: 10.1126/sciimmunol.abb9726
95. Gattinoni L, Speiser DE, Lichterfeld M, Bonini C. T memory stem cells in health and disease. *Nat Med.* 2017;23(1):18–27. doi: 10.1038/nm.4241
96. Yeung T, Gilbert GE, Shi J, et al. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science.* 2008;319(5860):210–213. doi: 10.1126/science.1152066
97. Kolanus W, Romeo C, Seed B. T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell.* 1993;74(1):171–183. doi: 10.1016/0092-8674(93)90304-9
98. Fitzer-Attas CJ, Schindler DG, Waks T, Eshhar Z. Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation. *J Immunol.* 1998;160(1):145–154. doi: 10.4049/jimmunol.160.1.145
99. Tousley AM, Rotiroti MC, Labanieh L, et al. Co-opting signalling molecules enables logic-gated control of CAR T cells. *Nature.* 2023;615(7952):507–516. doi: 10.1038/s41586-023-05778-2
100. Balagopalan L, Moreno T, Qin H, et al. Generation of antitumor chimeric antigen receptors incorporating T cell signaling motifs. *Sci Signal.* 2024;17(846):eadp8569. doi: 10.1126/scisignal.adp8569
101. Si W, Fan Y-Y, Qiu S-Z, et al. Design of diversified chimeric antigen receptors through rational module recombination. *iScience.* 2023;26(4):106529. doi: 10.1016/j.isci.2023.106529
102. Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, et al. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal.* 2018;11(544):eaat6753. doi: 10.1126/scisignal.aat6753
103. Ramello MC, Benzaïd I, Kuenzi BM, et al. An immunoproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome. *Sci Signal.* 2019;12(568):eaap9777. doi: 10.1126/scisignal.aap9777
104. Qiu S, Chen J, Wu T, et al. CAR-Toner: an AI-driven approach for CAR tonic signaling prediction and optimization. *Cell Res.* 2024;34(5):386–388. doi: 10.1038/s41422-024-00936-1
105. Rohrs JA, Zheng D, Graham NA, et al. Computational model of chimeric antigen receptors explains site-specific phosphorylation kinetics. *Biophys J.* 2018;115(6):1116–1129. doi: 10.1016/j.bpj.2018.08.018
106. Sheykhhasan M, Ahmadiéh-Yazdi A, Vicidomini R, et al. CAR T therapies in multiple myeloma: unleashing the future. *Cancer Gene Ther.* 2024;31(5):667–686. doi: 10.1038/s41417-024-00750-2
107. Stepanov AV, Xie J, Zhu Q, et al. Control of the antitumour activity and specificity of CAR T cells via organic adapters covalently tethering the CAR to tumour cells. *Nat Biomed Eng.* 2024;8(5):529–543. doi: 10.1038/s41551-023-01102-5
108. Stepanov AV, Kalinin RS, Shipunova VO, et al. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(46):e2210562119. doi: 10.1073/pnas.2210562119

УДК 577.218

РНК-интерференция генов, ассоциированных с инвазией опухолевых клеток головного мозга

М. А. Дымова*, О. А. Картина, Д. В. Дроков, Е. В. Кулигина, В. А. Рихтер

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: maya.a.rot@gmail.com

Поступила в редакцию 17.03.2025

Принята к печати 28.04.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27657

РЕФЕРАТ Глиомы высокой степени злокачественности являются одними из самых агрессивных опухолей головного мозга. Высокий инвазивный потенциал клеток глиомы обуславливает рецидивы заболевания даже после радикальной резекции опухоли. На данный момент определены сигнатуры генов, ассоциированных с инвазией клеток глиомы. Продукты экспрессии этих генов вовлечены в различные сигнальные пути, такие как пути катаболизма клеточных белков, путь p53, дисрегуляция транскрипции, путь JAK-STAT, т.е. они могут опосредованно модулировать инвазивный потенциал опухолевых клеток. С помощью технологии РНК-интерференции можно изменить уровень экспрессии обнаруженных генов и уменьшить инвазивный и пролиферативный потенциал трансформированных клеток. Представленный обзор посвящен использованию данной технологии для воздействия на различные звенья сигнальных путей и, соответственно, на клеточные процессы, ассоциированные с инвазией клеток глиобластомы. Кроме того, рассмотрены проблемы доставки интерферирующих РНК в клетки и способы их решения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глиома, инвазия, РНК-интерференция, малые интерферирующие РНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; CD133 – промиелин-1; CENPJ – центромерный белок J; CPC – прогениторные клетки сердца; CPNE3 – копин-3; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; ЕМА – Европейское агентство лекарственных средств; EV – внеклеточные везикулы; FAK – киназа фокальной адгезии; FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста второго типа; IDH – изоцитратдегидрогеназа; MAG – гены, ассоциированные с метастазированием; MALAT1 – транскрипт 1, ассоциированный с метастазированием аденокарциномы легкого; mCSC – метастазирующие стволовые опухолевые клетки; MDK – фактор роста клеток мидкин; MMP – матриксные металлопротеиназы; NAcGal – N-ацетилгалактозамин; PDGF – фактор роста тромбоцитов; RISC – комплекс сайленсинга, индуцированный РНК; siРНК – короткие интерферирующие РНК, siRNA; shРНК – короткие шпилечные РНК, shRNA; TMZ – темозоломид; VDAC1 – потенциал-зависимый анионный канал 1; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома (глиома IV степени злокачественности) – агрессивное злокачественное заболевание головного мозга, на долю которого приходится 49% первичных злокачественных опухолей центральной нервной системы [1]. Частота встречаемости данной опухоли составляет около 10 случаев на 100000 человек, медиана выживаемости пациентов с глиобластомой, проходящих стандартный курс лечения, равна примерно 14 месяцам, а 5-летняя выживаемость составляет всего 7.2% [2]. Выделяют несколько

факторов низкой выживаемости пациентов с этой онкопатологией: (1) инфильтративный характер роста опухоли, осложняющий ее полную хирургическую резекцию; (2) высокая степень генетической внутри- и межопухолевой гетерогенности, затрудняющей применение таргетной терапии; (3) наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), препятствующего доставке препаратов к опухолевой ткани; (4) иммуносупрессивное микроокружение опухоли, блокирующее противоопухолевый иммунитет; (5) отсутствие надежных методов ранней диагности-

ки заболевания. На сегодняшний день стандартным протоколом для лечения глиобластомы является максимально возможная безопасная хирургическая резекция опухоли, химиотерапия темозоломидом (TMZ) и лучевая терапия, так называемый протокол Ступпа [2]. Помимо TMZ применяют и другие химиотерапевтические препараты, такие как винкристин, ломустин, прокарбозин [1], метотрексат [3], глиадел [4], паклитаксел [5, 6]. Полнота хирургической резекции положительно коррелирует с выживаемостью пациентов, однако инфильтративный характер роста опухоли, размытость границ между опухолью и здоровой тканью и, следовательно, вероятность повредить здоровые участки головного мозга при проведении операции затрудняют полное удаление опухоли [2]. При лечении темозоломидом также существует ряд проблем, таких как приобретение опухолевыми клетками резистентности к препарату, побочные эффекты, связанные с миелосупрессией, короткий период полувыведения TMZ и низкая эффективность его проникновения через ГЭБ (около 20%), что приводит к увеличению терапевтической дозы и, как следствие, к большей выраженности побочных эффектов [7]. Поэтому поиск новых, эффективных методов лечения глиобластомы является одной из наиболее актуальных задач практической онкологии.

Инвазия как одна из характеристических особенностей глиобластомы

Ключевой характеристикой глиобластомы является активная инвазия опухолевых клеток, которая осуществляется вдоль существующих структур, преимущественно вдоль кровеносных и лимфатических сосудов и стенок желудочков мозга, либо путем прямого проникновения через твердую мозговую оболочку и кость. Способность опухолевых клеток к обратимому эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) позволяет им перестраивать цитоскелет, амeboидно передвигаться между другими клетками, изменяя структуру внеклеточного матрикса [8, 9]. Среди всего пула глиомных клеток выделяют метастазирующие опухолевые стволовые клетки (mCSC) [10]. Эпигенетическая пластичность mCSC позволяет им переключаться между стационарным, слабо пролиферирующим (спящим) состоянием, и мигрирующим, мезенхимально-подобным состоянием. Таким образом происходит инвазия опухолевых клеток в соседние ниши и образование метастазов, где mCSC экспрессируют маркеры мезенхимального подтипа, такие как CD44 и YK-40.

Опухолевые клетки способны высвобождать в межклеточное пространство нейромедиатор глутамат, вызывая эксайтотоксическую гибель окру-

жающих нервных клеток, тем самым освобождая себе пространство для амeboидного движения. Клетки микроглии и опухолевые клетки также секретируют различные ферменты (урокиназный активатор плазминогена, катепсин В, протеазы MMP и ADAM), разрушающие протеогликаны и гиалуроновую кислоту внеклеточного матрикса вдоль сосудов, что дает возможность клеткам проникать в кровеносное русло [11]. Патогномонично для глиобластомы формирование плотных клеточных образований, псевдопапилл, основными клетками которых являются клетки микроглии и макрофаги [12]. Отдельно стоит отметить наличие у части опухолевых клеток ламеллоподий, а также электрических синапсов, обеспечивающих межклеточную коммуникацию и координирование [13].

Гены, ассоциированные с процессами инвазии глиобластомы

Транскриптомный анализ и секвенирование ДНК одиночных клеток глиомы позволили определить сигнатуры генов (табл. 1), ассоциированных с процессами инвазии опухолевых клеток (MAG – metastasis-associated genes) [14]. Продукты этих генов вовлечены в сигнальные пути p53 и JAK-STAT, а также в такие клеточные процессы, как катаболизм клеточных белков, регуляция транскрипции, дифференцировки и пролиферации клеток. Подавление экспрессии данных генов может способствовать уменьшению не только инвазивного, но и пролиферативного потенциала клеток глиомы.

Помимо этого, с помощью регрессии Кокса обнаружили еще три гена (*GNS*, *LBH* и *SCARA3*), экспрессия которых коррелирует с продолжительностью жизни пациентов с диагностированной глиомой без мутаций в гене *IDH* [14, 27, 28]. Ген *GNS* кодирует глюкозамин (N-ацетил)-6-сульфатазу, уча-

Таблица 1. Гены, ассоциированные с инвазией клеток глиом

№	Сигнальные пути и клеточные процессы	Ген	Ссылка
1	Регуляция катаболизма клеточных белков	<i>CLU</i> , <i>HSP90AB3P</i> , <i>MDM2</i> , <i>OS9</i> , <i>SDCBP</i> , <i>TRIB2</i>	[14–20]
2	Сигнальный путь p53	<i>CASP3</i> , <i>CCND2</i> , <i>CDK4</i> , <i>IGFBP3</i> , <i>MDM2</i>	[14, 17, 21–24]
3	Регуляция транскрипции в раковых клетках	<i>CCND2</i> , <i>IGFBP3</i> , <i>MDM2</i> , <i>PLAT</i> , <i>ZEB1</i>	[14, 17, 22, 24–26]
4	Сигнальный путь JAK-STAT	<i>CCND2</i> , <i>FHL1</i>	[14, 22, 26]

Таблица 2. Препараты на основе siРНК, одобренные FDA для клинического использования

Препарат	Назначение	Мишень	Система доставки	Год одобрения FDA
Патисиран	Семейная амилоидная полинейропатия	Транстиретин печени	Липосомы	2018
Гивосиран	Острая печеночная порфирия	Аминолевулинат-синтаза 1	NAcGal	2019
Люмасаиран	Первичная гипероксалурия типа 1	Глиоксилатоксидаза печени	NAcGal	2020
Инклисиран	Гиперхолестеринемия	Субтилизин/ кексин типа 9	NAcGal	2021
Вутрисиран	Наследственный транстиретиновый амилоидоз с полинейропатией	Транстиретин	NAcGal	2022
Недосиран	Первичная гипероксалурия	Лактатдегидрогеназа печени	NAcGal	2023

ствующую в катаболизме гепарина, гепарансульфата и кератансульфата. Ген *LBN* экспрессируется на высоком уровне в глиоме. В условиях гипоксии экспрессия этого гена регулируется непосредственно транскрипционным фактором HIF-1 и способствует ангиогенезу опухоли. Ген *SCARA3* (Scavenger Receptor Class A Member A 3) кодирует рецептор-мусорщик класса А, уменьшающий количество активных форм кислорода и тем самым защищающий клетки от окислительного стресса.

Поскольку инвазия опухолевых клеток считается ключевым фактором прогноза заболевания, определение транскрипционных факторов, сигнальных путей и ключевых мастер-регуляторов этого процесса крайне важно как для понимания молекулярных механизмов онкогенеза, так и для дальнейшей разработки таргетных препаратов для лечения глиом.

РНК-интерференция как терапевтический подход

Одним из методов регуляции экспрессии генов является РНК-интерференция – естественный, эволюционно консервативный механизм защиты клетки от инвазии чужеродных генов, широко распространенный в организмах, входящих в различные таксоны [29]. РНК-интерференция представляет собой посттранскрипционное подавление экспрессии генов посредством деградации их мРНК, запускаемой малыми некодирующими РНК, комплементарными последовательности мРНК. К таким некодирующим РНК относятся двухцепочечные малые интерферирующие РНК (siРНК) и одноцепочечные короткие шпилечные РНК (shРНК). Клетки эукариот содержат фермент DICER, который гидролизует длинные эндогенные и экзогенные двухцепочечные РНК на более короткие фрагменты, а также расщепляет петлю shРНК, в результате чего образуются короткие siРНК. При связывании siРНК с целевой мРНК формируется РНК-белковый комплекс РНК-индуцированного сайленсинга (RISC), который осуществляет ферментативную деградацию мРНК и, соответственно, подавляет трансляцию [30, 31]. В отличие от синтетических siРНК, которые доставля-

ют в клетки в виде коротких двухцепочечных РНК, в случае shРНК обычно используют плазмидную ДНК или вирусные векторы. После доставки в клетку shРНК транскрибируется в цитоплазме и с помощью фермента DICER преобразуется в функциональную siРНК.

РНК-интерференция является одним из методов генной терапии различных заболеваний. В настоящее время уже шесть препаратов на основе siРНК одобрены для клинического применения (табл. 2). В 2018 году Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) и Европейское агентство лекарственных средств (EMA) впервые одобрили препарат патисиран для лечения полинейропатии, вызванной наследственным транстиретиновым амилоидозом, у взрослых пациентов. Еще шесть лекарственных препаратов на основе siРНК успешно прошли клинические испытания. Также на третьей стадии клинических испытаний находятся фитусиран (NCT05662319), тепасиран (NCT03510897) и тиванисиран (NCT05310422) [32].

Проблемы использования siРНК в таргетной терапии

Несмотря на перспективность терапии, основанной на РНК-интерференции, наличие препаратов, одобренных для клинического применения, и нескольких перспективных клинических испытаний, технология РНК-интерференции не лишена и фундаментальных недостатков. Значительными проблемами при клиническом применении интерферирующих РНК являются деградация свободных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях под действием нуклеаз, быстрый почечный клиренс, взаимодействие с внеклеточными белками и низкая эффективность клеточной интернализации [33]. Помимо биофармацевтических свойств, физико-химические свойства этих молекул (гидрофильность, отрицательный заряд и нестабильность) также существенно затрудняют доставку siРНК в клетки и снижают их биологическую активность [34]. Сами

нуклеиновые кислоты не являются ткане- или клеточно-специфичными и плохо проникают через различные биологические барьеры, что затрудняет создание препаратов на их основе с пероральным, интраназальным и трансдермальным введением [33]. Кроме того, отмечены нецелевые эффекты применения РНК-интерференции [35]. Например, введение shРНК, нацеленной на мРНК гена *HCN1*, в разные области мозга мышей вызывало опосредованную ими цитотоксическую активность, в том числе дегенерацию клеток гиппокампа при доставке даже контрольной shРНК, нацеленной на мРНК люциферазы, ген которой отсутствует в геноме мышей [36]. Такие нецелевые эффекты РНК-интерференции могут быть обусловлены как связыванием затравочных участков siРНК (seed region) с 3'-нетранслируемыми областями нецелевых мРНК, что приводит к их расщеплению комплексом DICER, так и тем, что доставка в клетку дополнительной экзогенной РНК приводит к конкуренции с эндогенной РНК на всех стадиях интерференции, например, за связывание с комплексами DICER и RISC в цитоплазме. Также синтетическая РНК может ошибочно распознаваться как вирусная РНК эндосомальными и внутриклеточными рецепторами клеток врожденной иммунной системы (например, Toll-подобными рецепторами (TLR-3, TLR-8 и TLR-9), рецепторами PKR и RIG-I), активируя воспалительный противовирусный иммунный ответ. Нецелевые эффекты РНК-интерференции можно уменьшить с помощью химической модификации нуклеотидов РНК (например, 2'-О-Ме, 2'-О-метоксиэтил, 2'-F, фосфотиоат и др.). Хотя полностью немодифицированные или «слегка» модифицированные siРНК способны опосредовать подавление генов *in vivo*, обширные модификации могут улучшить химическую стабильность и эффективность доставки siРНК, уменьшить токсичность, обусловленную нецелевыми воздействиями, снизить активацию врожденного иммунного ответа [37, 38]. Также нивелировать нецелевые эффекты можно с помощью тщательного подбора нуклеотидной последовательности siRNA с использованием алгоритмов и программ для поиска siРНК *in silico* [39, 40].

Системы доставки интерферирующих РНК

В течение последних 20 лет активно разрабатываются системы доставки siРНК, которые не только предотвращают деградацию РНК эндогенными нуклеазами и обеспечивают преодоление биологических барьеров, но и позволяют регулировать скорость выхода siРНК из эндосом. Выход из эндосом является критически важным этапом действия siРНК, лимитирующим как скорость РНК-

интерференции, так и ее эффективность, поскольку длительное пребывание в эндосомах приводит к разрушению РНК [40, 41].

Доставка siРНК может осуществляться с помощью липидных, неорганических (Si , Au , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Fe_xO_y) и полимерных наночастиц (хитозан, циклодекстрины, полиэтиленглимин, поли-L-лизин), дендримеров (полипропиленглимин, полиамидоамин), углеродных наноструктур (углеродных нанотрубок, квантовых точек, наноалмазов), пептидных носителей и конъюгатов (антитела, пептиды, NAcGal, холестерин) [42–44].

Липидные наночастицы – это структуры, состоящие преимущественно из фосфолипидов. Наночастицы могут быть созданы искусственно (липосомы) или получены из биологических жидкостей (внеклеточные везикулы, EV). Эти системы доставки препаратов в клетки биосовместимы, биоразлагаемы и хорошо изучены [45]. Внеклеточные везикулы могут быть также получены искусственно – путем химической обработки клеток соединениями, дестабилизирующими актин (цитохалазины, латрункулины и т.д.), или другими агентами, вызывающими необратимый химически индуцированный блеббинг плазматической мембраны (параформальдегид, N-этилmaleимид и т.д.) [46, 47].

Наибольший интерес представляют липидные наночастицы с поверхностными модификациями, позволяющими увеличивать их стабильность или таргетность их доставки, например, коммерчески доступные, ионизированные, амфифильные липидные наночастицы для доставки siРНК DLin-DMA, DLin-MC3-DMA и L319 [48]. Поверхность наночастиц можно функционализировать различными лигандами: аполипопротеинами, трансферринами, фолатами, интегринами и др. Показано, что модификация поверхности липосом, нагруженных siРНК, полиэтиленгликолем обеспечивает более длительную системную циркуляцию липидных частиц [33]. Дополнительная функционализация поверхности наночастиц пептидным аптамером, специфичным к фибронектину, экспрессия которого на клетках глиом значительно повышена, обеспечивает таргетную доставку липосом к опухолевым клеткам [49], торможение роста опухоли и увеличение выживаемости животных-опухоленосителей. В другом исследовании липосомные частицы функционализировали лигандом, нацеленным на LRP-1 (белок 1 семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности). LRP-1 экспрессируется эндотелиальными клетками ГЭБ и клетками глиобластомы. Показано, что такие наночастицы, нагруженные siРНК-MDK, уменьшали резистентность опухолевых клеток к TMZ и тормозили рост опухоли в ортотопических

моделях глиобластомы мышей [50]. Для функционализации липидных частиц использовали лиганды, специфичные к интегринам $\alpha\nu\beta 3$ и $\alpha\nu\beta 5$, для доставки siРНК в опухолевые клетки, или к $\alpha\nu\beta 6$ для доставки в эпителиальные клетки легких при COVID-19 [51, 52].

Эффективная доставка siРНК возможна лишь при преодолении биологических барьеров, препятствующих проникновению положительно заряженных частиц [53]. Стратегии преодоления этой так называемой «дилеммы поликатиона» в основном направлены на разработку наночастиц с обратимым зарядом. Такие ионизируемые липидные наночастицы имеют умеренно отрицательный или нейтральный поверхностный заряд, что увеличивает их стабильность в биологических жидкостях организма. Однако при сдвиге pH или окислительно-восстановительного потенциала, или под действием эндогенных ферментов и экзогенных факторов такие наночастицы меняют поверхностный заряд на положительный и эффективно поглощаются целевыми клетками [50, 53]. Так, для прохождения через ГЭБ липосомы могут быть защищены катехол-полиэтиленгликолевыми полимерами, что предотвращает преждевременное высвобождение их содержимого в цитоплазму нецелевых клеток (эндотелиоцитов, перитицитов и т.д.) [50]. В опухоли при повышенной концентрации активных форм кислорода защита снимается, и такие наночастицы проникают в клетки глиобластомы за счет нацеливающего лиганда.

В качестве альтернативного подхода для увеличения таргетности липидных наночастиц, нагруженных siРНК, предложены гибридные структуры, состоящие из липосом и внеклеточных везикул (EV). Внеклеточные везикулы являются природными переносчиками РНК, которые обладают такими преимуществами перед липосомами, как низкая токсичность и иммуногенность [54]. На поверхности таких гибридных структур могут быть экспонированы поверхностные маркеры EV, тогда наночастицы «наследуют» их свойства. Например, прогениторные клетки сердца (CPC) продуцируют различные регуляторные ростовые факторы и цитокины. Таким образом EV CPC активируют миграцию эндотелиальных клеток и ангиогенез *in vivo*, что может быть использовано в дальнейшем при разработке клеточных технологий для лечения постинфарктных состояний. Гибридные липосомные частицы, полученные с использованием EV CPC, также способны активировать миграцию эндотелиоцитов [55]. Поверхность EV можно модифицировать молекулами, нацеливающими их на клетки-мишени, или нагрузить их биологически активными молеку-

лами (химиопрепараты, факторы роста, микроРНК, siРНК) [56]. Так, был показан терапевтический эффект EV-siBRAF^{V600E} на мышинных моделях колоректального рака с мутацией V600E в гене *BRAF* [57]. Стоит отметить, что при производстве, выделении и характеристике внеклеточных везикул для увеличения воспроизводимости и минимизации побочных эффектов следует строго следовать «Минимальным правилам для изучения EV», разработанным «Международным обществом внеклеточных везикул» [58].

Таким образом, активно продолжается разработка липидных систем для оптимальной внутриклеточной доставки лекарственных средств. Одним из успешных результатов таких исследований стало разрешение на клиническое применение препарата патисиран (ONPATRO, компании Alnylam), представляющего собой липосомные наночастицы, модифицированные полиэтиленгликолем и нагруженные siРНК, нацеленными на свертывающий фактор VII (проконвертин) [41].

Экспонирование ткане- или органоспецифичных молекул на поверхности наночастиц, нагруженных siРНК, используется и в случае наночастиц не липидной природы. Например, показано, что кальций-фосфатные наночастицы, на поверхности которых расположены аполипопротеины E3, проникают через ГЭБ и обеспечивают эффективную доставку siРНК, ингибируя рост ксенотрансплантатов опухолей [59]. Среди полимерных наночастиц стоит отдельно отметить конъюгаты siРНК с N-ацетилгалактозамином (NAcGal) – лигандом, который связывается с рецептором асиалогликопротеинов, специфически экспрессируемым на поверхности гепатоцитов. Взаимодействие наночастиц такого типа с гепатоцитами приводит к быстрому эндоцитозу и снижению уровня целевых мРНК в гепатоцитах [60, 61]. Пять из шести препаратов на основе siРНК, одобренных для клинического применения (табл. 2), являются конъюгатами siРНК с NAcGal, однако такие конъюгаты обладают меньшей стабильностью по сравнению с липосомами и более сложны в производстве [62, 63]. Помимо NAcGal в качестве конъюгата с siРНК могут использоваться такие соединения, как холестерин [64], 2'-О-гексадецил (C16) [65], аптамеры [66], антитела [67] и пептиды [68].

Одной из активно развивающихся технологий доставки siРНК в клетки является доставка с помощью проникающих пептидов (CPP, Cell penetrating peptides). Как правило, CPP – это короткие положительно заряженные пептиды, способные проникать в клетки как путем эндоцитоза, так и прямо проходя через мембраны. Показано, что CPP способны

образовывать нековалентные комплексы или ковалентные конъюгаты с биологически активными нуклеиновыми кислотами (в том числе siРНК) и обеспечивать трансфекцию различных клеток [69, 70]. Например, фрагмент каппа-казеина человека, RL2, способен доставлять в клетки плазмидную ДНК, малую ядрышковую РНК и siРНК. При этом наибольшую эффективность трансфекции клеток обеспечивали комплексы RL2-siРНК; показано эффективное подавление экспрессии гена-мишени *EGFP* [71]. CPP, несмотря на все их преимущества, обладают и недостатками, присущими белковым препаратам, такими как короткий период полувыведения, сложность оптимизации условий образования монодисперсной суспензии таких частиц, а также высокая стоимость их получения. Поэтому CPP используют в составе гибридных частиц, например с PEG, или в качестве антигена, который экспонируют на поверхности липидных наночастиц, нагруженных siРНК [72, 73].

Таким образом, при разработке лекарственных средств на основе siРНК необходимо, в первую очередь, увеличить стабильность молекулы во внутренней среде организма. Это можно сделать как с помощью модификации структуры siРНК, так и с помощью конъюгирования siРНК с другими соединениями. Для дальнейшей оптимизации возможна инкапсуляция siРНК в наночастицы, такие как катионные липосомы или углеродные наноструктуры с включением в их состав таргетного лиганда. Все это защищает siРНК от агрессивной биологической среды, увеличивает тропность наночастиц к мишени и, соответственно, эффективность РНК-интерференции в отношении конкретного гена-мишени.

РНК-интерференция как перспективный подход к терапии глиобластомы

Эффективность применения технологии РНК-интерференции для ингибирования сигнальных путей, обеспечивающих инвазию, ангиогенез, пролиферацию клеток глиобластомы, а также их резистентность к химио- и радиотерапии, уже показана в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Так, обработка клеток Т98G глиобластомы человека siРНК, нацеленными на гены *Akt3* и *PI3K*, в комбинации с темозоломидом (TMZ) приводила к остановке клеточного цикла в фазе S и G2/M, индукции апоптоза и некроза опухолевых клеток [74]. Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR регулирует процессы апоптоза, пролиферации, инвазии, метаболизма, ЭМП и репарации ДНК в клетках глиобластомы (рис. 1) [75]. Путь PI3K/Akt/mTOR активируется при взаимодействии эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста тромбоцитов (PDGF) и фактора роста эндотелия

сосудов (VEGF) с их тирозинкиназными рецепторами. Показано, что данный каскад связан с развитием лекарственной устойчивости, а ингибирование этого каскада с помощью РНК-интерференции приводило к увеличению чувствительности клеток глиобластомы U251 MG человека к бортезомибу [76].

Белок CD133 считается маркером стволовых опухолевых клеток (СОК), в том числе и стволовых клеток глиобластомы [77]. Участие CD133 в онкогенезе делает его важной терапевтической мишенью для элиминации СОК, в значительной степени обеспечивающих рецидивирование опухоли, а также для ингибирования процессов инвазии, миграции и ЭМП. Показано, что действие CD133-siРНК снижало скорость миграции клеток U87 MG. Это может быть связано с модуляцией сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (рис. 1), в частности, РНК-интерференция гена *CD133* приводила к снижению экспрессии генов *RAF1*, *MAP2K1*, *MAPK3*, *PIK3CA*, *AKT3* и *mTOR* [78].

В качестве еще одного примера ингибирования сигнальных путей можно привести подавление экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) и эпидермального фактора роста второго типа (HER2). Эти рецепторы опосредуют активацию сигнального пути MAPK/ERK, регулирующего процессы пролиферации и миграции опухолевых клеток (рис. 1). Так, киназа ERK активирует такие транскрипционные факторы, как с-Мус, которые, в свою очередь, повышают экспрессию генов – регуляторов клеточного цикла. К генам-мишеням с-Мус относятся циклин-зависимые киназы, циклины и фактор транскрипции E2F [79]. Показано, что HER2-siРНК снижала скорость миграции и пролиферации клеток LN-229 и U251 MG на ~50% [80]. Нокдаун *EGFR* снижал скорость пролиферации клеток обеих линий на ~40%. Экспрессия гена *IGFBP3*, относящегося к упомянутой группе MAG (табл. 1), также модулируется сигнальным путем MAPK/ERK и положительно коррелирует со степенью злокачественности опухоли [24, 81]. В экспериментах *in vivo* на ортотопической мышинной модели глиомы U87 MG/Luc установлено торможение роста опухолей двумя siРНК (siBP3-1 и siBP3-2). Перспективными мишенями для siРНК считаются гены *STAT3*, кофилина-1, галектина-1 и *ELTD1*, активируемые также сигнальным путем MAPK/ERK [82, 83].

Одной из перспективных мишеней для терапии опухолей считают ген *TMEM97*, кодирующий трансмембранный белок TMEM97 (сигма-2-рецептор ($\sigma 2R$)) [84], который взаимодействует с тирозинкиназным рецептором EGF (рис. 1). Подавление

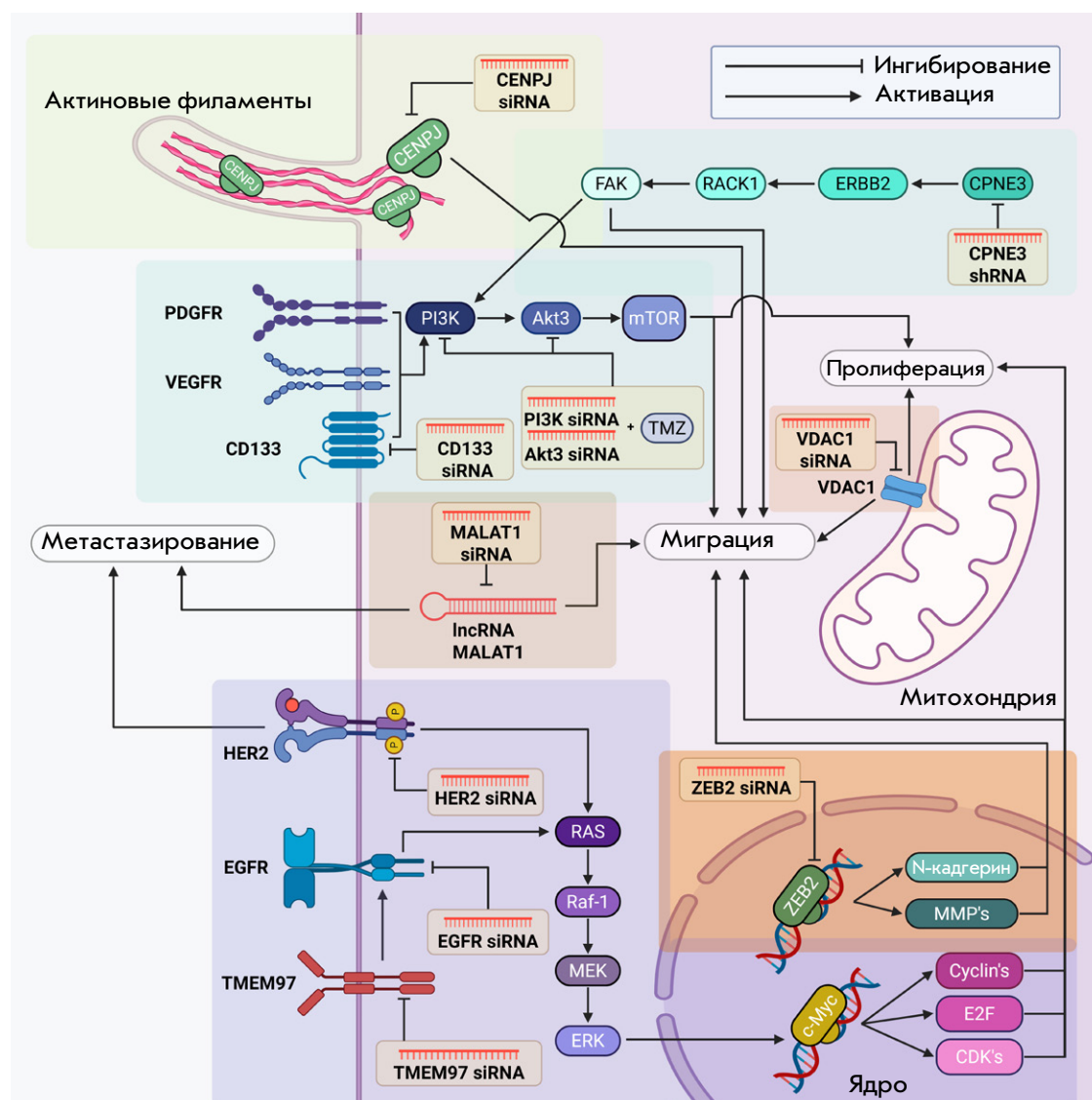


Рис. 1. Применение РНК-интерференции для регуляции экспрессии генов, продукты которых участвуют в пролиферации и миграции клеток глиобластомы. siRNA – короткие интерферирующие РНК; shRNA – короткие шпилечные РНК

экспрессии гена *TMEM97* с помощью РНК-интерференции в клетках U87 MG и U373 MG приводило к снижению пролиферации, миграции и инвазии клеток, а также к остановке клеточного цикла в фазе G1/S [85]. Кроме того, при РНК-интерференции гена *TMEM97* происходила модуляция ЭМП – снижался уровень β -катенина и Twist, повышался уровень Е-кадгерина.

Потенциал-зависимый анионный канал 1 (VDAC1) – это белок, участвующий в неселективном транспорте анионов и катионов через внешнюю мембрану митохондрий, а также экспортирующий АТФ в цитоплазму клетки (рис. 1). Известно, что повышенная экспрессия гена *VDAC1* играет важную роль в перепрограммировании метаболических и энергетических процессов опухолевых клеток [86]. Показано, что ингибирование экспрессии *VDAC1*

приводит к снижению скорости миграции и инвазии клеток глиобластомы U87 MG человека *in vitro*, а также к замедлению роста опухоли U87 MG в мышинной модели [87, 88]. Полагают, что это связано с диссипацией мембранного потенциала митохондриальных опухолевых клеток, что приводит к снижению внутриклеточной концентрации АТФ и, как следствие, к нарушению клеточного метаболизма.

Кроме белоккодирующих генов, мишенью ген-направленной терапии на основе РНК-интерференции могут быть и длинные некодирующие РНК, например, *MALAT1* (рис. 1), высокий уровень которой ассоциирован с плохим прогнозом у пациентов с глиобластомой [89]. Показано, что уровень *MALAT1* повышен в клетках U251 MG и U87 MG глиобластомы человека, резистентных к TMZ [90]. После того как клетки трансфицировали

MALAT1-siРНК, наблюдалось снижение экспрессии генов, опосредующих лекарственную устойчивость, таких как *MDR1*, *MRP5* и *LRP1*, а также снижение экспрессии гена *ZEB1*, участвующего в ЭМП опухолевых клеток. Прогрессирование опухоли сопровождается ЭМП, при котором происходит разрушение внеклеточного матрикса и снижение адгезии опухолевых клеток, что способствует усилению их миграции и инвазии. Таким образом, блокирование этих клеточных процессов с помощью РНК-интерференции может существенно снизить метастатический потенциал опухоли. В ЭМП клеток глиобластомы человека немаловажную роль играет копин-3, CPNE3, который относится к классу Ca^{2+} -зависимых фосфолипидсвязывающих белков CPNE (рис. 1). CPNE3 индуцирует ЭМП путем активации сигнального пути FAK, способствуя инвазии и миграции клеток опухоли. Подавление экспрессии гена *CPNE3* с помощью *CPNE3-shРНК* в клетках U87 MG и U251 MG нарушало миграционные, инвазивные и пролиферативные способности клеток глиобластомы, что может быть связано с инактивацией сигнального пути FAK и, как следствие, сигнального пути PI3K/Akt/mTOR [91, 92]. Белок ZEB2 является транскрипционным фактором, который играет важную роль в развитии центральной нервной системы на протяжении всего эмбрионального периода. При этом ZEB2 участвует и в ЭМП опухолевых клеток, а повышение экспрессии гена *ZEB2* наблюдается при многих видах опухолей, включая глиобластому [63]. Анализ миграционной способности клеток глиомы U87 MG и U373 MG выявил значительное снижение скорости миграции клеток, трансфицированных ZEB2-siRNA, по сравнению с контрольными клетками [93]. Известно, что сверхэкспрессия *ZEB2* приводит к повышению уровня N-кадгерина и ряда матриксных металлопротеиназ (рис. 1), что, в свою очередь, способствует инвазии/миграции опухолевых клеток [93–95]. В процесс ЭМП вовлечен также центромерный белок J (CENPJ), который контролирует деление нейральных предшественников и миграцию нейронов [96]. Показано, что экспрессия гена *CENPJ* повышена в клетках линий глиобластомы человека по сравнению со здоровой тканью головного мозга, при этом у пациентов с глиомой это коррелирует с плохим прогнозом заболевания. Обработка клеток персонализированных культур глиобластомы (GBM02 и GBM95) CENPJ-siРНК приводила к снижению

скорости их миграции. Предполагается, что нокдаун *CENPJ* способствует изменению морфологии клеток глиобластомы из-за стабилизации микротрубочек и деполимеризации актиновых микрофиламентов, тем самым клетки становятся менее склонными к эпителиально-мезенхимальному переходу (рис. 1).

В настоящее время проходит первая фаза клинических испытаний одного препарата на основе siРНК, предназначенного для лечения глиобластомы – NU-0129 (Clinical trials: NCT03020017). Препарат представляет собой комплекс наночастиц золота и siРНК, мишенью которой является мРНК гена *Bcl2L12*. Этот ген кодирует антиапоптотический белок Bcl2L12, уровень которого повышен в клетках глиобластомы человека, что делает их устойчивыми к апоптозу. Анализ накопления золотых наночастиц в опухолях пациентов показал, что NU-0129 проникает через гематоэнцефалический барьер и накапливается в опухолевой ткани, где снижает содержание белка Bcl2L12 [97]. Таким образом, создание таргетных нетоксичных наночастиц с описанными выше siРНК и дальнейшее исследование их эффективности в отношении глиобластом безусловно перспективно, а клинические испытания разработанных лекарственных препаратов расширят возможности терапии нейроонкологических заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РНК-интерференция является перспективным терапевтическим подходом к лечению глиобластомы. Имеющиеся в настоящее время перспективные системы доставки интерферирующих РНК закладывают фундамент для создания таргетных агентов, блокирующих пролиферацию, инвазию, миграцию и эпителиально-мезенхимальный переход опухолевых клеток. Уже описанные сигнатуры генов MAG, а также генов сигнальных путей FAK, PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK будут способствовать поиску siРНК, перспективных для разработки эффективных таргетных терапевтических средств против глиобластомы. При разработке препаратов на основе siРНК наши усилия должны быть направлены на улучшение эффективности их проникновения, увеличение стабильности и специфичности действия к выбранной мишени. ●

*Исследование поддержано в рамках
государственного задания ИХБФМ СО РАН
(№ 125012900932-4).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schaff L.R., Mellinghoff I.K. // JAMA. 2023. V. 329. № 7. P. 574.
2. Wu W., Klockow J.L., Zhang M., Lafortune F., Chang E., Jin L., Wu Y., Daldrop-Link H.E. // Pharmacol. Res. 2021. V. 171.

P. 105780.

3. Kang X., Chen F., Yang S.-B., Wang Y.-L., Qian Z.-H., Li Y., Lin H., Li P., Peng Y.-C., Wang X.-M., et al. // World J. Clin. Cases. 2022. V. 10. № 17. P. 5595–5605.

4. Iuchi T, Inoue A, Hirose Y, Morioka M, Horiguchi K, Natsume A, Arakawa Y, Iwasaki K, Fujiki M, Kumabe T, et al. // *Neuro-Oncology Adv.* 2022. V. 4. № 1. vdab189. doi: 10.1093/oaajnl/vdab189.
5. AbdEl-haq M, Kumar A, Ait Mohand F, Kravchenko-Balasha N, Rottenberg Y, Domb A.J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 14. P. 11722.
6. Rodríguez-Camacho A, Flores-Vázquez J.G., Moscardini-Martelli J, Torres-Ríos J.A., Olmos-Guzmán A., Ortiz-Arce C.S., Cid-Sánchez D.R., Pérez S.R., Macías-González M.D.S., Hernández-Sánchez L.C., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 13. P. 7207.
7. Tan A.C., Ashley D.M., López G.Y., Malinzak M., Friedman H.S., Khasraw M. // *CA. Cancer J. Clin.* 2020. V. 70. № 4. P. 299–312.
8. Weenink B, French P.J., Sillevs Smitt P.A.E., Debets R., Geurts M. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 3. P. 751.
9. Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Вторушин С.В., Перельмутер В.М. // *Acta Naturae*. 2015. Т. 2. № 25. С. 18–31.
10. Lah T.T., Novak M., Breznik B. // *Semin. Cancer Biol.* 2020. V. 60. P. 262–273.
11. Geribaldi-Doldán N, Fernández-Ponce C., Quiroz R.N., Sánchez-Gomar I, Escorcia L.G., Velásquez E.P., Quiroz E.N. // *Front. Oncol.* 2021. V. 10. P. 603495. doi: 10.3389/fonc.2020.603495.
12. Saavedra-López E, Roig-Martínez M, Cribaro G.P., Casanova P.V., Gallego J.M., Pérez-Vallés A., Barcia C. // *Brain Commun.* 2020. V. 2. № 1. fcz043. doi: 10.3389/fonc.2020.603495.
13. Venkatesh H.S., Morishita W., Geraghty A.C., Silverbush D., Gillespie S.M., Arzt M., Tam L.T., Espenel C., Ponnuswami A., Ni L., et al. // *Nature*. 2019. V. 573. № 7775. P. 539–545.
14. Li X., Meng Y. // *BMC Cancer*. 2020. V. 20. № 1. P. 1114.
15. Ren X., Chang C., Qi T., Yang P., Wang Y., Zhou X., Guan F., Li X. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 17. P. 13413.
16. Albakova Z., Siam M.K.S., Sacitharan P.K., Ziganshin R.H., Ryazantsev D.Y., Sapozhnikov A.M. // *Transl. Oncol.* 2021. V. 14. № 2. P. 100995.
17. Pellot Ortiz K.I., Rechberger J.S., Nonnenbroich L.F., Daniels D.J., Sarkaria J.N. // *Biomedicines*. 2023. V. 11. № 7. P. 1879.
18. Zhang P, Meng X, Liu L, Li S, Li Y, Ali S, Li S, Xiong J, Liu X, Li S, et al. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. P. 633357. doi: 10.3389/fonc.2021.633357
19. Talukdar S, Pradhan A.K., Bhoopathi P, Shen X.N., August L.A., Windle J.J., Sarkar D, Furnari F.B., Cavenee W.K., Das S.K., et al. // *Autophagy*. 2018. V. 14. № 10. P. 1845–1846.
20. Wang J, Zuo J, Wahafu A, Wang M. de, Li R. chun, Xie W. fu. // *CNS Neurosci. Ther.* 2020. V. 26. № 3. P. 297–308.
21. Feng X, Zhu F, Dai L, Liu X, Shao L, Hao L, Cang S, Cheng J. // *J. Neurooncol.* 2023. V. 163. № 2. P. 313–325.
22. Büschiges R., Weber R.G., Actor B., Lichter P., Collins V.P., Reifenberger G. // *Brain Pathol.* 1999. V. 9. № 3. P. 435–442.
23. Giordano F, D'Amico M, Montalto F.L., Malivindi R., Chimento A, Conforti F.L., Pezzi V, Panno M.L., Andò S, De Amicis F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 12. P. 10094.
24. Chen C.-H., Chen P.-Y., Lin Y.-Y., Feng L.-Y., Chen S.-H., Chen C.-Y., Huang Y.-C., Huang C.-Y., Jung S.-M., Chen L.Y., et al. // *J. Neurosurg.* 2020. V. 132. № 1. P. 168–179.
25. Yamashita D, Kondo T, Ohue S, Takahashi H, Ishikawa M, Matoba R, Suehiro S, Kohno S, Harada H, Tanaka J, et al. // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 6. P. 1123–1133.
26. Siebzehrnubl F.A., Silver D.J., Tugertimur B., Deleyrolle L.P., Siebzehrnubl D., Sarkisian M.R., Devers K.G., Yachnis A.T., Kupper M.D., Neal D., et al. // *EMBO Mol. Med.* 2013. V. 5. № 8. P. 1196–1212.
27. Liu L., Luo Q., Xu Q., Xiong Y., Deng H. // *FEBS Open Bio.* 2022. V. 12. № 1. P. 211–220.
28. Cao M., Cai J., Yuan Y., Shi Y., Wu H., Liu Q., Yao Y., Chen L., Dang W., Zhang X., et al. // *Cancer Biol. Med.* 2019. V. 16. № 3. P. 595–605.
29. Jadhav V., Vaishnav A., Fitzgerald K., Maier M.A. // *Nat. Biotechnol.* 2024. V. 42. № 3. P. 394–405.
30. Le C.T., Le T.N.Y., Nguyen T.A. // *Meth. Enzymol.* 2023. V. 692. P. 231–247.
31. Goel K., Ploski J.E. // *Front. Mol. Neurosci.* 2022. V. 15. P. 914430. doi: 10.3389/fnmol.2022.914430.
32. Sehgal I, Eells K, Hudson I. // *Pharmacy*. 2024. V. 12. № 2. P. 58.
33. Shetty K., Yasaswi S., Dutt S., Yadav K.S. // *3 Biotech.* 2022. V. 12. № 11. P. 301. doi: 10.1007/s13205-022-03365-2.
34. Singh P., Singh A., Shah S., Vataliya J., Mittal A., Chitkara D. // *Mol. Pharm.* 2020. V. 17. № 11. P. 4040–4066.
35. Kobayashi Y., Tian S., Ui-Tei K. // *Genes (Basel)*. 2022. V. 13. № 2. P. 319.
36. Günther A., Luczak V., Abel T., Baumann A. // *J. Exp. Biol.* 2017. V. 220. № 8. P. 1400–1404. doi: 10.1242/jeb.154583.
37. Friedrich M., Aigner A. // *BioDrugs*. 2022. V. 36. № 5. P. 549–571.
38. Chernikov I.V., Ponomareva U.A., Chernolovskaya E.L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 2. P. 956.
39. Lück S., Kreszies T., Strickert M., Schweizer P., Kuhlmann M., Douchkov D. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1023. doi: 10.3389/fpls.2019.01023.
40. Gilleron J., Querbes W., Zeigerer A., Borodovsky A., Marsico G., Schubert U., Manygoats K., Seifert S., Andree C., Stöter M., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 7. P. 638–646.
41. Urits I., Swanson D., Swett M.C., Patel A., Berardino K., Amgalan A., Berger A.A., Kassem H., Kaye A., Viswanath O. // *Neurol. Ther.* 2020. V. 9. № 2. P. 301–315. doi: 10.1007/s40120-020-00208-1.
42. Yazdani S., Mozaffarian M., Pazuki G., Hadidi N., Villate-Beitia I., Zárate J., Puras G., Pedraz J.L. // *Pharmaceutics*. 2024. V. 16. № 2. P. 288.
43. Yang C., Lin Z., Zhang X., Xu Z., Xu G., Wang Y., Tsai T., Cheng P., Law W., Yong K., et al. // *Macromol. Biosci.* 2024. V. 24. № 4. doi: 10.1002/mabi.202300362.
44. Ротов А.Ю., Романов И.С., Тараканчикова Я.В., Астахова Л.А. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2021. Т. 107. № 11. С. 1323–1343.
45. Roostaei M., Derakhshani A., Mirhosseini H., Banaee Mofakham E., Fathi-Karkan S., Mirinejad S., Sargazi S., Barani M. // *Nanoscale*. 2023. V. 16. № 6. P. 2713–2746.
46. Oshchepkova A., Chernikov I., Miroshnichenko S., Patutina O., Markov O., Savin I., Staroseletz Y., Meschaninova M., Puchkov P., Zhukov S., et al. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2024. V. 12. № October. P. 1–18.
47. Thone M.N., Kwon Y.J. // *Methods*. 2020. V. 177. P. 135–145.
48. Hu B., Zhong L., Weng Y., Peng L., Huang Y., Zhao Y., Liang X.-J. // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020. V. 5. № 1. P. 101.
49. Saw P.E., Zhang A., Nie Y., Zhang L., Xu Y., Xu X. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 1194. doi: 10.3389/fphar.2018.01194.
50. Zhao Y., Qin J., Yu D., Liu Y., Song D., Tian K., Chen H., Ye Q., Wang X., Xu T., et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2024. V. 19. № 12. P. 1869–1879.

51. Bugatti K. // *ChemBioChem*. 2021. V. 22. № 15. P. 2516–2520.
52. Meecham A., Cutmore L.C., Protopapa P., Rigby L.G., Marshall J.F. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. doi: 10.3389/fcell.2022.920303.
53. Veider F., Sanchez Armengol E., Bernkop-Schnürch A. // *Small*. 2024. V. 20. № 3. doi: 10.1002/sml.202304713.
54. Herrmann I.K., Wood M.J.A., Fuhrmann G. // *Nat. Nanotechnol.* 2021. V. 16. № 7. P. 748–759.
55. Evers M.J.W., van de Wakker S.I., de Groot E.M., de Jong O.G., Gitz-François J.J.J., Seinen C.S., Sluijter J.P.G., Schiffelers R.M., Vader P. // *Adv. Healthc. Mater.* 2022. V. 11. № 5. doi: 10.1002/adhm.202101202.
56. Velikonivtsev F.S., Golovkin A.S. // *Russ. J. Cardiol.* 2020. V. 25. № 10. P. 4081.
57. Wang D., Wang L., Zhang W., Xu K., Chen L., Guo Z., Wu K., Huang D., Zhao Y., Yao M., et al. // *J. Nanobiotechnology*. 2025. V. 23. № 1. P. 129.
58. Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O'Driscoll L., Buzas E.I., Blenkiron C., Bussolati B., Cai H., Di Vizio D., Driedonks T.A.P., Erdbrügger U., et al. // *J. Extracell. Vesicles*. 2024. V. 13. № 2. doi: 10.1002/jev.2.12404.
59. Huang J.L., Jiang G., Song Q.X., Gu X., Hu M., Wang X.L., Song H.H., Chen L.P., Lin Y.Y., Jiang D., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15144. doi: 10.1038/ncomms15144.
60. Zhang M.M., Bahal R., Rasmussen T.P., Manautou J.E., Zhong X. bo. // *Biochem. Pharmacol.* 2021. V. 189. P. 114432. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114432.
61. Syed Y.Y. // *Drugs*. 2023. V. 83. № 18. P. 1729–1733. doi: 10.1007/s40265-023-01976-4.
62. Adams D., Tournev I.L., Taylor M.S., Coelho T., Planté-Bordeneuve V., Berk J.L., González-Duarte A., Gillmore J.D., Low S.-C., Sekijima Y., et al. // *Amyloid*. 2023. V. 30. № 1. P. 18–26.
63. Zhang L., Liang Y., Liang G., Tian Z., Zhang Y., Liu Z., Ji X. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 1090237. doi: 10.3389/fphar.2022.1090237.
64. Chernikov I.V., Bachkova I.K., Sen'kova A.V., Meschaninova M.I., Savin I.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A., Chernolovskaya E.L. // *Cells*. 2024. V. 13. № 9. P. 767.
65. Brown K.M., Nair J.K., Janas M.M., Anglero-Rodriguez Y.I., Dang L.T.H., Peng H., Theile C.S., Castellanos-Rizaldos E., Brown C., Foster D., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2022. V. 40. № 10. P. 1500–1508.
66. Wang S., Zhao Y., Yao F., Wei P., Ma L., Zhang S. // *Biomed. Pharmacother.* 2024. V. 174. P. 116437.
67. Rady T., Erb S., Deddouche-Grass S., Morales R., Chaubet G., Cianféroni S., Basse N., Wagner A. // *iScience*. 2024. V. 27. № 3. P. 109068.
68. Smidt J.M., Lykke L., Stidsen C.E., Pristovšek N., Gothelf K.V. // *Nucl. Acids Res.* 2024. V. 52. № 1. P. 49–58.
69. Kiisholts K., Kurrikoff K., Arukuusk P., Porosk L., Peters M., Salumets A., Langel Ü. // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. № 10. P. 1618.
70. Nai J., Zhang J., Li J., Li H., Yang Y., Yang M., Wang Y., Gong W., Li Z., Li L., et al. // *Mol. Ther. – Nucl. Acids*. 2022. V. 27. P. 349–362.
71. Chinak O., Golubitskaya E., Pyshnaya I., Stepanov G., Zhuravlev E., Richter V., Koval O. // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 1043. doi: 10.3389/fphar.2019.01043.
72. Boisguérin P., Konate K., Josse E., Vivès E., Deshayes S. // *Biomedicines*. 2021. V. 9. № 5. P. 583.
73. Vysochinskaya Y., Zabrodskaya Y., Dovbysh O., Emelyanov A., Klimenko V., Knyazev N., Terterov I., Egorova M., Bogdanov A., Maslov M., et al. // *Biochimie*. 2024. V. 221. P. 1–12.
74. Paul-Samojedny M., Pudelko A., Kowalczyk M., Fila-Daniłow A., Suchanek-Raif R., Borkowska P., Kowalski J. // *BioDrugs*. 2016. V. 30. № 2. P. 129–144.
75. Peng Y., Wang Y., Zhou C., Mei W., Zeng C. // *Front. Oncol.* 2022. V. 12. P. 819128. doi: 10.3389/fonc.2022.819128.
76. Wang J., Ren D., Sun Y., Xu C., Wang C., Cheng R., Wang L., Jia G., Ren J., Ma J., et al. // *J. Cell. Mol. Med.* 2020. V. 24. № 7. P. 3931–3947.
77. Joyce T., Jagasia S., Tasci E., Camphausen K., Krauze A.V. // *Curr. Oncol.* 2023. V. 30. № 9. P. 8278–8293.
78. Abdoli Shadbad M., Nejadi Orang F., Baradaran B. // *Eur. J. Med. Res.* 2024. V. 29. № 1. P. 154.
79. Bretones G., Delgado M.D., León J. // *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* 2015. V. 1849. № 5. P. 506–516.
80. Wichmann H., Güttler A., Bache M., Taubert H., Rot S., Kessler J., Eckert A.W., Kappler M., Vordermark D. // *Strahlentherapie und Onkol.* 2015. V. 191. № 2. P. 180–191.
81. Zhang X., Wang G., Gong Y., Zhao L., Song P., Zhang H., Zhang Y., Ju H., Wang X., Wang B., et al. // *iScience*. 2023. V. 26. № 5. P. 106639.
82. Ahirwar K., Kumar A., Srivastava N., Saraf S.A., Shukla R. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2024. V. 266. Pt 1. P. 131048.
83. Shahani A., Slika H., Elbeltagy A., Lee A., Peters C., Dotson T., Raj D., Tyler B. // *Cancer Drug Resist.* 2025. V. 8. P. 10.
84. Zeng C., Riad A., Mach R.H. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 7. P. 1877.
85. Qiu G., Sun W., Zou Y., Cai Z., Wang P., Lin X., Huang J., Jiang L., Ding X., Hu G. // *Tumor Biol.* 2015. V. 36. № 10. P. 8231–8238.
86. Zerbib E., Arif T., Shteinfefer-Kuzmine A., Chalifa-Caspi V., Shoshan-Barmatz V. // *Cancers (Basel)*. 2021. V. 13. № 11. P. 2850.
87. Arif T., Vasilkovsky L., Refaely Y., Konson A., Shoshan-Barmatz V. // *Mol. Ther. Nucl. Acids*. 2014. V. 3. № 4. e159. doi: 10.1038/mtna.2014.9.
88. Arif T., Paul A., Krelm Y., Shteinfefer-Kuzmine A., Shoshan-Barmatz V. // *Cancers (Basel)*. 2018. V. 10. № 12. P. 499. doi: 10.3390/cancers10120499.
89. Argadal O.G., Mutlu M., Ak Aksoy S., Kocaeli H., Tunca B., Civan M.N., Egeli U., Cecener G., Bekar A., Taskapilioglu M.O., et al. // *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2019. V. 20. № 1. P. 63–69. doi: 10.17305/bjbm.2019.4297.
90. Li H., Yuan X., Yan D., Li D., Guan F., Dong Y., Wang H., Liu X., Yang B. // *Cell. Physiol. Biochem*. 2017. V. 42. № 3. P. 1192–1201.
91. Shi D., Lin B., Lai J., Li K., Feng Y. // *J. Mol. Histol.* 2021. V. 52. № 3. P. 589–596.
92. Paul R., Luo M., Mo X., Lu J., Yeo S.K., Guan J.-L. // *Breast Cancer Res.* 2020. V. 22. № 1. P. 59.
93. Safaee S., Fardi M., Hemmat N., Khosravi N., Derakhshani A., Silvestris N., Baradaran B. // *Molecules*. 2021. V. 26. № 4. P. 901.
94. Yi X., Shi S., Li X., Zhao L. // *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. 2015. V. 29. № 18. 1648–1651.
95. Dai Y.H., Lv L., Huo J.R., Chu Y., Tang Y.P., Zhou Y.Q., Zhu H.Y. // *Dig. Dis. Sci.* 2012. V. 57. № 5. P. 1253–1260.
96. de Freitas G.P.A., Geraldo L.H.M., Faria B.M., Alves-Leon S.V., de Souza J.M., Moura-Neto V., Pontes B., Romão L.F., Garcez P.P. // *J. Neurochem.* 2022. V. 162. № 6. P. 501–513.
97. Kumthekar P., Ko C.H., Paunesku T., Dixit K., Sonabend A.M., Bloch O., Tate M., Schwartz M., Zuckerman L., Lezon R., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2021. V. 13. № 584. doi: 10.1126/scitranslmed.abb3945.

УДК 577.352.465

Депо-управляемый вход кальция — как важный механизм адаптации опухоли к агрессивному микроокружению

А. Ю. Скопин, Е. В. Казначеева*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

* E-mail: evkzn@incras.ru

Поступила в редакцию 29.11.2024

Принята к печати 22.04.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27574

РЕФЕРАТ Кальциевая сигнализация обеспечивает эффективное функционирование клетки, а нарушение баланса в системе кальциевого гомеостаза ведет к негативным последствиям для клетки в случае как избытка, так и недостатка кальция. При опухолевой трансформации наблюдается существенное изменение экспрессии белков, ключевых для депо-управляемого входа кальция, что приводит к нарушению процессов кальциевой сигнализации. Вполне вероятно, что перестройка внутренних сигнальных путей опухолевой клетки необходима для интенсификации метаболических процессов и дальнейшего роста и инвазии опухоли. Вместе с тем, тонкая настройка кальциевой сигнализации наблюдается как в норме, так и при патологии. В этой связи особое место в исследовании роли кальциевой сигнализации при развитии опухолевой трансформации занимает изучение перенастройки сигнализации в опухолевом окружении. Показано, что факторы, характерные для микроокружения опухоли, оказывают существенное влияние на работу кальциевых каналов и белков, регулирующих кальциевую сигнализацию. Основные негативные факторы микроокружения, такие как закисление, повышение уровня активных радикалов и гипоксия, влияют на депо-управляемый вход кальция. Весьма важно понять, являются ли изменения в экспрессии ключевых участников депо-управляемого входа кальция адаптацией к микроокружению или же следствием канцерогенеза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кальций, депо-управляемый вход, STIM, Orai, опухолевая трансформация, микроокружение опухоли, кальциевая сигнализация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ SOC – store operated channels (депо-управляемые каналы); SOCE – store operated calcium entry (депо-управляемый вход кальция); SERCA – sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (кальциевая АТФ-аза ЭР); PMCA – plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (кальциевая АТФ-аза плазматической мембраны); АФК – активные формы кислорода; ЭР – эндоплазматический ретикулум; РМЖ – рак молочной железы.

1. ВВЕДЕНИЕ

Микроокружение опухоли формируется различными клетками, как раковыми, так и нераковыми, например, иммунными. Канцерогенез протекает при непрерывном воздействии соседних клеток, растворимых факторов, внеклеточного матрикса. Растворимые факторы включают питательные вещества, кислород, активные формы кислорода (АФК), активные формы азота, АТФ, цитокины, факторы роста, хемокины, различные ионы, например, Ca^{2+} , H^+ , продукты жизнедеятельности клеток опухоли и т.д. [1, 2]. Изменения внутриклеточной концентрации кальция влияют на процессы пролиферации и апоптоза раковых клеток, их энергетику и способность к инвазии, т.е. они играют важную

роль в росте и развитии опухоли [3–5]. К настоящему времени накоплен значительный материал, свидетельствующий об альтерации в кальциевой сигнализации при опухолевой трансформации. Известно, что при развитии патологического процесса изменяются уровни экспрессии белков, участвующих в кальциевой сигнализации. Вместе с тем, остается непонятным, связаны ли альтерации в процессе кальциевой сигнализации с адаптацией микроокружения опухоли, где сигнализация играет ключевую роль, или с изменением уровня экспрессии специфических белков, участников процесса передачи кальциевого сигнала. По всей видимости, необходимо рассматривать оба пути, а возможно, и их взаимное влияние.

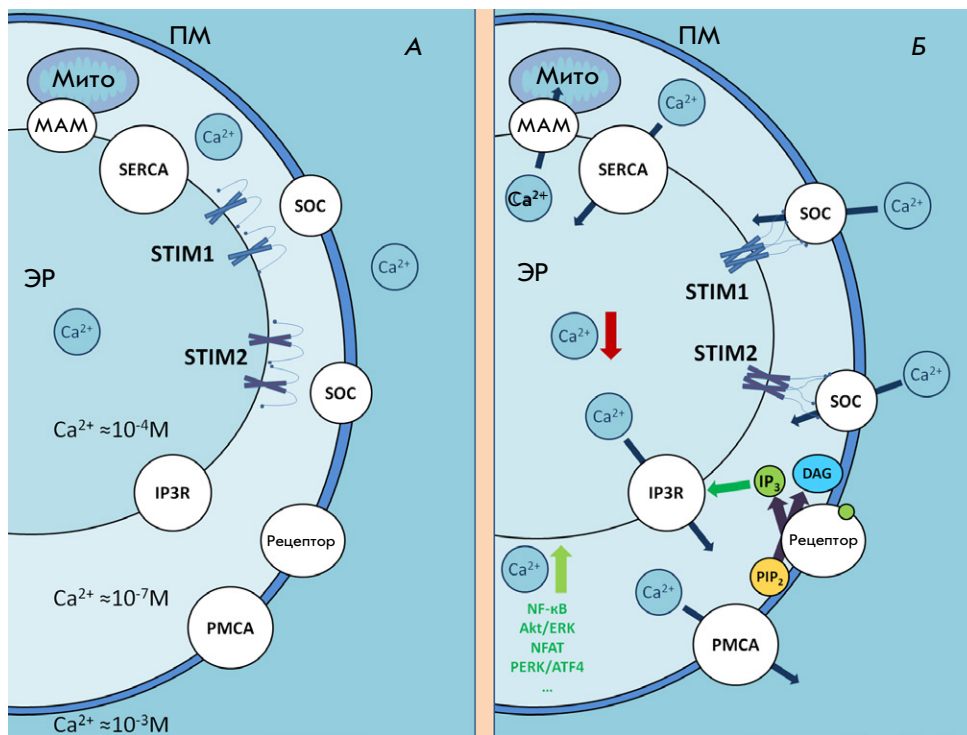


Рис. 1. Схема депо-управляемого входа кальция. А – область близкого контакта плазматической мембраны с мембраной ЭР в состоянии покоя. Б – активация рецепторов плазматической мембраны (ПМ) стимулирует выработку IP_3 и выход кальция из ЭР через рецептор IP_3 . Уменьшение концентрации кальция в депо вызывает кластеризацию, изменение конформации белков STIM и активацию каналов SOC. Кальций, проникающий в клетку, может активировать сигнальные пути, переполнять депо ЭР благодаря работе ATP-азы SERCA, а также снабжать митохондрии (мито) через область контакта мембран МАМ. Излишки кальция выводятся из клетки, в основном ATP-азами PMCA

1.1. Депо-управляемый вход кальция

Депо-управляемые кальциевые каналы (SOC), локализованные в плазматической мембране, представляют собой один из основных путей поступления кальция в невозбудимые клетки и широко распространены в различных типах клеток (рис. 1) [6]. Работа SOC необходима для пополнения запасов кальция в эндоплазматическом ретикулуле (ЭР), а также для передачи большого количества внутриклеточных сигналов [7]. Поступление внеклеточного кальция в клетку в ответ на опустошение внутриклеточных депо определяется как депо-управляемый вход кальция (SOCE). Основными молекулярными компонентами SOCE являются белки STIM и Orai [8], а также некоторые члены семейства TRPC [9–11]. Orai и TRPC формируют кальциевые каналы плазматической мембраны, а STIM представляют собой в основном локализованные в ЭР белки с одним трансмембранным доменом, функционирующие как сенсор концентрации кальция в ЭР [12]. После уменьшения концентрации кальция в ЭР белки STIM меняют конформацию, олигомеризуются, кластеризуются и перемещаются в область близкого контакта между мембраной ЭР и плазматической мембраной, где они взаимодействуют с каналами SOC и активируют их, тем самым опосредуя депо-управляемый вход кальция [13].

У человека экспрессируются два гомолога белка STIM: STIM1 и STIM2. Оба преимущественно локализованы в мембране ЭР, хотя незначи-

тельное количество STIM1 находят на плазматической мембране. Оба STIM имеют схожую структуру с N-концевым кальцийсвязывающим доменом в просвете ЭР, одним трансмембранным сегментом и C-концевым цитоплазматическим доменом, отвечающим за белок-белковые взаимодействия [14]. У позвоночных STIM1 и STIM2 экспрессируются во всех типах клеток и функционируют как сенсоры кальция в просвете ЭР и активаторы SOC. В отличие от STIM1, STIM2 локализуется исключительно в мембране ЭР. Известно, что STIM2 является более слабым активатором Orai1, чем STIM1, и при этом более чувствительным сенсором Ca^{2+} в просвете ЭР. Константа диссоциации STIM2 для Ca^{2+} (500–800 мкМ) существенно выше, чем у STIM1 (200–600 мкМ) [15]. Считается, что основная физиологическая роль STIM2 заключается в стабилизации базального уровня кальция в цитозоле и ЭР [16]. Кроме того, белок STIM2 опосредует разные депо-зависимые и депо-независимые способы активации каналов SOC, а также может ингибировать SOCE за счет продуктов альтернативного сплайсинга [17, 18].

SOCE обладает широкой вариативностью регуляторных механизмов. SOC-каналы плазматической мембраны имеют разные электрофизиологические характеристики, разные механизмы регуляции и восприимчивость к таким факторам, как закисление, гипоксия, активные формы кислорода. Эти каналы активируются белками STIM, имеющими различную чувствительность к кальцию и способность

Таблица 1. Экспрессия генов белков SOCE в линиях клеток рака молочной железы и в контрольных клетках

Клеточная линия	MCF-10A	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468	BT-20	BT-474
Характеристика клеток	фиброзно-кистозная мастопатия	HER2- ER+	TNBC	TNBC	TNBC	HER2+ ER+
Результаты функциональных исследований [29–31]		Orai3 ↑	Orai1 ↑ STIM1 ↑			
Количество белка, нормализованное относительно MCF-10A [32]	Orai1 Orai2	Orai1 ↑ Orai2	Orai1 ↑ Orai2	Orai1 Orai2	Orai1 Orai2 ↑	
Количество белка, нормализованное относительно MCF-10A [33]	Orai3 STIM2 TRPC6	Orai3 ↑ STIM2 TRPC6 ↑	Orai3 STIM2 ↓ TRPC6 ↑	Orai3 ↑ STIM2 TRPC6 ↑	Orai3 ↑ STIM2 TRPC6	
Количество белка [34]		STIM1 STIM2	STIM1 ↑ STIM2 ↓			STIM1 ↓ STIM2 ↑
Количество мРНК [29]		Orai1 ↑ Orai2 Orai3 ↓	Orai1 ↑ Orai2 Orai3 ↓			
Количество белка, нормализованное относительно MCF-10A [30]	STIM1 Orai1 Orai3	STIM1 ↓ Orai1 ↓ Orai3 ↑	STIM1 Orai1 Orai3 ↓		STIM1 ↑ Orai1 Orai3 ↓	STIM1 ↓ Orai1 ↓ Orai3 ↑
Экспрессия гена [35]	TRPC1 ↑	TRPC1	TRPC1 ↑	TRPC1 ↓	TRPC1 ↑	TRPC1 ↓

Примечание. ↑ – увеличение экспрессии, ↓ – уменьшение экспрессии. HER2 – рецептор HER2neo, ER – рецептор эндорфина, TNBC – тройной негативный РМЖ.

к активации Orai [19]. Кроме того, возможно деление каналов на группы, активируемые либо STIM1, либо STIM2 [20]. Еще один, на данный момент слабо изученный уровень регуляции, – разнообразные адаптерные белки и липиды, расположенные в областях контакта плазматической мембраны и эндоплазматического ретикула, например, холестерин, рецептор IP_3 , адаптерные белки Homer или белки цитоскелета [14, 21–23].

Важно отметить, что базальные концентрации кальция в цитозоле и депо ЭР зависят в первую очередь от SOCE и существенно влияют на кальциевую сигнализацию клетки в целом.

Таким образом, существует несколько уровней регуляции и широкие возможности подстройки механизма SOCE под конкретные условия. Имеется ряд единичных сообщений об альтерации в деталях механизма SOCE при опухолевой трансформации.

1.2. Молекулярный состав механизма депо-управляемого входа кальция при раке молочной железы

Опубликован целый ряд сообщений об изменении профиля экспрессии белков, основных участников SOCE, при онкологических заболеваниях, в частности при раке молочной железы (РМЖ) (табл. 1), кишечника [24], простаты [25], желудка [26], шейки матки [27] и полости рта [28].

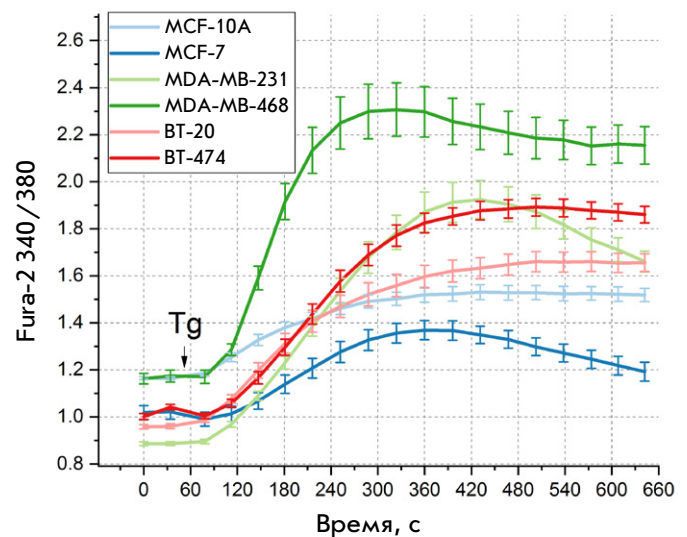


Рис. 2. Tg-индуцированные ответы различных клеточных линий РМЖ в среде, содержащей 2 мМ Ca^{2+} . Стрелкой обозначено время подачи 1 мкМ Tg. Показано отношение флуоресценции Fura-2 (340 и 380 нм), среднее значение и стандартная ошибка среднего ($n = 9–2$)

В табл. 1 представлены данные об экспрессии белков STIM, Orai, TRPC в наиболее хорошо изученных клеточных линиях рака молочной железы.

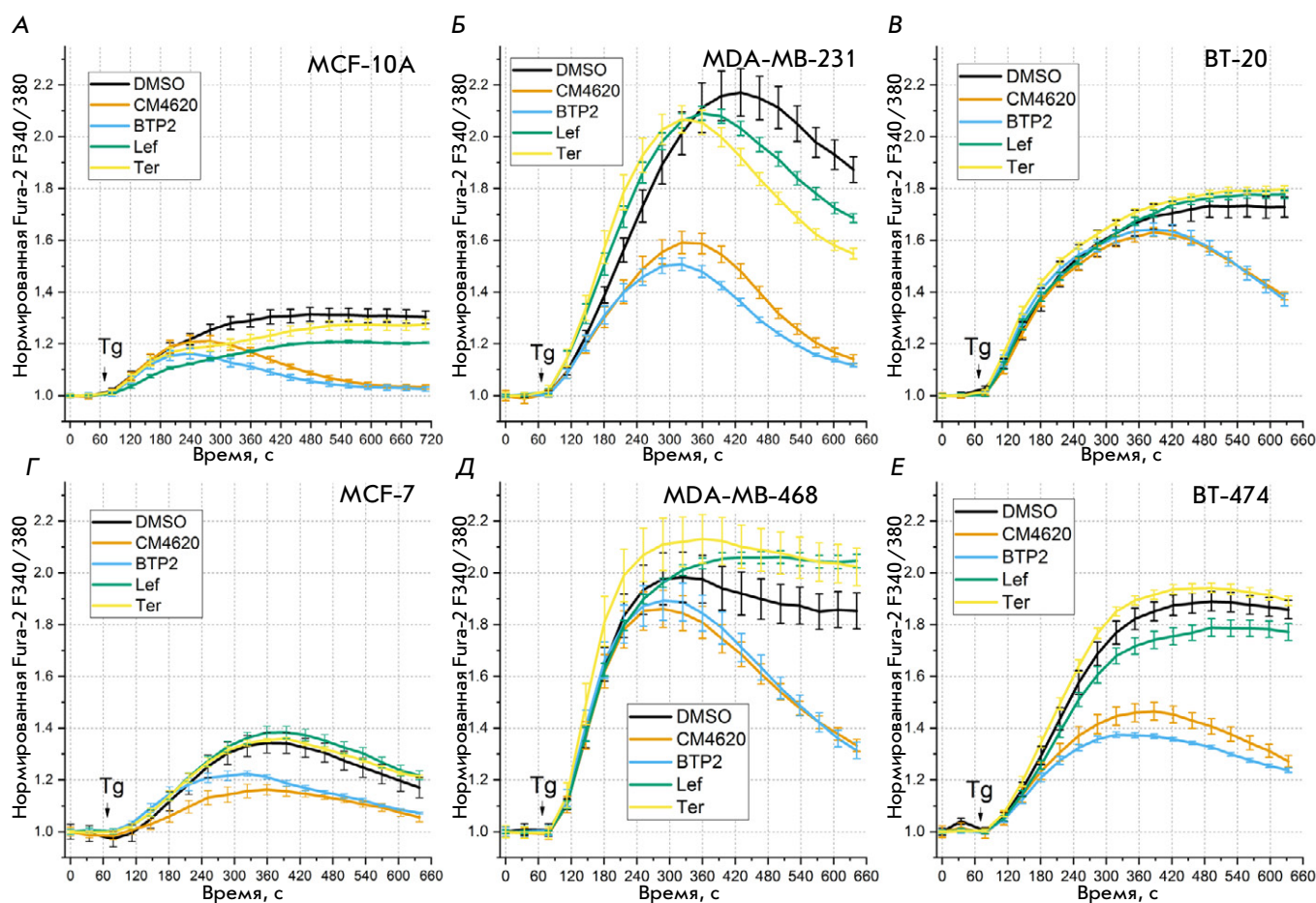


Рис. 3. Измерение амплитуды Tg-индуцированного ответа в среде, содержащей 2 mM Ca^{2+} , после инкубации в течение 25 минут с 0.5% DMSO (контроль), 5 мкМ CM4620 и BTP2, 50 мкМ Лефлуномида (Lef) и Терифлуномида (Ter) в клеточных линиях: А – MCF-10A; Б – MDA-MB-231; В – BT-20; Г – MCF-7; Д – MDA-MB-468 и Е – BT-474. Стрелкой обозначено время подачи 1 мкМ Tg. Показано нормированное на начальный уровень отношение флуоресценции Fura-2 (340 и 380 нм), среднее значение и стандартная ошибка среднего ($n = 9-12$) в зависимости от времени. Адаптировано по [36]

Представленные в табл. 1 данные показывают значительные вариации белкового состава депонуправляемого входа в разных клеточных линиях РМЖ. Более того, различия в экспрессии основных участников SOCE приводят к изменению функциональных особенностей входа кальция в конкретной клеточной линии. Амплитудой кальциевого ответа мы будем называть максимальное изменение внутриклеточной концентрации кальция относительно базальных значений. Как показывают, в том числе и наши исследования, клеточные линии РМЖ имеют разные амплитуды кальциевого ответа и базальный уровень концентрации кальция (рис. 2), разную чувствительность к специфическим (CM4620 и BTP2) и не специфическим (Лефлуномид и Терифлуномид) модуляторам SOCE (рис. 3), к условиям микроокружения ([36] и неопубликованные данные).

На данный момент нет четкого понимания, являются ли эти функциональные изменения причиной патологии или следствием подстройки SOCE к новым условиям микроокружения. Вероятно, возможны оба варианта. Так, например, если клетка при инициации злокачественной трансформации приобретает способность закачивать чуть больше кальция в цитозоль, то это способствует активной пролиферации и инвазии. Либо подстройка кальциевого ответа клеток, возникшая в условиях уже сформированной опухоли, приведет к накоплению максимально адаптированных к данным условиям клеток.

1.3. Физиологические функции депонуправляемого входа кальция при развитии опухолевой трансформации

Известны многочисленные примеры вовлечения основных белков SOCE в регуляцию процессов

пролиферации, миграции, инвазии, эпителиально-мезенхимального перехода, неоангиогенеза, метастазирования клеток опухоли [37–39]. Важно отметить, что изменение количества белка не ведет к запуску определенного сценария трансформации, общего для всех типов клеток. Скорее, мы наблюдаем некую разбалансировку кальциевой сигнализации, распространяющуюся на различные сигнальные пути клетки, например Akt/ERK, NFAT, PERK/ATF4, и приводящую к развитию злокачественной трансформации, индивидуальному для каждого типа опухоли.

В частности, STIM1-опосредованный вход кальция регулирует ангиогенез опухоли при карциноме носоглотки, ассоциированной с вирусом Эпштейна–Барр. Кодированный этим вирусом мембранный белок LMP1 способствует пролиферации, миграции и тубулогенезу, задействуя путь Akt/ERK. Подавление активности STIM1 снижает содержание LMP1 в экзосомах и замедляет образование сосудистой сети, вызванное опухолью [40]. Нокаут STIM1 в MDA-MB-231 и других клеточных линиях РМЖ, независимо от их метастатического потенциала, усиливает миграцию клеток, одновременно снижая экспрессию NFAT1 [41]. Показано, что нокаут Orai3 приводит к изменению экспрессии большого количества генов, влияющих на миграцию и воспалительные/иммунные реакции, в том числе и индуцированных гипоксией: ID1, TREM-1, PGF [42]. При колоректальном раке снижение экспрессии STIM2 активирует сигнальные пути с-Мус и PERK/ATF4, что способствует увеличению размера опухоли, инвазии и метастазированию [43]. Показано и вовлечение SOCE в нарушение клеточного цикла. Комплекс Orai3–STIM2 обеспечивает успешное прохождение митоза клетками рака предстательной железы, избегая митотической катастрофы. Подавление экспрессии Orai3 увеличивает SOCE и вызывает значительное увеличение популяции клеток в фазе G2/M клеточного цикла, что приводит к активации апоптотического пути, опосредованного Bax/Bcl-2 [44]. Белок Orai1 сверхэкспрессируется при В-хроническом лимфолейкозе по сравнению с нормальными В-клетками, что способствует повышению базального уровня Ca^{2+} за счет конститутивной активности каналов SOC. Применение селективных ингибиторов SOCE (GSK-7975a и Synta66) блокирует поступление Ca^{2+} в клетки, что приводит к индукции апоптоза. Кроме того, ингибиторы Orai1 в комбинации с препаратами для лечения В-хронического лимфолейкоза оказывают аддитивный/синергический эффект [45]. В клеточных линиях РМЖ SKBR3 и BT-20 с повышенной экспрессией Orai2 этот канал модулирует активацию NFAT1 и NFAT4 в ответ на приложение

агонистов. Нокдаун Orai2 приводит к остановке клеточного цикла в фазе G0-G1 и снижает устойчивость клеток к апоптозу при лечении цисплатином [32].

Выявлено также влияние белков, формирующих SOCE, на экспрессию ферментов, регулирующих онкогенез. В образцах опухолей пациентов с раком ротовой полости показана повышенная экспрессия Orai1 и, как следствие, повышенный вход Ca^{2+} в эти клетки. Анализ мРНК показал, что Orai1 регулирует многие гены, кодирующие маркеры рака полости рта, в том числе металлопротеазы, регулируемые NFAT4 [46].

Существуют и канцерогенные механизмы, обеспечивающие более активную работу механизма SOCE. Например, в разных подтипах рака молочной железы наблюдается повышенная экспрессия белка EHD2 и CAV1/2. Вероятно, эти белки стабилизируют кавеолы плазматической мембраны и обеспечивают высокую экспрессию на клеточной поверхности Orai1, что приводит к повышенному SOCE, который стимулирует онкогенез [47]. У пациентов с раком простаты белок TSPAN18 защищает STIM1 от TRIM32-опосредованного убиквитинирования. Вследствие этого увеличивается STIM1-опосредованный кальциевый вход, который приводит к усилению метастазирования [48]. Результаты анализа транскриптома показали, что экспрессия гена *NSUN2* при раке желудка значительно повышена. Ген *NSUN2* регулирует стабильность мРНК Orai2 путем модификации 5-метилцитозина, тем самым способствуя экспрессии Orai2 и дальнейшему развитию перитонеального метастазирования рака желудка [49].

Этот далеко не исчерпывающий перечень вовлечения SOCE в опухолевую трансформацию клеток указывает на важность выбора мишени для терапии. Помимо нарушения экспрессии белков SOCE, существуют злокачественные трансформации, непосредственно действующие на функцию SOCE без изменения экспрессии этих белков. Соответственно, для эффективного лечения необходимы средства целевого действия на функцию конкретных белков SOCE в конкретной ситуации. Например, при карциноме носоглотки нужно снижать активность белка STIM1, но при некоторых типах РМЖ этот подход недопустим. Уменьшение активности Orai2 оправдано при терапии как отдельных типов РМЖ, так и рака желудка.

1.4. Связь депо-управляемого входа кальция и митохондрий

Одна из фундаментальных функций кальция, от которой зависит канцерогенез – это регуляция актив-

ности митохондрий опухолевых клеток. ЭР является основным источником кальция для митохондрий, структурная связь между этими органеллами регулируется различными белками, в том числе и кальций-транспортирующими каналами [50].

Стимулируя Ca^{2+} -зависимые дегидрогеназы цикла трикарбоновых кислот, Ca^{2+} повышает выработку АТФ, а также стабилизирует потенциал мембраны митохондрий [51]. Однако при критическом повышении концентрации Ca^{2+} проницаемость внутренней митохондриальной мембраны резко возрастает за счет открытия неселективной поры [50], что приводит к нарушению работы дыхательной цепи, гидролизу АТФ и осмотическому набуханию и, в конечном счете, к высвобождению апоптогенных молекул и гибели клетки [52].

Таким образом, выработка АТФ, биосинтез фосфолипидов и стероидных гормонов, передача кальциевых сигналов, окисление различных метаболитов опухолевых клеток зависят от работы митохондрий, которая регулируется, в том числе и кальцием. В условиях канцерогенеза количество кальция, поступающего в клетку, зависит как от внутренних факторов, например, от экспрессии генов, кодирующих белки SOCE, так и от факторов микроокружения опухоли. Если количество поступающего кальция будет недостаточным, клетки опухоли не получат необходимой для жизнедеятельности энергии. Слишком большой объем входящего кальция приведет к гибели клеток опухоли. Все это вынуждает клетку регулировать приток кальция в постоянно меняющемся микроокружении. Далее мы рассмотрим влияние на SOCE таких факторов микроокружения опухоли, как активные формы кислорода, закисление, гипоксия.

2. ДЕЙСТВИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД

АФК представляют собой группу молекул, которые образуются в результате частичного восстановления O_2 и обладают высокой реакционной способностью [53]. Внутриклеточным источником АФК являются митохондрии, производящие их во время синтеза АТФ [54]. Например, обнаружено повышение уровня АФК в клетках трижды негативного рака молочной железы, вызванное работой митохондрий, показана важность АФК для выживания этих клеток, поскольку обработка антиоксидантами индуцировала их гибель [55].

АФК долгое время считали вредными для клеток, вызывающими окислительное повреждение различных молекул, таких как белки, липиды и ДНК. Однако умеренные уровни АФК важны для физиологических клеточных функций, включая внутри-

клеточную передачу сигналов, пролиферацию и иммунные реакции [56]. Для контроля баланса между производством и элиминацией АФК в клетке существует ряд защитных механизмов [57].

В опухоли и ее окружении найдено большое количество источников АФК. Показано, что раковые клетки могут индуцировать патологически повышенное количество АФК [58]. Активация онкогенов, потеря опухолевых генов-супрессоров, гипоксия, а также мутации митохондриальной ДНК могут привести к повышению уровня АФК в опухолевых клетках [59]. Окружение опухоли включает клетки нескольких типов, которые рекрутируются при образовании опухоли, такие как нейтрофилы, Т-клетки, макрофаги и фибробласты. Показано, что воздействие таких цитокинов, как интерферон- γ (IFN γ), фактор некроза опухолей- α (TNF α) и интерлейкин-1 (IL-1), увеличивает продукцию АФК самими клетками различных типов опухолей [60].

В целом, низкие уровни АФК, по-видимому, полезны для опухолевых клеток, они могут поддерживать их пролиферативные и инвазивные свойства, но при превышении определенного порога АФК могут стать для них токсичными. Видимо, опухолевые клетки могут проявлять адаптивное поведение, чтобы справляться с различными стадиями повышения уровня АФК, иначе говоря, индуцировать либо прооксидантные, либо антиоксидантные механизмы [53].

2.1. Влияние активных форм кислорода на элементы депо-управляемого входа кальция

Один из вероятных механизмов адаптации клетки к измененным уровням АФК – адаптация SOCE. В частности, АФК модулирует функцию каналов Orai, тем самым модулируя кальциевый ответ, что имеет большое значение для роста опухоли. Показано, что эндогенные и сверхэкспрессированные каналы Orai1 ингибируются H_2O_2 с $\text{IC}_{50} = 34$ мкм [61]. Это же обнаружено для каналов Orai2. Напротив, каналы Orai3 не ингибировались H_2O_2 , что указывает на чувствительность Orai1 и Orai2, но не Orai3, к АФК [61].

Основными мишенями АФК в Orai1 и Orai2 являются остатки цистеина [62]. В молекуле Orai3 цистеин-195 заменен глицином, что придает частичную устойчивость к H_2O_2 . Учитывая различия в чувствительности к АФК между Orai1, Orai2 и Orai3, соотношение между изоформами в клетке может быть фактором, адаптирующим кальциевую сигнализацию к повышению уровней АФК.

Подобные процессы наблюдаются в клетках иммунной системы. Например, увеличение соотношения Orai3/Orai1 наблюдалось в моноцитах, которые убивают бактерии за счет быстрой секреции H_2O_2 ,

поэтому переход на менее чувствительные к АФК каналы Orai3 эффективен для адаптации моноцитов к собственным АФК [63]. Для первичных CD4+ Т-клеток человека показано, что наивные клетки увеличивают отношение экспрессируемых Orai3/Orai1 при дифференцировке в эффекторные клетки, существующие в области воспаления, где повышена концентрация АФК [61].

Не только в иммунных, но и в раковых клетках изменяется соотношение экспрессируемых белков Orai и тем самым зависимость депо-управляемого входа кальция от АФК (табл. 1). Например, в клетках рака предстательной железы [64] и базального рака молочной железы [42] снижено соотношение Orai3/Orai1. Однако существуют данные о повышенном соотношении Orai3/Orai1 при раке предстательной железы [65], а также при раке молочной железы, положительном по рецептору эстрогена [30, 42, 66] и при небазальном раке молочной железы [42]. По-видимому, разнонаправленность изменений экспрессии каналов Orai в опухолевых клетках вызвана реакцией не только на АФК, но и на другие внутренние и внешние факторы, присутствующие в микроокружении опухоли.

Как обсуждалось выше, STIM1 и STIM2 различаются по своей чувствительности к уровню кальция в депо и по способности активировать каналы Orai, а кроме того, в их последовательности присутствуют различные остатки цистеина, чувствительные к окислению. STIM1 содержит остатки цистеина в положениях 49 и 56, которые могут образовывать дисульфидную связь между собой в присутствии АФК [67]. Поскольку цистеин 56 расположен рядом с Ca^{2+} -связывающим доменом STIM1, то, вероятно, это переводит белок в конститутивно активную форму, активирующую SOCE независимо от уровня кальция в ЭР [68]. Любопытно, что обратная картина наблюдается при исследовании последствий окисления этих цистеинов активными формами азота. S-нитрозилирование цистеинов C49 и C56 в STIM1 повышает термодинамическую стабильность его кальцийсвязывающего домена, что снижает чувствительность к наличию кальция и приводит к подавлению SOCE [69].

Белок STIM2, в отличие от STIM1, имеет 10 дополнительных остатков цистеина в цитозольном домене. Один из этих цистеинов, специфичных для STIM2, важен в контексте окислительно-восстановительной регуляции SOCE. Окисление цистеина C313 ингибирует SOCE, в основном препятствуя кластеризации STIM2, но не влияет на взаимодействие STIM2 с Orai1 [70].

Таким образом, оба белка STIM чувствительны к окислению АФК, но с существенными особенностями:

STIM1 модулируется АФК в просвете ЭР, а STIM2 ингибируется АФК, находящимися в цитозоле.

2.2. Адаптация депо-управляемого входа к окислительному стрессу

Найдены механизмы, изменяющие экспрессию белков SOCE в условиях окислительного стресса. Имитация 24-часового окислительного стресса в клетках астроглиомы крысы приводит к снижению экспрессии STIM2, Orai1 и Orai3 и снижению агонист-индуцированного кальциевого ответа. Но амплитуда SOCE и заполненность депо остаются при этом практически неизменными [71].

SOCE в большой степени подвержен действию АФК. Достаточно высокие концентрации АФК существенно и неизбирательно влияют на фундаментальные механизмы, поддерживающие кальциевый гомеостаз клетки. В случае адаптации к невысоким концентрациям АФК у клетки, по-видимому, есть пространство для маневра с помощью экспрессии различных изоформ каналов Orai.

3. ВОСПРИИМЧИВОСТЬ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА К ИЗМЕНЕНИЮ pH

Нарушение регуляции pH является общей характеристикой клеток солидных опухолей. В большинстве случаев в таких клетках повышен внутриклеточный pH (7.3–7.6 относительно нормального 7.2) и снижены значения внеклеточного pH (6.8–7.0 относительно нормального 7.4) по сравнению с нетрансформированными клетками [72]. Повышенная гликолитическая активность клеток солидных опухолей приводит к увеличению количества лактата, протонов и угольной кислоты во внеклеточной среде, вызывая закисление в микроокружении опухоли [73]. Закисление, как и гипоксия, способствует лекарственной устойчивости опухоли и иммуносупрессии в микроокружении опухоли [74].

3.1. Влияние изменения pH на элементы депо-управляемого входа

Изменение уровней pH сказывается и на функционировании многочисленных ионных каналов клетки [75]. Влияние изменения внеклеточного и внутриклеточного pH на активность изоформ Orai изучено достаточно хорошо. Электрофизиологическими методами показано, что изменение pH регулирует как эндогенный SOCE, так и SOCE в клетках HEK293, экспрессирующих экзогенные белки STIM1/2 и Orai1/2/3. Оказалось, что внешнее подкисление ингибирует, а подщелачивание потенцирует SOCE. Аналогично внутреннее подкисление уменьшает активацию SOCE, в то время как под-

щелачивание ускоряет кинетику его активации, не влияя на общую амплитуду тока [76]. Детальные исследования показали, что амплитуда и кинетика тока через Orai1 сильно зависят от внутриклеточного pH. Зависимость тока через Orai2 от внутриклеточного pH выражается только в изменении амплитуды. Канал Orai3 вообще не зависит от величины внутриклеточного pH [77]. Скорее всего, внутри- и внеклеточный pH регулирует активность каналов Orai посредством разных механизмов. Внешний pH, по-видимому, модулирует SOCE через воздействие на пору канала Orai, а внутриклеточный pH может влиять на агрегацию и связывание STIM с Orai в нескольких чувствительных к закислению либо к защелачиванию участках. Например, мутация Orai H155F заметно снижает реакцию на кислые и щелочные значения внутриклеточного pH [78].

Поскольку аминокислоты E106, E190 и H115 консервативны у всех трех изоформ Orai, можно предположить, что они являются общими внешними сенсорами кислых pH во всех изоформах Orai. При внешнем защелачивании амплитуда тока через все Orai увеличивается, причем у Orai2 в большей степени, чем у Orai1, и в меньшей степени, чем у Orai3. Вероятно, существуют дополнительные механизмы чувствительности этих каналов к высоким значениям pH [76, 78].

Интересно, что STIM1-независимый мутант Orai1 обладает сниженной чувствительностью к внутриклеточному подщелачиванию и подкислению [77]. Этот факт может говорить о том, что регуляция SOCE в условиях изменения внутриклеточного pH осуществляется и на уровне белков STIM.

Влияние внешнего pH на другие компоненты кальциевого ответа изучено недостаточно. Известно, что канал TRPC6, который может принимать участие в SOCE, ингибируется при кислых значениях pH [79]. В ближайшие годы можно ожидать рост числа исследований, посвященных pH-зависимому функционированию белков, участников кальциевого сигнального процесса.

3.2. Адаптация депо-управляемого входа к изменению pH

Влияют ли изменения pH на экспрессию белков SOCE в опухолевых клетках пока не установлено, но показано, что pH влияет на их кластеризацию. В клетках мышц формируются особые кластеры из белков, осуществляющих SOCE, которые называются Calcium Entry Units (CEU). Сборка функциональных CEU, включающих белки STIM и Orai, более интенсивна при повышенной температуре и сниженных значениях pH, то есть при интенсивной работе мышц [80]. Возможно, сборка кластеров

– это дополнительный механизм адаптации SOCE к меняющемуся микроокружению более высокого порядка, чем взаимодействие STIM и Orai. И этот механизм позволяет при кратковременном закислении не уменьшать поток внеклеточного кальция, необходимого для работы мышц.

Таким образом, в условиях кислого микроокружения кальциевой перегрузке раковых клеток препятствуют каналы Orai и, возможно, TRPC6, что обусловлено их чувствительностью к внешнему закислению и уменьшению проводимости при низких значениях pH. При закислении внутренней среды клетки подключаются дополнительные механизмы регуляции SOCE на уровне взаимодействия белков STIM и Orai и возможность выбора между изоформами Orai.

4. ДЕЙСТВИЕ ГИПОКСИИ НА ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ

Гипоксия является существенным фактором микроокружения опухоли, тесно связанным с пролиферацией клеток, метаболизмом, ангиогенезом и иммунным ответом. Зачастую эти процессы способствуют прогрессированию опухоли и усиливают ее метастатический потенциал, в том числе и за счет действия гипоксии на элементы кальциевой сигнализации клетки [81].

4.1. Влияние гипоксии на элементы депо-управляемого входа

Применительно к SOCE условия гипоксии способствуют опустошению кальциевых депо ЭР и повышению концентрации кальция в цитозоле за счет двух связанных между собой механизмов: уменьшения количества АТФ в клетке и выработки низких уровней АФК.

Гипоксия может вызывать активацию STIM1, вероятно, в результате снижения уровня АТФ и снижения закачки Ca^{2+} в депо [82]. Гипоксия может также вызвать истощение кальциевых депо путем продукции низких уровней АФК, а не снижения уровня АТФ [83]. Опустошение депо вызывает активацию SOCE, которая в дальнейшем ослабляется закислением, вызванным гипоксией.

Известно, что при гипоксии происходит быстрое закисление многих типов клеток, включая гладкомышечные, сердечные, опухолевые и нервные клетки [84, 85]. Клетки большинства типов опухолей в условиях длительной гипоксии характеризуются высокой скоростью гликолиза и повышенной продукцией метаболитических кислот [86].

Нами показано существенное ингибирование кальциевого ответа в условиях кратковременной гипоксии в клетках MCF-7 и BT-474 РМЖ, имею-

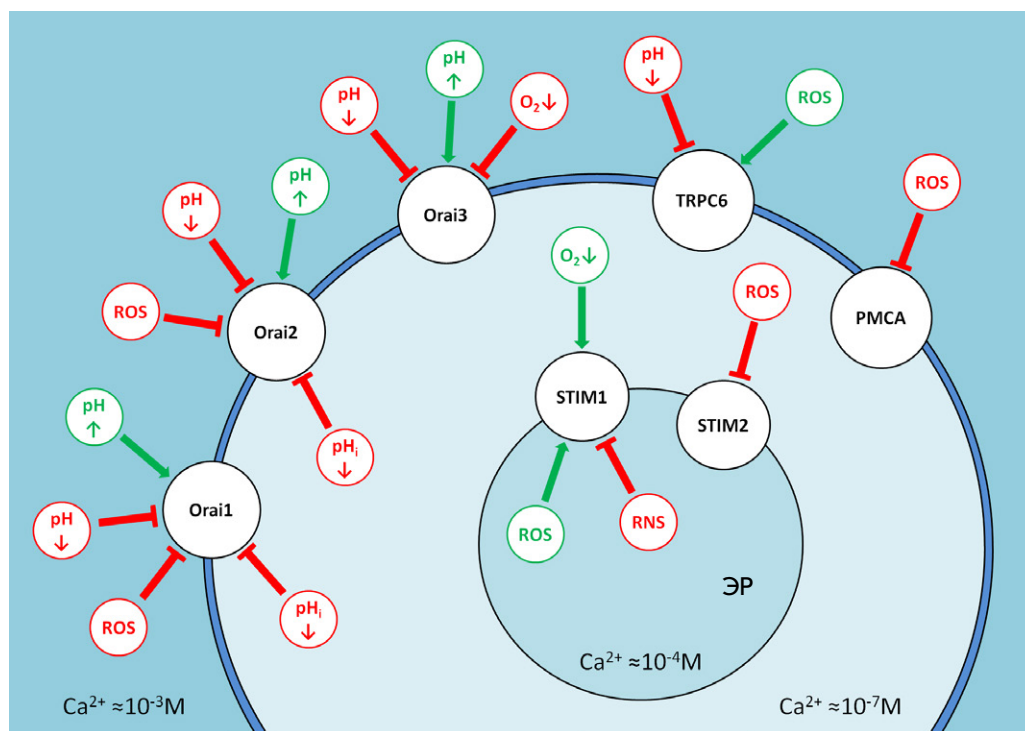


Рис. 4. Схема влияния элементов микроокружения опухоли на депо-управляемый вход кальция. Отмечены приблизительные концентрации кальция в клетке, ЭР и во внеклеточном пространстве. Основные белки SOCE обозначены черным цветом. Зеленым показана активация, красным — ингибирующее действие соответствующих факторов микроокружения

щих повышенное содержание Orai3 (табл. 1) [36]. Напротив, повышенный кальциевый ответ в условиях кратковременной гипоксии наблюдается в клетках MDA-MB-231 и BT-20 со пониженным содержанием Orai3 [30, 36]. Таким образом, устойчивость клеток к кальциевой перегрузке в условиях гипоксии зависит от количества Orai3 в общей структуре SOCE. С другой стороны, гипоксия вызывает повышенную экспрессию белка Orai3 [42]. Исходя из приведенных выше данных, можно заключить, что в условиях долговременной гипоксии в клетках РМЖ может изменяться экспрессия белков Orai в сторону увеличения Orai3.

4.2. Адаптация депо-управляемого входа к гипоксии

В условиях гипоксии во многих опухолевых клетках повышаются уровни экспрессии Orai3: РМЖ HCC1569, MDA-MB-231, MCF-7 и PMC42LA, в клетках рака толстой кишки HT29 и клетках рака предстательной железы Du145. Кроме того, на клеточных линиях РМЖ показано, что изменение уровней экспрессии Orai3 является не причиной изменения внутриклеточной сигнализации, а ответом на условия долговременной гипоксии [42].

Еще один предполагаемый участник ответа на гипоксию в раковых клетках — канал TRPC1 [11]. Экспрессия TRPC1 увеличивается в условиях гипоксии в клеточных линиях рака молочной железы MDA-MB-231, MDA-MB-468 и HCC1569, но уровни

экспрессии гомологичного белка TRPC3 остаются без существенных изменений [35]. Интересно, что подавление экспрессии TRPC1 в клетках MDA-MB-231 и MDA-MB-468 вызывало увеличение амплитуды SOCE. Этот факт косвенно свидетельствует о том, что повышение экспрессии TRPC1 приведет к уменьшению амплитуды SOCE [35, 87]. В таком случае канал TRPC1, как и Orai3, вовлечен в защитный механизм клетки в условиях гипоксии.

Таким образом, при гипоксии наблюдается сочетанное действие нескольких факторов, нарушающих кальциевый баланс клетки, в том числе закисление и выработку АФК. Каналы TRPC1 и Orai3 способны в некоторой степени противостоять этим негативным факторам.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кальций играет важную роль в процессах онкогенеза за счет своей сигнальной функции, а также за счет обеспечения работы митохондрий [38, 39]. В адаптацию клеток опухоли к сложным условиям микроокружения вовлечены различные механизмы кальциевой сигнализации (рис. 4).

При повышении концентрации АФК Orai3 обеспечивает функционирование SOCE, при этом ингибирование STIM2 препятствует кальциевой перегрузке клетки. При кислых внеклеточных и внутриклеточных pH все каналы Orai снижают свою проводимость, кроме Orai3, который не зависит от внутриклеточного pH.

Помимо свойств собственно белков SOCE происходит и изменение их экспрессии при стрессовых состояниях. При окислительном стрессе наблюдается снижение экспрессии белков STIM2, Orai1 и Orai3, а гипоксия способствует увеличению экспрессии белков TRPC1 и Orai3. Причина изменения уровней экспрессии каналов в каждом случае индивидуальна – адаптация или же следствие канцерогенеза, но результат этих изменений – не дестабилизация кальциевой сигнализации в опухоли, а наоборот, нормализация текущего микроокружения. Следовательно, снижение возможности адаптации для раковых клеток повышает эффективность противоопухолевой терапии, а также имеет самостоятельный лечебный эффект.

Многие элементы SOCE рассматриваются как мишени для терапии опухолей [26, 88]. Существуют определенные сложности, связанные с недостаточным выбором селективных модуляторов SOCE. На данный момент количество возможных мишеней существенно превосходит количество имеющихся модуляторов. К сожалению, селективные модуляторы большинства белков-участников SOCE отсутствуют. Например, канал Orai3 играет важную роль в адаптации раковых клеток к изменению pH микроокружения, гипоксии и повышенному содержанию АФК. Однако на данный момент селективные модуляторы этого канала не выявлены. А между тем, для терапии представляют интерес как активаторы этого канала, которые приведут к кальциевой перегрузке раковых клеток с повышенной экспрессией Orai3, так и ингибиторы, нарушающие общий кальциевый гомеостаз этих кле-

ток. Существующие селективные ингибиторы SOCE действуют на магистральный путь входа кальция через белки STIM1-Orai1, что приводит к высокой токсичности этих ингибиторов для организма [89]. Их применение возможно лишь после решения проблемы таргетной доставки, иначе системный вред от назначения перевешивает потенциальный терапевтический эффект. Ситуация немного лучше при терапии аутоиммунных заболеваний, где селективный блокатор Orai1 Auhora (второе название CM4620) имеет терапевтический эффект, но на фоне тяжелых побочных эффектов [90]. Для снижения системного токсичного действия на организм в качестве мишени необходимо выбирать минорные участники SOCE, например белки STIM2, TRPC1, многочисленные адаптерные белки: SARAF, a-SNAP, STIMATE, Juncate, IRE1 и т.д. [23]. Ранее нами был обнаружен модулятор STIM2-зависимого сигнального пути – низкомолекулярное соединение 4-MPTC, которое оказывает ингибирующий эффект на SOCE через STIM2-зависимый путь поступления кальция, но не подавляет вход кальция через STIM1-зависимый путь. Мишень этого соединения еще не выявлена [91].

Большее количество селективных модуляторов позволит тонко влиять на SOCE, повысить вариативность и снизить побочные эффекты терапии, а также перейти к персонализированной медицине. ●

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1075) и грантом РНФ 23-44-00054.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Califano A., Alvarez M.J. // Nat. Rev. Cancer. 2017. V. 17. № 2. P. 116–130. doi:10.1038/nrc.2016.124
- Xing Y., Zhao S., Zhou B.P., Mi J. // FEBS J. 2015. V. 282. № 20. P. 3892–3898. doi:10.1111/febs.13402
- Patergnani S., Danese A., Bouhamida E., Aguiari G., Previati M., Pinton P., Giorgi C. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 21. P. 1–27. doi: 10.3390/ijms21218323
- Nieto-Felipe J., Macias-Diaz A., Sanchez-Collado J., Berna-Erro A., Jardin I., Salido G.M., Lopez J.J., Rosado J.A. // J. Cell. Physiol. 2023. V. 238. № 4. P. 714–726. doi:10.1002/jcp.30971
- Benson J.C., Trebak M. // Cell Calcium. 2023. V. 111. P. 102716. doi:10.1016/J.CECA.2023.102716
- Soboloff J., Rothberg B.S., Madesh M., Gill D.L. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2012. V. 13. № 9. P. 549–565. doi:10.1038/nrm3414
- Smyth J.T., Hwang S.Y., Tomita T., DeHaven W.I., Mercer J.C., Putney J.W. // J. Cell. Mol. Med. 2010. V. 14. № 10. P. 2337–2349. doi:10.1111/J.1582-4934.2010.01168.X
- Prakriya M. // Curr. Top. Membr. 2013. V. 71. P. 1–32. doi:10.1016/B978-0-12-407870-3.00001-9
- Kaznacheyeva E., Glushankova L., Bugaj V., Zimina O., Skopin A., Alexeenko V., Tsiokas L., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 32. P. 23655–23662. doi:10.1074/jbc.M608378200
- Bugaj V., Alexeenko V., Zubov A., Glushankova L., Nikolaev A., Wang Z., Kaznacheyeva E., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 17. P. 16790–16797. doi:10.1074/jbc.M500192200
- Skopin A., Shalygin A., Vigont V., Zimina O., Glushankova L., Mozhayeva G.N., Kaznacheyeva E. // Biochimie. 2013. V. 95. № 2. P. 347–353. doi:10.1016/j.biochi.2012.10.004
- Liou J., Kim M.L., Heo W.D., Jones J.T., Myers J.W., Ferrell J.E., Meyer T. // Curr. Biol. 2005. V. 15. № 13. P. 1235–1241. doi:10.1016/j.cub.2005.05.055
- Prakriya M., Feske S., Gwack Y., Srikanth S., Rao A., Hogan P.G. // Nature. 2006. V. 443. № 7108. P. 230–233. doi:10.1038/nature05122
- Sallinger M., Grabmayr H., Humer C., Bonhenry D., Romanin C., Schindl R., Derler I. // J. Physiol. 2024. V. 602. P. 1475–1507. doi:10.1113/JP283828
- Enomoto M., Nishikawa T., Back S.I., Ishiyama N., Zheng L., Stathopoulos P.B., Ikura M. // J. Mol. Biol. 2020. V. 432.

- № 2. P. 367–383. doi:10.1016/J.JMB.2019.10.003
16. Brandman O., Liou J., Park W.S., Meyer T. // *Cell*. 2007. V. 131. № 7. P. 1327–1339. doi:10.1016/j.cell.2007.11.039
 17. Ong H.L., De Souza L.B., Zheng C., Cheng K.T., Liu X., Goldsmith C.M., Feske S., Ambudkar I.S. // *Sci. Signal*. 2015. V. 8. № 359. P. ra3. doi:10.1126/scisignal.2005748
 18. Rana A., Yen M., Sadaghiani A.M., Malmersjö S., Park C.Y., Dolmetsch R.E., Lewis R.S. // *J. Cell Biol*. 2015. V. 209. № 5. P. 653–670. doi:10.1083/jcb.201412060
 19. Lunz V., Romanin C., Frischauf I. // *Cell Calcium*. 2019. V. 77. P. 29–38. doi:10.1016/J.CECA.2018.11.009
 20. Shalygin A., Skopin A., Kalinina V., Zimina O., Glushankova L., Mozhayeva G.N., Kaznacheyeva E. // *J. Biol. Chem*. 2015. V. 290. № 8. P. 4717–4727. doi:10.1074/jbc.M114.601856
 21. Ahmad M., Narayanasamy S., Ong H.L., Ambudkar I. // *Biomolecules*. 2022. V. 12. № 8. P. 1152. doi:10.3390/BIOM12081152
 22. Nikolaev A.V., Skopin A.Y., Kaznacheyeva E.V. // *Biol. Membr*. 2004. V. 21. № 6. P. 451–457.
 23. Berlansky S., Humer C., Sallinger M., Frischauf I. // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. V. 22. № 1. P. 1–29. doi:10.3390/IJMS22010471
 24. Kang Q., Peng X., Li X., Hu D., Wen G., Wei Z., Yuan B. // *Front. Oncol*. 2021. V. 11. P. 649476. doi:10.3389/FONC.2021.649476
 25. Perrouin Verbe M.A., Bruyere F., Rozet F., Vandier C., Fromont G. // *Hum. Pathol*. 2016. V. 49. P. 77–82. doi: 10.1016/j.humpath.2015.09.042
 26. Chang Y., Roy S., Pan Z. // *Front. Pharmacol*. 2021. V. 12. P. 668730. doi:10.3389/FPHAR.2021.668730
 27. Pan Y., Huang J., Liu K., Xie C., Chen H., Guo Z., Guo S., Chen Y. // *Front. Mol. Biosci*. 2022. V. 9. P. 1041674. doi: 10.3389/fmolb.2022.1041674
 28. Nguyen A., Sung Y., Lee S.H., Martin C.E., Srikanth S., Chen W., Kang M.K., Kim R.H., Park N.H., Gwack Y., et al. // *Cells*. 2023. V. 12. № 18. P. 2225. doi:10.3390/cells12182225
 29. McAndrew D., Grice D.M., Peters A.A., Davis F.M., Stewart T., Rice M., Smart C.E., Brown M.A., Kenny P.A., Roberts-Thomson S.J., et al. // *Mol. Cancer Ther*. 2011. V. 10. № 3. P. 448–460. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0923
 30. Motiani R.K., Abdullaev I.F., Trebak M. // *J. Biol. Chem*. 2010. V. 285. № 25. P. 19173–19183. doi: 10.1074/jbc.M110.102582
 31. Yang S., Zhang J.J., Huang X.Y. // *Cancer Cell*. 2009. V. 15. № 2. P. 124–134. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.019
 32. Sanchez-Collado J., Lopez J.J., Cantonero C., Jardin I., Regodón S., Redondo P.C., Gordillo J., Smani T., Salido G.M., Rosado J.A. // *Cancers (Basel)*. 2021. V. 14. № 1. P. 114. doi:10.3390/cancers14010114
 33. Sanchez-Collado J., Lopez J.J., Gonzalez-Gutierrez L., Cantonero C., Jardin I., Salido G.M., Rosado J.A. // *Biochem. J*. 2020. V. 477. № 17. P. 3183–3197. doi:10.1042/BCJ20200560
 34. Miao Y., Shen Q., Zhang S., Huang H., Meng X., Zheng X., Yao Z., He Z., Lu S., Cai C., et al. // *Breast Cancer Res*. 2019. V. 21. № 1. P. 99. doi:10.1186/s13058-019-1185-1
 35. Azimi I., Milevskiy M.J.G., Kaemmerer E., Turner D., Yapa K.T.D.S., Brown M.A., Thompson E.W., Roberts-Thomson S.J., Monteith G.R. // *J. Cell Sci*. 2017. V. 130. № 14. P. 2292–2305. doi:10.1242/jcs.196659
 36. Skopin A.Y., Glushankova L.N., Gusev K.O., Kaznacheyeva E.V. // *Life (Basel, Switzerland)*. 2024. V. 14. № 3. P. 357. doi:10.3390/LIFE14030357
 37. Umemura M., Nakakaji R., Ishikawa Y. // *J. Physiol. Sci*. 2023. V. 73. № 1. P. 21. doi:10.1186/S12576-023-00878-0
 38. Panda S., Chatterjee O., Roy L., Chatterjee S. // *Drug Discov. Today*. 2022. V. 27. № 3. P. 923–934. doi:10.1016/J.DRUDIS.2021.11.012
 39. Gross S., Mallu P., Joshi H., Schultz B., Go C., Soboloff J. // *Advances Cancer Res*. 2020. V. 148. P. 233–317. doi:10.1016/bs.acr.2020.05.003
 40. Deng Y., Liu X., Huang Y., Ye J., He Q., Luo Y., Chen Y., Li Q., Lin Y., Liang R., et al. // *Cell. Oncol. (Dordr)*. 2023. V. 46. № 4. P. 987–1000. doi:10.1007/S13402-023-00790-0
 41. Hammad A.S., Yu F., Al-Hamaq J., Horgen F.D., Machaca K. // *Cell Calcium*. 2023. V. 114. P. 102779. doi:10.1016/J.CECA.2023.102779
 42. Azimi I., Milevskiy M.J.G., Chalmers S.B., Yapa K.T.D.S., Robitaille M., Henry C., Baillie G.J., Thompson E.W., Roberts-Thomson S.J., Monteith G.R. // *Cancers*. 2019. V. 11. № 2. P. 208. doi:10.3390/CANCERS11020208
 43. Pathak T., Benson J.C., Johnson M.T., Xin P., Abdelnaby A.E., Walter V., Koltun W.A., Yochum G.S., Hempel N., Trebak M. // *bioRxiv Prepr. Serv. Biol*. 2023. V. 10. № 02. P. 560521. doi:10.1101/2023.10.02.560521. Preprint.
 44. Kouba S., Buscaglia P., Guéguinou M., Ibrahim S., Félix R., Guibon R., Fromont G., Pigat N., Capiod T., Vandier C., et al. // *Cell Calcium*. 2023. V. 115. P. 102794. doi:10.1016/J.CECA.2023.102794
 45. Scaviner J., Bagacean C., Christian B., Renaudineau Y., Mignen O., Abdoul-Azize S. // *Eur. J. Pharmacol*. 2024. V. 971. P. 176515. doi:10.1016/J.EJPHAR.2024.176515
 46. Son G.Y., Tu N.H., Santi M.D., Lopez S.L., Souza Bomfim G.H., Vinu M., Zhou F., Chaloeitoem A., Alhariri R., Idaghdour Y., et al. // *Sci. Signal*. 2023. V. 16. № 801. P. ead9535. doi:10.1126/SCISIGNAL.ADF9535
 47. Luan H., Bielecki T.A., Mohapatra B.C., Islam N., Mushtaq I., Bhat A.M., Mirza S., Chakraborty S., Raza M., Storck M.D., et al. // *Elife*. 2023. V. 12. P. e81288. doi:10.7554/ELIFE.81288
 48. Zhou Q., Chen X., Yao K., Zhang Y., He H., Huang H., Chen H., Peng S., Huang M., Cheng L., et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2023. V. 42. № 1. P. 195. doi:10.1186/S13046-023-02764-4
 49. Liu K., Xu P., Lv J., Ge H., Yan Z., Huang S., Li B., Xu H., Yang L., Xu Z., et al. // *Oncogene*. 2023. V. 42. № 24. P. 1980–1993. doi:10.1038/S41388-023-02707-5
 50. Garbincius J.F., Elrod J.W. // *Physiol. Rev*. 2022. V. 102. № 2. P. 893. doi:10.1152/PHYSREV.00041.2020
 51. Wescott A.P., Kao J.P.Y., Lederer W.J., Boyman L. // *Nat. Metab*. 2019. V. 1. № 10. P. 975. doi:10.1038/S42255-019-0126-8
 52. Madreiter-Sokolowski C.T., Sokolowski A.A., Graier W.F. // *Nutrients*. 2017. V. 9. № 10. P. 1117. doi:10.3390/NU9101117
 53. Helfinger V., Schröder K. // *Mol. Aspects Med*. 2018. V. 63. P. 88–98. doi:10.1016/J.MAM.2018.02.003
 54. Brand M.D. // *Free Radic. Biol. Med*. 2016. V. 100. P. 14–31. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.04.001
 55. Sarmiento-Salinas F.L., Delgado-Magallón A., Montes-Alvarado J.B., Ramírez-Ramírez D., Flores-Alonso J.C., Cortés-Hernández P., Reyes-Leyva J., Herrera-Camacho I., Anaya-Ruiz M., Pelayo R., et al. // *Front. Oncol*. 2019. V. 9. № JUN. P. 480. doi:10.3389/FONC.2019.00480/BIBTEX
 56. Martínez-Reyes I., Diebold L.P., Kong H., Schieber M., Huang H., Hensley C.T., Mehta M.M., Wang T., Santos J.H., Woychik R., et al. // *Mol. Cell*. 2016. V. 61. № 2. P. 199–209. doi:10.1016/j.molcel.2015.12.002
 57. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. // *Cell. Signal*. 2012. V. 24. № 5. P. 981–990. doi:10.1016/J.CELLSIG.2012.01.008
 58. Schumacker P.T. // *Cancer Cell*. 2006. V. 10. № 3. P. 175–176. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.015
 59. Sullivan L.B., Chandel N.S. // *Cancer Metab*. 2014. V. 2. № 17. doi: 10.1186/2049-3002-2-17
 60. Liou G.Y., Storz P. // *Free Radical Research*. 2010. V. 44. № 5. P. 479–496. doi:10.3109/10715761003667554

61. Bogeski I., Kummerow C., Al-Ansary D., Schwarz E.C., Koehler R., Kozai D., Takahashi N., Peinelt C., Griesemer D., Bozem M., et al. // *Sci. Signal.* 2010. V. 3. № 115. P. ra24. doi:10.1126/scisignal.2000672
62. Veal E.A., Day A.M., Morgan B.A. // *Mol. Cell.* 2007. V. 26. № 1. P. 1–14. doi:10.1016/J.MOLCEL.2007.03.016
63. Saul S., Gibhardt C.S., Schmidt B., Lis A., Pasioka B., Conrad D., Jung P., Gaupp R., Wonnemberg B., Diler E., et al. // *Sci. Signal.* 2016. V. 9. № 418. P. ra26. doi:10.1126/SCISIGNAL.AAF1639/SUPPL_FILE/9_RA26_SM.PDF
64. Holzmann C., Kilch T., Kappel S., Dörr K., Jung V., Stöckle M., Bogeski I., Peinelt C. // *Biophys. J.* 2015. V. 109. № 7. P. 1410–1419. doi:10.1016/j.bpj.2015.08.006
65. Dubois C., Vanden Abeele F., Lehen'kyi V., Gkika D., Guarnit B., Lepage G., Slomianny C., Borowiec A.S., Bidaux G., Benahmed M., et al. // *Cancer Cell.* 2014. V. 26. № 1. P. 19–32. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.025
66. Motiani R.K., Zhang X., Harmon K.E., Keller R.S., Matrougui K., Bennett J.A., Trebak M. // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 1. P. 63–75. doi:10.1096/FJ.12-213801
67. Prins D., Groenendyk J., Touret N., Michalak M. // *EMBO Rep.* 2011. V. 12. № 11. P. 1182–1188. doi:10.1038/EMBOR.2011.173
68. Hawkins B.J., Irrinki K.M., Mallilankaraman K., Lien Y.C., Wang Y., Bhanumathy C.D., Subbiah R., Ritchie M.F., Soboloff J., Baba Y., et al. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 190. № 3. P. 391–405. doi:10.1083/JCB.201004152
69. Gui L., Zhu J., Lu X., Sims S.M., Lu W.Y., Stathopoulos P.B., Feng Q. // *J. Mol. Biol.* 2018. V. 430. № 12. P. 1773–1785. doi:10.1016/J.JMB.2018.04.028
70. Gibhardt C.S., Cappello S., Bhardwaj R., Schober R., Kirsch S.A., Bonilla del Rio Z., Gahbauer S., Boichicchio A., Sumanska M., Ickes C., et al. // *Cell Rep.* 2020. V. 33. № 3. P. 108292. doi:10.1016/J.CELREP.2020.108292
71. Mokrane N., Snabi Y., Cens T., Guiramand J., Charnet P., Bertaud A., Menard C., Rousset M., de Jesus Ferreira M.C., Thibaud J.B., et al. // *Front. Aging Neurosci.* 2021. V. 13. P. 785727. doi:10.3389/FNAGI.2021.785727
72. White K.A., Grillo-Hill B.K., Barber D.L. // *J. Cell Sci.* 2017. V. 130. № 4. P. 663. doi:10.1242/JCS.195297
73. Chiche J., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. // *J. Cell. Mol. Med.* 2010. V. 14. № 4. P. 771–794. doi:10.1111/J.1582-4934.2009.00994.X
74. Arnaiz E., Harris A.L. // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 821816. doi:10.3389/FIMMU.2022.821816
75. Pethő Z., Najder K., Carvalho T., McMorro R., Todesca L.M., Rugi M., Bulk E., Chan A., Löwik C.W.G.M., Reshkin S.J., et al. // *Cancers (Basel).* 2020. V. 12. № 9. P. 1–37. doi:10.3390/CANCERS12092484
76. Beck A., Fleig A., Penner R., Peinelt C. // *Cell Calcium.* 2014. V. 56. № 3. P. 235–243. doi:10.1016/J.CECA.2014.07.011
77. Rychkov G.Y., Zhou F.H., Adams M.K., Brierley S.M., Ma L., Barritt G.J. // *J. Physiol.* 2022. V. 600. № 3. P. 623–643. doi:10.1113/JP282502
78. Tsujikawa H., Yu A.S., Xie J., Yue Z., Yang W., He Y., Yue L. // *Nat. Publ. Gr.* 2015. V. 5. P. 16747. doi:10.1038/srep16747
79. Semtner M., Schaefer M., Pinkenburg O., Plant T.D. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 46. P. 33868–33878. doi:10.1074/JBC.M702577200
80. Girolami B., Serano M., Di Fonso A., Paolini C., Pietrangelo L., Protasi F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 6. P. 5328. doi:10.3390/ijms24065328
81. Audero M.M., Prevarskaia N., Pla A.F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 13. P. 7377. doi:10.3390/IJMS23137377
82. Mancarella S., Wang Y., Deng X., Landesberg G., Scalia R., Panettieri R.A., Mallilankaraman K., Tang X.D., Madesh M., Gill D.L. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 52. P. 44788–44798. doi:10.1074/JBC.M111.303081
83. Gusarova G.A., Trejo H.E., Dada L.A., Briva A., Welch L.C., Hamanaka R.B., Mutlu G.M., Chandel N.S., Prakriya M., Sznajder J.I. // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. № 17. P. 3546–3556. doi:10.1128/MCB.05114-11
84. Chiche J., Ilc K., Laferrière J., Trotter E., Dayan F., Mazure N.M., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. № 1. P. 358–368. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2470
85. Kandilci H.B., Richards M.A., Fournier M., Şimşek G., Chung Y.J., Lakhal-Littleton S., Swietach P. // *Front. Cardiovasc. Med.* 2021. V. 7. P. 617038. doi:10.3389/FCVM.2020.617038
86. Li Y., Zhao L., Li X.F. // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2021. V. 20. P. 15330338211036304. doi:10.1177/15330338211036304
87. Davis F.M., Peters A.A., Grice D.M., Cabot P.J., Parat M.O., Roberts-Thomson S.J., Monteith G.R. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. P. e36923. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0036923
88. Rubaiy H.N. // *Pharmaceuticals (Basel).* 2023. V. 16. № 2. P. 162. doi:10.3390/PH16020162
89. Norman K., Hemmings K.E., Shawer H., Appleby H.L., Burnett A.J., Hamzah N., Gosain R., Woodhouse E.M., Beech D.J., Foster R., et al. // *PLoS One.* 2024. V. 19. № 1. P. e0296065. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0296065
90. Miller J., Bruen C., Schnaus M., Zhang J., Ali S., Lind A., Stoecker Z., Stauderman K., Hebbard S. // *Crit. Care.* 2020. V. 24. № 1. P. 502. doi:10.1186/S13054-020-03220-X
91. Skopin A.Y., Grigoryev A.D., Glushankova L.N., Shalygin A. V., Wang G., Kartzev V.G., Kaznacheyeva E.V. // *Acta Naturae.* 2021. V. 13. № 1. P. 140–146. doi:10.32607/actanaturae.11269

УДК 615.099; 615.917; 611.36; 579.222

Орто- и мета-монохлорированные бифенилы угнетают гуморальный иммунитет и оказывают токсическое воздействие на клетки печени мышей

Д. О. Егорова^{1*}, С. В. Гейн¹, Н. А. Королев¹, Н. П. Логинова²¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, 614990 Россия²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, 614990 Россия

*E-mail: daryao@rambler.ru

Поступила в редакцию 16.12.2024

Принята к печати 13.05.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27596

РЕФЕРАТ Широкомасштабное загрязнение окружающей среды полихлорированными бифенилами ведет к серьезным нарушениям здоровья человека и животных. Основное внимание уделяется изучению негативных эффектов, вызванных проникновением в организм человека средне- и высокохлорированных бифенилов. Имеются единичные сведения о влиянии низкохлорированных бифенилов, содержащих 1–2 заместителя, на функции органов и систем млекопитающих. Известно, что в природных условиях полихлорбифенилы могут подвергаться бактериальной деструкции, продукты которой относятся к группе вторичных поллютантов и рассматриваются как опасные для природы агенты. Ввиду малой изученности влияния вышеупомянутых соединений на здоровье человека, вопрос о воздействии монозамещенных хлорбифенилов, а также продуктов их биотрансформации на иммунитет и состояние внутренних органов млекопитающих остается открытым. В представленной работе впервые показаны эффекты воздействия орто- и мета-замещенных монохлорированных бифенилов на функции клеток иммунной системы и морфофункциональное состояние печени млекопитающих *in vivo*. Установлено, что ПХБ 1 и ПХБ 2 угнетают гуморальный иммунитет и вызывают продуктивную воспалительную реакцию, распространенную белковую дистрофию с фокусами некроза в печени. Продукты аэробной бактериальной трансформации ПХБ 1 и ПХБ 2 не оказывают негативного влияния на иммунную систему млекопитающих, но обладают токсичностью в отношении гепатоцитов, хотя и в меньшей степени, чем исходные хлорбифенилы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА монохлорированные бифенилы, гуморальный иммунитет, гепатоциты, биодеструкция, лейкоциты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПХБ – полихлорированные бифенилы; ПХБ 1 – орто-монохлорбифенил; ПХБ 2 – мета-монохлорбифенил; АОК – антителообразующие клетки; ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим анализом; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем современности является воздействие на организм человека и животных полихлорированных бифенилов (ПХБ), а также их производных, образующихся в окружающей среде под действием природных факторов. Согласно Стокгольмской конвенции, ПХБ запрещены к производству и применению, однако они сохраняются

в объектах окружающей среды и несут прямую угрозу здоровью населения [1]. Группа ПХБ состоит из 209 соединений, отличающихся количеством заместителей и их положением в молекуле. Поступление ПХБ в организм человека происходит в результате их аккумуляции в пищевых цепях [2]. ПХБ вызывают нарушения в развитии плода животных, заболевания кожи и нервной системы, рас-

смаатриваются как одна из причин возникновения диабета, а также провоцируют развитие опухолевых заболеваний и генетических нарушений [3, 4]. На примере отдельных средне- и высокохлорированных конгенеров ПХБ, содержащих более трех заместителей в молекуле, а также коммерческих смесей, показано их негативное влияние на иммунитет [5–7]. Однако вопрос о значимости низкохлорированных бифенилов для здоровья животных и человека в настоящий момент остается открытым.

Основным направлением для предотвращения перемещения ПХБ по пищевым цепям является их биодеструкция в природных средах, обусловленная деятельностью ферментативных систем аэробных бактерий. При этом образуются гидроксированные производные хлорбифенилов и хлорбензойные кислоты, которые также могут вызывать негативные эффекты при поступлении в организм млекопитающих [8].

В данной работе впервые показаны эффекты *орто*- и *мета*-замещенных моноклорированных бифенилов и продуктов их бактериальной деструкции на показатели адаптивного иммунитета и морфофункциональное состояние печени мышей *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали белых мышей породы Swiss, массой 18–23 г обоих полов. Животных содержали в условиях лабораторного вивария с 12-часовым циклом освещения, двухразовым питанием натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам, при неограниченном доступе к воде. Эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями и этическими нормами, указанными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Получено разрешение локального этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» IRB00010009 (Пермь, Россия) (протокол № 29 от 08.10.2024 г.).

орто-Моноклорбифенил (ПХБ 1) и *мета*-моноклорбифенил (ПХБ 2) вводили мышам перорально, в кукурузном масле, последовательно, через день, в дозе 100 мг/кг. Выбор дозы основан на опубликованных данных [9]. Продукты биодеструкции ПХБ 1 и ПХБ 2 вводили мышам перорально в виде водного раствора, через день, в дозе, соответствующей 100 мг/кг исходного субстрата. Контрольным группам вводили кукурузное масло и минеральную среду культивирования, освобожденную от бактериальных клеток, каждая группа содержала 7–11 особей.

Продолжительность эксперимента составила 25 сут. Гуморальный иммунитет индуцировали на 19

день эксперимента введением эритроцитов барана (10^8 клеток в 200 мкл физиологического раствора) в брюшную полость мышей. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) индуцировали на 24 день эксперимента введением разрешающей дозы эритроцитов барана под кожу левой стопы и аналогичный объем 0.9% раствора NaCl вводили под кожу правой стопы. На 25 день животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Гуморальный иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле агарозы по методу Эрне. Выраженность реакции ГЗТ оценивали, измеряя отек лапы по индексу массы, который рассчитывали по формуле: $(P_o - P_k)/P_k \times 100\%$, где P_o – показатели массы опытной конечности, P_k – показатели массы контрольной конечности.

Ткани печени фиксировали в 10 % нейтральном формалине на фосфатном буфере (pH 7.2), с дальнейшей заливкой в парафин Histomix. Гистологические препараты готовили стандартным методом. Для оценки общей морфологической картины срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Оценку и фотосъемку проводили на микроскопе Olympus (Япония) с программным пакетом Imeg pro+ (free version).

Продукты биодеструкции ПХБ 1 и ПХБ 2 получали в экспериментах с отмытыми клетками аэробного штамма *Rhodococcus* sp. FG1 (ВКМ Ас-3030) согласно [10]. Культивирование осуществляли в течение 24 ч. Количественный анализ хлорбифенилов и их гидроксипроизводных проводили в условиях ГХ-МС [10]. Содержание веществ в каждом исследуемом образце рассчитывали методом внутренней нормализации. Качественный анализ производили по базе NIST17. Наличие бензойной и хлорбензойных кислот определяли методом ВЭЖХ в культуральной среде, освобожденной от бактериальных клеток центрифугированием (9660 g, 3 мин, центрифуга miniSpin (Eppendorf, Германия)), согласно [10].

Статистический анализ результатов проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента в программном пакете Microsoft Excel. Данные в таблицах представлены в виде среднего и его стандартной ошибки ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как описано ранее, средне- и высокохлорированные бифенилы оказывают депрессивное воздействие на гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет позвоночных [5–7]. Нами установлено, что ПХБ 1 и ПХБ 2 в эксперименте *in vivo* статистически значимо снижали количество АОК в селенке как по относительным, так и абсолютным

Таблица 1. Влияние орто-моноклорбифенила (ПХБ 1) и мета-моноклорбифенила (ПХБ 2) на количество АОК в селезенке и выраженность реакции ГЗТ

Вещество	lgАОК/млн	lgАОК/орг	Индекс реакции ГЗТ, %
Кукурузное масло (Км)	2.25 ± 0.11	4.66 ± 0.09	20.06 ± 1.78
ПХБ 1	1.70 ± 0.19*	4.11 ± 0.20*	21.73 ± 2.37
ПХБ 2	1.69 ± 0.22*	4.07 ± 0.22*	25.59 ± 3.62

Примечание: * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. Влияние продуктов биодеструкции орто-моноклорбифенила (ПХБ 1) и мета-моноклорбифенила (ПХБ 2) на количество АОК в селезенке и выраженность реакции ГЗТ

Вещество	lgАОК/млн	lgАОК/орг	Индекс реакции ГЗТ, %
Минеральная среда (Кс)	2.04 ± 0.15	4.29 ± 0.19	30.97 ± 4.56
Продукты деструкции ПХБ 1	2.00 ± 0.07	4.48 ± 0.11	24.63 ± 5.38
Продукты деструкции ПХБ 2	2.02 ± 0.17	4.43 ± 0.19	19.59 ± 2.68

показателям, на выраженность реакции ГЗТ исследуемые соединения не влияли (табл. 1).

Таким образом, ПХБ 1 и ПХБ 2 угнетают гуморальный иммунитет, но не влияют на показатели клеточно-опосредованного иммунитета.

Установлено, что продукты микробной трансформации ПХБ 1 и ПХБ 2 не оказывали статистически значимого влияния на количество антителообразующих клеток в селезенке и выраженность реакции ГЗТ по сравнению с группой животных, получавших в качестве контроля минеральную среду (Кс), в которой культивировали микроорганизмы, использованные для деструкции (табл. 2).

На основании результатов ГХ-МС, ВЭЖХ, баз данных NIST17 и KEGG (<http://kegg.jp>) установлено, что штамм *Rhodococcus* sp. FG1 осуществляет разложение ПХБ 1 по классическому аэробному окислительному пути с формированием в качестве основного соединения 2-хлорбензойной кислоты, а ПХБ 2 – с образованием двух конгенов гидроксигированных производных хлорбифенила, а также бензойной и 3-хлорбензойной кислот (рис. 1). Однако, в отличие от метаболитов 2,4,4'-трихлорбифенила [8], они не оказывали негативное влияние на иммунную систему мышей.

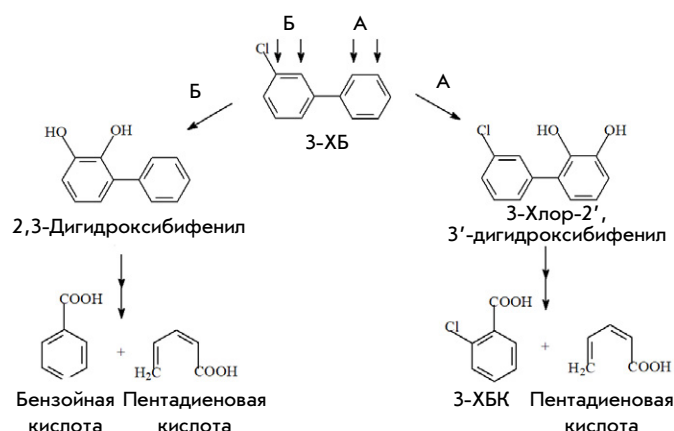


Рис. 1. Схема окисления ПХБ 2 ферментативной системой штамма *Rhodococcus* sp. FG1 и основные продукты деструкции. А – метаболический путь начинается с окисления 2 и 3 атомов углерода в незамещенном кольце молекулы бифенила. Б – метаболический путь начинается с окисления 2 и 3 атомов углерода в замещенном кольце молекулы бифенила

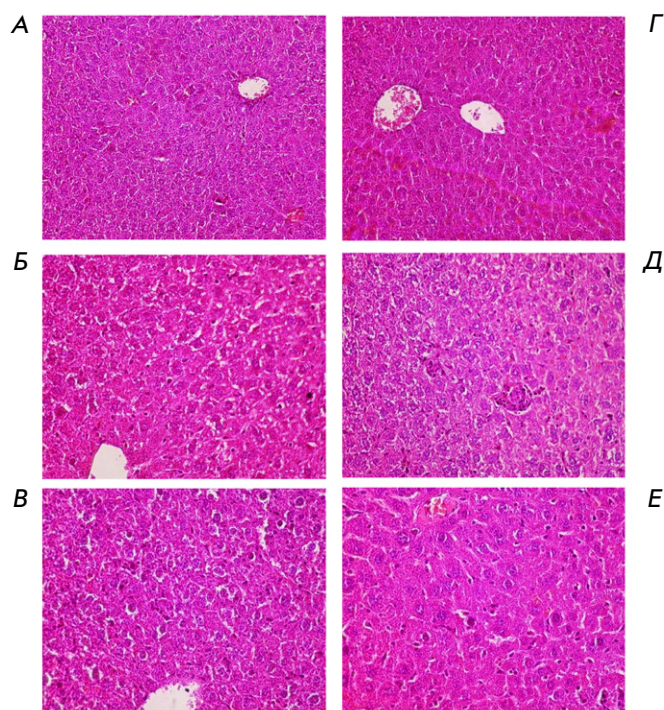


Рис. 2. Структура печени мышей в контрольных группах (А – кукурузное масло, Г – среда культивирования бактерий), под воздействием ПХБ 1 (Б), ПХБ 2 (В), продуктов биодеструкции ПХБ 1 (Д) и продуктов биодеструкции ПХБ 2 (Е) штаммом *Rhodococcus* sp. FG1. Ув. 400. Окраска: гематоксилин-эозином

Гистологическое исследование показало, что печень животных в группах контроля имела нормальное строение, все структуры имели признаки функциональной активности (рис. 2А,Г). Пероральное введение ПХБ 1 и ПХБ 2 привело (в сравнении с группой контроля) к значительному увеличению числа двуядерных гепатоцитов, а также клеток с ядрами разной величины, мелкие фокусы некроза гепатоцитов и выраженную продуктивную воспалительную реакцию с признаками белковой дистрофии, имеющей распространенный характер (рис. 2Б,В). Согласно [11], выраженность реакции оценена на три балла. Согласно [12], внутрибрюшинное введение низкохлорированных бифенилов в тканях печени приводит к обширным клеточным изменениям, при этом не выявлено зависимости выраженности эффекта от введенного конгенера ПХБ. В печени животных, получавших продукты бактериальной деструкции ПХБ 1 и ПХБ 2, сохранялись признаки умеренной белковой дистрофии гепатоцитов, умеренный анизокариоз, увеличение числа двуядерных гепатоцитов в центральных об-

ластях печеночных долек, умеренно продуктивная воспалительная реакция (рис. 2Д,Е). Выраженность реакции согласно [11], оценена на 1.5 балла. Таким образом, можно предположить, что гидроксипроизводные ПХБ 1 и ПХБ 2 и (хлор)бензойные кислоты менее токсичны для гепатоцитов, нежели исходные монохлорбифенилы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования впервые установлено, что *орто*- и *мета*-монохлорированные бифенилы угнетают гуморальный иммунитет, вызывают в печени продуктивную воспалительную реакцию, сопровождающуюся признаками клеточной дистрофии с фокусами некроза. Продукты бактериальной деструкции рассматриваемых хлорбифенилов не обладают иммуносупрессивным эффектом, однако оказывают токсическое воздействие на клетки печени, хотя и менее выраженное. ●

Работа поддержана грантом РНФ
(№ 24-24-00498).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu M., Yuan Y., Yin H., Guo Z., Wei X., Qi X., Liu H., Dang Z. // *Sci. Total. Environ.* 2022. V. 805. Article 150270. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150270.
2. Frossard V., Vagnon C., Cottin N., Pin M., Santoul F., Nafrechoux E. // *Sci. Total. Environ.* 2023. V. 902. Article 166037. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166037>.
3. Lan T., Liu B., Bao W., Thorne P.S. // *Sci. Repts.* 2023. V. 13. № 1. Article 18322. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45301-1>.
4. Miletić M., Kmetić I., Kovač V., Šimić B., Petković T., Štrac D.Š., Pleadin J., Murati T. // *Env. Sci. Pollut. Res.* 2023. V. 30. № 31. P. 77318–77327. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27812-6>.
5. Gao Y., Huang W., Jiang N., Fang J.K.H., Hu M., Shang Y., Wang Y. // *Marine Environ. Res.* 2023. V. 192. Article 106214. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106214>.
6. Duffy J.E., Carlson E., Li Y., Prophete C., Zelikoff J.T. // *Marine Environ. Res.* 2002. V. 54. № 3–5. P. 559–563. [https://doi.org/10.1016/s0141-1136\(02\)00176-9](https://doi.org/10.1016/s0141-1136(02)00176-9).
7. Hammond J.A., Hall A.J., Dyrinda E.A. // *Aquatic Toxicol.* 2005. V. 74. № 2. P. 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquat-tox.2005.05.006>.
8. Rengelshausen J., Randerath I., Schettgen T., Esser A., Kaifé A., Lang J., Kraus T., Ziegler P. // *Arch. Toxicol.* 2023. V. 97. № 10. P. 2609–2623. doi: 10.1007/s00204-023-03578-1.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
10. Egorova D.O., Gorbunova T.I., Pervova M.G., Kir'yanova T.D., Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. // *J. Haz. Mat.* 2020. V. 400. Article 123328. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123328>.
11. Сенькова А.В., Савин И.А., Черноповская Е.Л., Давыдова А.С., Мещанинова М.И., Бишани А., Воробьева М.А., Зенкова М.А. // *Acta Nature.* 2024. Т. 16. № 2 (61). С. 61–71. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27393>.
12. Ludewig G., Robertson L.W. // *Cancer Lett.* 2013. V. 334. P. 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.041>.

УДК 577.21

Пептид miPER-156а капусты повышает уровень накопления собственной мРНК в трансгенном мхе *Physcomitrium patens*

Т. Н. Ерохина^{1*}, Е. В. Рябухина¹, И. С. Ляпина¹, Д. Ю. Рязанцев¹, С. К. Завриев¹,
С. Ю. Морозов²

¹Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), Москва, 117997 Россия

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

*E-mail: tne@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 07.04.2025

Принята к печати 13.05.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27668

РЕФЕРАТ МикроРНК – это эндогенные небольшие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне путем расщепления мРНК-мишеней. Зрелые микроРНК образуются в результате процессинга их первичных транскриптов (pri-miRNA). Установлено, что продуктами трансляции некоторых pri-miRNA растений являются также молекулы пептидов (miPER). Эти пептиды способны взаимодействовать со своими открытыми рамками трансляции (ОРТ) в транскрибирующихся цепях pri-miRNA и положительно регулировать накопление этих РНК и соответствующих зрелых микроРНК. Большинство консервативных микроРНК играют важную роль в развитии растений и их реакции на стресс. В настоящей работе нами получены трансгенные растения мха *Physcomitrium patens*, геном которых содержит ОРТ miPER156а капусты *Brassica oleracea* под контролем сильного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Проведен анализ влияния экзогенного пептида на транскрипцию этой ОРТ в протонемах двух трансгенных линий мха. Оказалось, что обработка культуры мха химически синтезированным пептидом miPER156а вызывает усиление накопления собственной мРНК, как это показано ранее для целого ряда пептидов в однодольных и двудольных растениях. Эти данные подтверждают, что участки pri-miRNA за пределами кодирующей области пептида не требуются для активации транскрипции. Более того, нами показано, что наличие специфического промотора гена микроРНК не влияет на феномен активации транскрипции, а сам этот феномен не является видоспецифичным и наблюдается в трансгенных растениях вне зависимости от происхождения miPER.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА микроРНК, пептиды, miPER, pri-miRNA, трансгенные растения, ПЦР-анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ pri-miRNA – первичные транскрипты генов микроРНК; miPER – пептид, кодируемый первичным транскриптом генов микроРНК; ОРТ – открытая рамка трансляции; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что гены микроРНК транскрибируются в виде крупных первичных транскриптов (pri-miRNA) и становятся зрелыми миРНК только после нескольких этапов созревания [1]. Как и любой белок-кодирующий ген, гены микроРНК транскрибируются РНК-полимеразой II с образованием первичного транскрипта pri-miRNA, состоящего из нескольких сотен или тысяч оснований. Во внутренней области этого первичного транскрипта находится

характерная шпильчатая структура, включающая биспиральную последовательность микроРНК, которая превращается в зрелую форму после действия белка DCL1, кодируемого геном *Dicer* [1]. Этот фермент сначала отщепляет 5'- и 3'-концевые области первичного транскрипта, превращая его в шпилькообразную миРНК-предшественник (pre-miRNA), а затем расщепляет pre-miRNA для высвобождения дуплекса miRNA-miRNA*. Этот дуплекс затем транслируется в цитоплазму, где одна из цепей

(соответствует микроРНК) включается в рибонуклеопротеидную частицу, образованную нуклеазой Argonaute для формирования комплекса RISC, который затем обеспечивает микроРНК-опосредованный сайленсинг генов [1].

Десять лет назад обнаружили, что некоторые pri-miRNA содержат небольшие открытые рамки трансляции (OPT), которые могут кодировать регуляторные пептиды, называемые микроРНК-кодируемые пептиды (miPER) [2]. Механизм действия miPER в растениях заключается в усилении транскрипции и накопления соответствующей pri-miRNA, что является примером положительной обратной связи. Это приводит к повышению накопления зрелых микроРНК и усилению подавления генов-мишеней для микроРНК [3, 4]. Сверхэкспрессия miPER в трансгенных растениях или обработка листьев и корней экзогенными химически синтезированными пептидами могут приводить, например, к значительным изменениям в развитии корней, к увеличению накопления антоцианинов и повышению устойчивости к биотическим и абиотическим видам стресса [4–7]. Важно, что целый ряд таких эффектов может успешно использоваться для улучшения хозяйственно значимых свойств растений [4, 5, 7, 8].

Ранее мы использовали биоинформатический подход для сравнительного анализа последовательностей OPT из генов pri-miRNA в геномах растений и идентифицировали новую группу miPER (пептиды miPER156a), кодируемых pri-miR156a, у нескольких десятков видов семейства *Brassicaceae* [9]. Экзогенные химически синтезированные пептиды miPER156a могут эффективно проникать в протопласты растений через корневую систему и системно распространяться в листья. Пептиды оказывают явный морфологический эффект, ускоряя рост первичных корней. Параллельно пептиды miPER156a усиливают экспрессию собственной pri-miR156a [9]. Важно отметить способность пептида быстро проникать в ядро клетки и связываться с хроматином. В этой работе нами установлены общие свойства вторичной структуры miPER156a и обнаружены ее изменения, вызванные образованием пептидного комплекса с нуклеиновыми кислотами [9].

Недавно было доказано взаимодействие пептида Mt-miPER171b из бобовых с транскрибируемыми (в основном недостроенными) молекулами pri-miR171b, входящими в комплекс с матричной цепью хромосомной ДНК. Было высказано предположение, что это новый вид связывания белка с РНК, который полностью зависит от наличия определенного линейного набора кодонов в матрице, кодирующей данный miPER, а эти пептиды могут выполнять специфические регуляторные функции только в от-

ношении своих матричных pri-miRNA [10]. Исходя из особенностей взаимодействия между miPER и их pri-miRNA, предложена следующая схема активации транскрипции pri-miRNA кодируемыми пептидами: 1) miPER транслируется в цитоплазме из полноразмерной pri-miRNA или ее фрагмента, содержащего OPT, кодирующую miPER; 2) затем этот пептид мигрирует в ядро, где связывается с синтезируемой pri-miRNA в области его кодирующей последовательности; 3) такое взаимодействие усиливает накопление микроРНК на уровне транскрипции [4, 10]. Существующий экспериментальный опыт не позволяет нам сделать вывод о том, связывает ли miPER рибонуклеотидные цепочки pri-miRNA (или РНК в форме РНП) или РНК-ДНК-гибриды. Очевидно, нельзя исключать, что miPER обладают потенциалом взаимодействия не только с РНК, но и, как показано нами ранее [3], с ДНК (и/или хроматином) в областях генов микроРНК. Таким образом, miPER могут регулировать активность РНК-полимеразы II и/или медиаторного комплекса на стадиях инициации и/или элонгации транскрипции [8].

В нашей работе на модели miPER156a капусты (*Brassica oleracea*) мы поставили задачи выяснить: 1) насколько важны участки pri-miRNA за пределами кодирующей области пептида для активации транскрипции; 2) роль специфического промотора гена микроРНК в феномене активации транскрипции; 3) является ли феномен активации транскрипции видоспецифичным, т.е. может ли пептид miPER одного вида растений функционировать в других таксономически удаленных видах. С этой целью нами получены трансгенные растения мха *Physcomitrium patens*, содержащие в геноме OPT miPER156a капусты брокколи под контролем сильного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, и проанализировано влияние экзогенного пептида на транскрипцию этой OPT в протопластах мха.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Кодирующая область OPT miPER156a, включающая иницирующий и терминирующий кодоны, была амплифицирована с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице хромосомной ДНК *B. oleracea*. Для этого использовали пару ДНК-затравок: mir156r (5'-CTTTCTTTATGGCTCTTGTCGCTT) и mir156f (5'-AAATGTTCTGTTCAATTCAATGC) [9]. Полученный продукт амплификации клонировали в вектор pPLV27, используя метод LIC (ligation-independent cloning) [11]. После клонирования плазмиду pPLV27-miPER156a (рис. 1) накапливали в клетках *Escherichia coli*, очищали с помощью Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, ФРГ) и секвенировали.

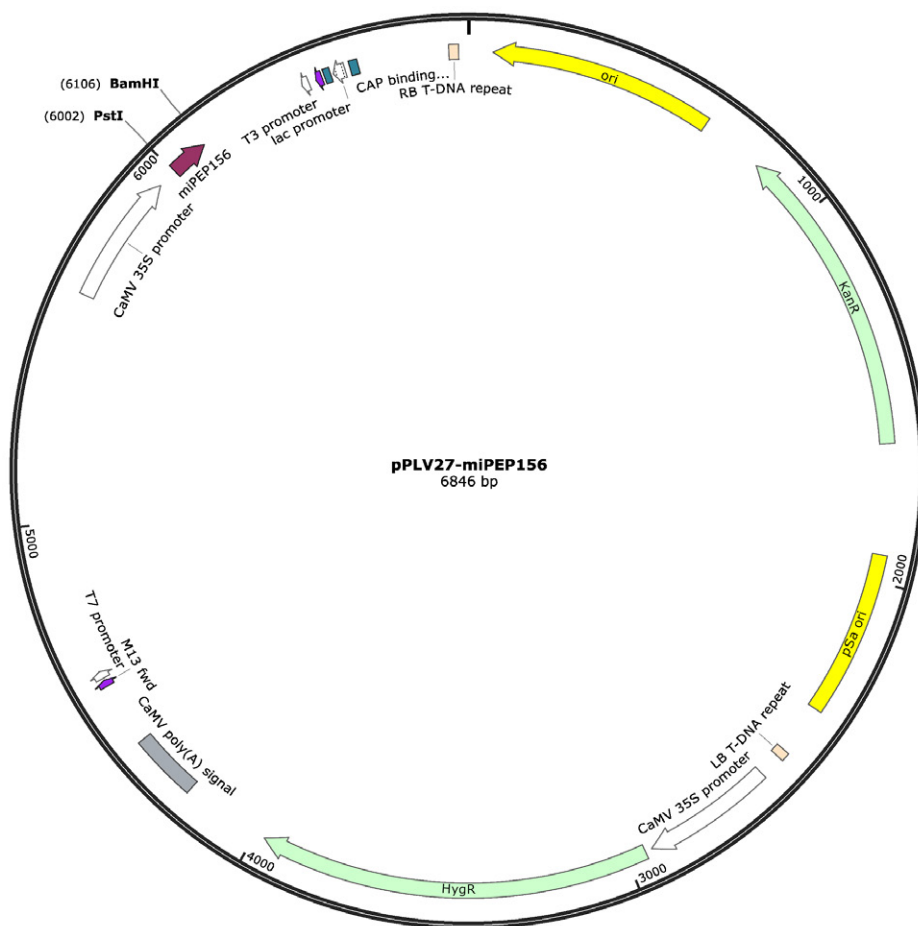


Рис. 1. Схема плазмиды pPLV27-miPEP156a, несущей вставку кодирующей области miPEP156a (отмечена фиолетовой стрелкой) и ген устойчивости к гигромицину, которые экспрессировали в целевых трансгенных растениях

Для получения трансгенов протонему мха *P. patens* Gransden 2004 выращивали на 9-см чашках Петри на твердой среде Кнопа, содержащей 1.5% агара (Helicon, Россия) и 500 мг/л аммония тартрата (Helicon), при освещении белым светом от люминесцентных ламп (Sanyo Plant Growth Incubator MLR-352H (Panasonic, Япония)) с фотонным потоком 61 мкмоль/м² в условиях 16-часового светового дня при 24°C и относительной влажности 50%. Протопласты получали из пятидневной протонемы. Протонему собирали с поверхности агара с помощью шпателя, отжимали и помещали в 0.5% раствор драйзелаза (Sigma-Aldrich, США) в 0.48 М маннитолу на 45 мин при непрерывном покачивании в темноте. Затем суспензию фильтровали через металлическое ситечко (100 мкм). Затем протопласты осаждали в 50 мл пластиковых пробирках центрифугированием при 150 g в течение 5 мин. Далее протопласты дважды отмывали 0.48 М маннитолом с последующим центрифугированием в тех же условиях. Затем супернатант сливали, а полученные протопласты трансформировали согласно протоколу PEG-трансформации [11]. Протопласты в концентрации 1.5×10^6 /мл ресуспензировали в рас-

творе MMg (0.48 М маннитол, 15 мМ MgCl₂, 0.1% MES, pH 5.6), инкубировали в течение 20 мин, затем добавляли 10 мкг плазмиды pPLV27-miPEP156a (рис. 1) и раствор 33% PEG, инкубировали в течение еще 30 мин. После отмывки протопласты высевали в верхнем агаре в чашки Петри на твердую среду поверх пленки. Затем чашки помещали в темноту на сутки. Далее их культивировали в обычных условиях для регенерации протопластов.

Для отбора клонов, имеющих вставку с целевым геном, регенерировавшие протопласты культивировали на селективной среде с гигромицином. В результате выявили пять устойчивых трансгенных линий мха *P. patens*: 2450, 2451, 2453, 2456 и 2483. Из растительных тканей этих линий экстрагировали суммарную ДНК с помощью DNeasy Plant Kit в соответствии с инструкциями производителя (Qiagen). С помощью ПЦР показали, что специфические продукты реакции, несущие вставку с OPT miR156a размером 700 п.н. и полученные с помощью затравок p35Sf (5'-AACAAAGGATAATTTTCGGGAAAC) и tNOSr (5'-TCGCGTATTAAATGTATAATTGC), комплементарных областям плазмиды pPLV27 с 35S промотором и терминатором транскрипции соот-

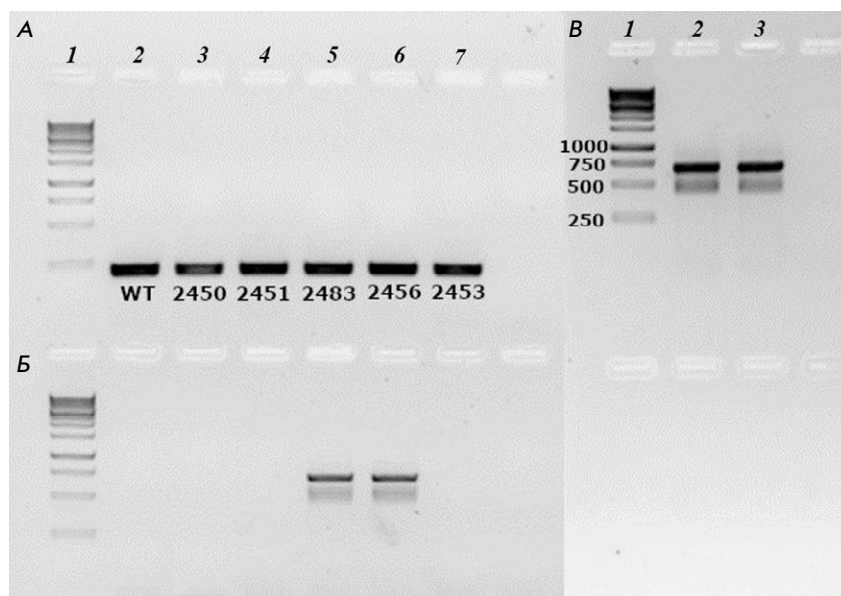


Рис. 2. Проверка наличия целевой вставки в ДНК отобранных линий *P. patens*, устойчивых к гигромицину (линии 2450, 2451, 2483, 2456, 2453), с помощью ПЦР. Геномную ДНК исходной линии мха (WT) использовали в качестве контроля. А – контрольная проверка качества выделенной ДНК референсного гена мха EF1-alpha (фактор элонгации трансляции 1а). Дорожка 1 – маркеры длины ДНК; 2 – WT; 3 – линия 2450; 4 – линия 2451; 5 – линия 2483; 6 – линия 2456; 7 – линия 2453. Б – ПЦР геномной ДНК с праймерами p35Sf и tNOSr. Расположение дорожек как на панели А. В – повторная проверка вставки в медленно растущей линии мха 2450 с праймерами p35Sf и tNOSr. Дорожка 1 – маркеры длины ДНК (размеры фрагментов указаны слева), 2 – линия 2450, 3 – ДНК плазмиды pPLV27-miPER156a

ветственно (рис. 1), образовывались лишь в случае линий 2450 и 2483 (рис. 2). Специфичность вставок подтвердили секвенированием продуктов ПЦР. Интересно, что колонии мха этих линий имеют существенно разную скорость роста. Если скорость роста у линии 2483 близка к скорости у растений дикого типа, то развитие колоний у 2450 было существенно замедлено. В этой связи важно отметить, что в трансгенных растениях *P. patens*, сверхэкспрессирующих ряд эндогенных пептидов, в большинстве случаев также наблюдается снижение скорости роста колоний [11].

Для изучения влияния пептида miPER156a на экспрессию мРНК в трансгенных растениях с помощью количественного ПЦР-анализа протонему линий 2450 и 2483 *P. patens* выращивали в 100 мл жидкой среды Кнопа, содержащей 500 мг/л тартрата аммония (Helicon, Россия), на качалках при освещении белым светом от люминесцентных ламп Sanyo Plant Growth Incubator MLR-352H (Panasonic, Япония) с фотонным потоком 61 мкмоль/м² в условиях 16-часового светового дня при 24°C и относительной влажности 50%. Для анализа семидневную протонему обрабатывали раствором пептида в воде (5 мкг/мл) в конечном объеме 50 мл. Образцы инкубировали в течение ночи, а затем нити протонемы отделяли от среды, отжимали от лишней влаги с помощью фильтровальной бумаги и замораживали в жидком азоте. Из замороженных тканей экстрагировали тотальную РНК с помощью TRIzol™ реагента (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя. После определения концентрации 2 мкг РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Затем проводили

обратную транскрипцию с праймером со случайной последовательностью с использованием набора Mini kit («Евроген», Россия). Полученную кДНК добавляли к смеси для проведения количественной ПЦР, используя реактивы и инструкции производителя («Евроген»). Количественную ПЦР проводили с использованием готовой смеси qPCRmix HS («Евроген») на амплификаторе DT prime («ДНК-Технологии», Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала 10 пмоль каждого праймера и интеркалирующий краситель Eva Green 1x. Использовали следующую программу амплификации: 95°C – 5 мин; 95°C – 15 с, 60°C – 15 с*, 72°C – 15 с, 45 циклов (* – детекция флуоресценции в канале FAM). После обработки данных значения Cq использовали для расчета нормализованной экспрессии в программе Q Gene [12] (рис. 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате количественного ПЦР-анализа (рис. 3) было выяснено, что обработка культуры мха экзогенным, химически синтезированным пептидом miPER156a в питательном растворе вызывает усиление накопления собственной мРНК в трансгенной культуре мха. В линии 2483 увеличение накопления РНК-матрицы для пептида miPER156a составляет около 60%. В случае линии 2450 этот эффект выражен даже сильнее: накопление РНК-матрицы для пептида капусты увеличивается на 240%, что выше эффекта, наблюдаемого при обработке проростков капусты [9].

В ходе исследования нами получены трансгенные растения мха *P. patens*, содержащие в геноме ОПТ miPER156a капусты брокколи под контролем

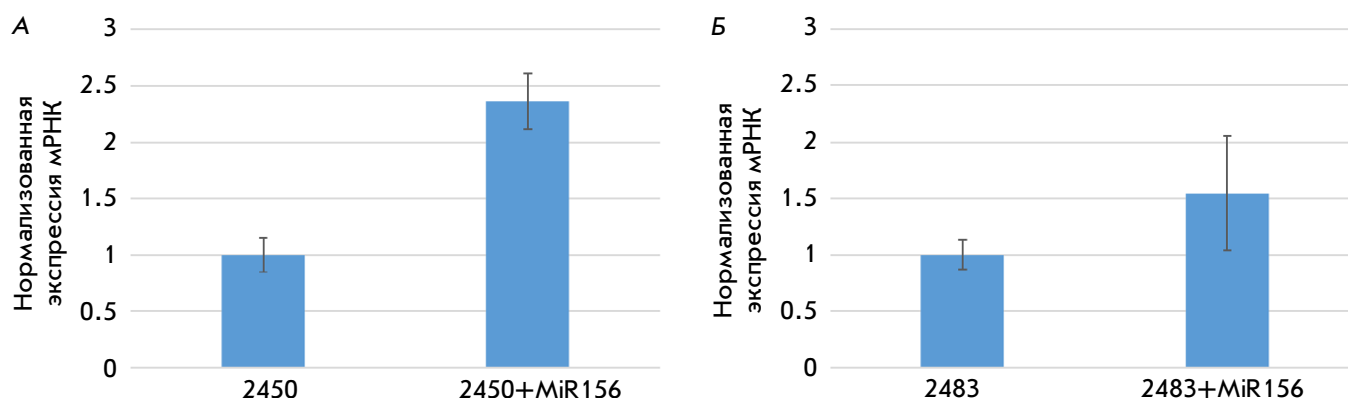


Рис. 3. Результаты кПЦР по измерению уровня экспрессии матрицы для miPER156a в трансгенных растениях мха *P. patens* линий 2450 (А) и 2483 (Б). Для каждого из пяти независимых повторов РНК выделяли из пяти проб мха, выросших в разные периоды времени. Указаны средние статистические значения в виде столбчатой диаграммы и стандартные отклонения. Статистическая значимость различий сумм значений в контрольных экспериментах (без инкубации с пептидом) и опытных экспериментов (с добавлением пептида miPER156a) составляла для этих двух выборок $p < 0.05$ согласно критерию Стьюдента (расчет на основе программы GraphPad Prism 7.0 – ([https:// graphpad_prism.software.informer.com/7.0/](https://graphpad_prism.software.informer.com/7.0/)))

сильного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, и проведен анализ влияния экзогенного пептида на транскрипцию этой ОРТ в протонемах двух трансгенных линий мха. Оказалось, что экзогенный, химически синтезированный пептид miPER156a вызывает усиление накопления в культуре мха собственной мРНК, как показано ранее для целого ряда пептидов в однодольных и двудольных растениях [3–5]. Наши текущие данные указывают, что участки pri-miRNA за пределами кодирующей области пептида не требуются для активации транскрипции. Более того, специфический промотор гена микроРНК не участвует в феномене активации транскрипции, а сам феномен активации транскрипции не является видоспецифичным, т.е.

пептид miPER156a капустных может функционировать в других таксономически удаленных видах растений, таких как мох. Таким образом, полученные нами данные находятся в согласии со схемой действия miPER, где связывание пептида со своей транскрибируемой pri-miRNA-матрицей обеспечивает активацию синтеза этих РНК [10]. ●

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда № 24-24-00016,
<https://rscf.ru/project/24-24-00016/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Axtell M.J. // Annu. Rev. Plant Biol. 2013. V. 64. № 1. P. 137–159. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120043
- Lauressergues D., Couzigou J.M., Clemente H.S., Martinez Y., Dunand C., Bécard G., Combier J.P. // Nature. 2015. V. 520. № 7545. P. 90–93. doi: 10.1038/nature14346
- Erokhina T.N., Ryazantsev D.Y., Zavriev S.K., Morozov S.Y. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 3. P. 2114. <https://doi.org/10.3390/ijms24032114>
- Thuleau P., Ormancey M., Plaza S., Combier J.P. // J. Exp. Bot. 2024. erae501. doi: 10.1093/jxb/erae501.
- Erokhina T.N., Ryazantsev D.Y., Zavriev S.K., Morozov S.Y. // Plants. 2024. V. 13. № 8. P. 1137. <https://doi.org/10.3390/plants13081137>
- Ormancey M., Guillotin B., Ribeyre C., Medina C., Jariais N., San Clemente H., Thuleau P., Plaza S., Beck M., Combier J.P. // Plant Biotechnol. J. 2024. V. 22. № 8. P. 13–15. doi: 10.1111/pbi.14187
- Zhou J., Zhang R., Han Q., Yang H., Wang W., Wang Y., Zheng X., Luo F., Cai G., Zhang Y. // Plant Cell Rep. 2024. V. 44. № 1. P. 9. doi: 10.1007/s00299-024-0338y
- Ormancey M., Thuleau P., Combier J.P., Plaza S. // Biomolecules. 2023. V. 13. № 2. P. 206. doi:10.3390/biom13020206
- Erokhina T.N., Ryazantsev D.Y., Samokhvalova L.V., Mozhaev A.A., Orsa A.N., Zavriev S.K., Morozov S.Y. // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. № 5. P. 551–562. doi: 10.1134/S0006297921050047.
- Lauressergues D., Ormancey M., Guillotin B., Gervais V., Plaza S., Combier J.P. // Cell Rep. 2022. V. 38. № 6. P. 110339. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110339.
- Fesenko I., Kirov I., Kniazev A., Khazigaleeva R., Lazarev V., Kharlampieva D., Gafskaja E., Zgoda V., Butenko I., et al. // Genome Res. 2019. V. 29. № 9. P. 1464–1477. doi: 10.1101/gr.253302.119
- Simon P. // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 11. P. 1439–1440. doi: 10.1093/bioinformatics/btg157

УДК 577.121.7

У мышей с нокаутом гена *p2rx3* изменен энергетический метаболизм нейронов гиппокампа

А. С. Зеленцова, В. М. Покровский, Е. А. Патраханов, В. С. Шмигерова, М. Ю. Скоркина*, А. В. Дейкин

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

*E-mail: marinaskorkina0077@gmail.com

Поступила в редакцию 02.11.2024

Принята к печати 18.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27551

РЕФЕРАТ Гиппокамп является ключевой структурой мозга, связанной с формированием долговременной памяти, в механизмах развития которой центральное место занимает энергетический метаболизм нейронов. Рецептор P2X3 в гиппокампе рассматривается как привлекательная мишень при поиске новых биологически активных субстанций, направленных на ослабление тревожности, эпилептических состояний и улучшение когнитивных функций. В работе изучали интенсивность митохондриального дыхания, гликолитическую емкость и энергетический фенотип нейронов гиппокампа у мышей с нокаутом гена *p2rx3*. Мыши с нокаутом гена *p2rx3* получены путем редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9. Первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа получали от двухдневных новорожденных мышат с генотипами *p2rx3*^{-/-} и *p2rx3*^{+/+}. Митохондриальное дыхание измеряли на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse Bioscience HS mini (Agilent, США), используя соответствующие наборы для проведения митостресс-теста, гликотеста и теста оценки энергетического фенотипа. Для трансгенных мышей с генотипом *p2rx3*^{-/-} характерен аэробный тип митохондриального дыхания, повышение продукции АТФ на 84.4% ($p < 0.05$), усиление максимального дыхания на 72.3% ($p < 0.05$) и дыхательного резерва на 36% ($p < 0.05$). При этом запасная дыхательная емкость митохондрий, скорость гликолиза и гликолитическая емкость у этих мышей снижены, соответственно, на 36.6, 75.7 и 78.6% ($p < 0.05$). Полученные данные указывают на работу митохондрий, близкую к максимальной, по своей энергетической мощности. Животные с нокаутом гена *p2rx3* являются уникальной моделью для поиска фармакологических мишеней, направленных на коррекцию энергетического метаболизма клеток головного мозга и устраняющих когнитивные дисфункции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ген *p2rx3*, гиппокамп, первичная смешанная культура нейронов, митохондриальное дыхание.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; ЦНС – центральная нервная система; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; АМРА – альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота; САМК II – кальциевая кальмодулин-зависимая протеинкиназа; CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; ECAR – скорость закисления среды; FCCP – карбонилцианид-4-(трифторметокси)-фенилгидразон; NMDA – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат; OCR – скорость потребления кислорода; PBS – фосфатный буфер; P2X3KO – мыши с нокаутом рецептора P2X3.

ВВЕДЕНИЕ

Энергетический метаболизм нейронов гиппокампа тесно связан с когнитивными функциями, процессами памяти и обучения [1]. В механизмах синаптической передачи сигнала в гиппокампе участвуют АТФ и пуриновые рецепторы [2]. Функциональной особенностью семейства рецепторов P2X является генерация внутриклеточных Ca²⁺-сигналов, когда

уровень мембранного потенциала близок к уровню физиологического покоя [3]. Рецептор P2X3 в гиппокампе считается привлекательной мишенью для изучения процессов тревожности и мотивации [4], а также патогенеза эпилептических состояний [5]. У мышей с нокаутом рецептора P2X3 (P2X3KO) наблюдаются аномалии в синаптической пластичности гиппокампа, нарушения долгосрочной депрес-

сии в синапсах CA1, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа. Вместе с тем, мыши P2X3KO нормально справлялись с тестами пространственного обучения в водном лабиринте, что позволяет предположить лучшую способность к обучению у животных с нокаутом гена *p2rx3*. Кроме того, мыши P2X3KO быстрее, чем мыши дикого типа, выполняли задачу, которая включала визуальное определение местоположения платформы и плавание к ней [5]. Несмотря на многочисленные работы, посвященные различным сторонам функционирования рецептора P2X3 [6], недостаточно изученной остается взаимосвязь этого рецептора с митохондриальной функцией, определяющей активность клеточного метаболизма, кальциевый гомеостаз и, как следствие, регуляцию синаптической пластичности гиппокампа в ЦНС. В представленной работе изучали интенсивность митохондриального дыхания, гликолитическую емкость и оценивали энергетический фенотип нейронов гиппокампа у мышей с нокаутом гена *p2rx3*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа с лабораторными животными

Мышей содержали в условиях конвенционального вивария Белгородского государственного национального исследовательского университета в ус-

ловиях искусственно регулируемого светового дня (день/ночь = 12/12 ч) при температуре 22–26°C и свободном доступе к корму и воде. В работе руководствовались этическими принципами обращения с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS No. 170). Болезненные манипуляции с животными проводили с использованием регламентирующих стандартов: Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, и рекомендаций комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИУ «БелГУ» (экспертное заключение № 01и/23 от 23.01.2023).

Животных с редактированным геномом получали путем микроинъекции генетической конструкции в пронуклеус зиготы мыши-донора с последующей пересадкой репродуктивного материала самке-реципиенту (рис. 1Б) [7–9]. С помощью инструмента онлайн-поиска CHOPCHOP была отобрана гидовая (направляющая) РНК (single guide RNA – sgRNA), узнающая последовательность второго экзона гена *p2rx3*. Выбранная sgRNA 5'-GGCCTACCAAGTGCGGGACACGG(CCA)-3' (PAM, указан в скобках)

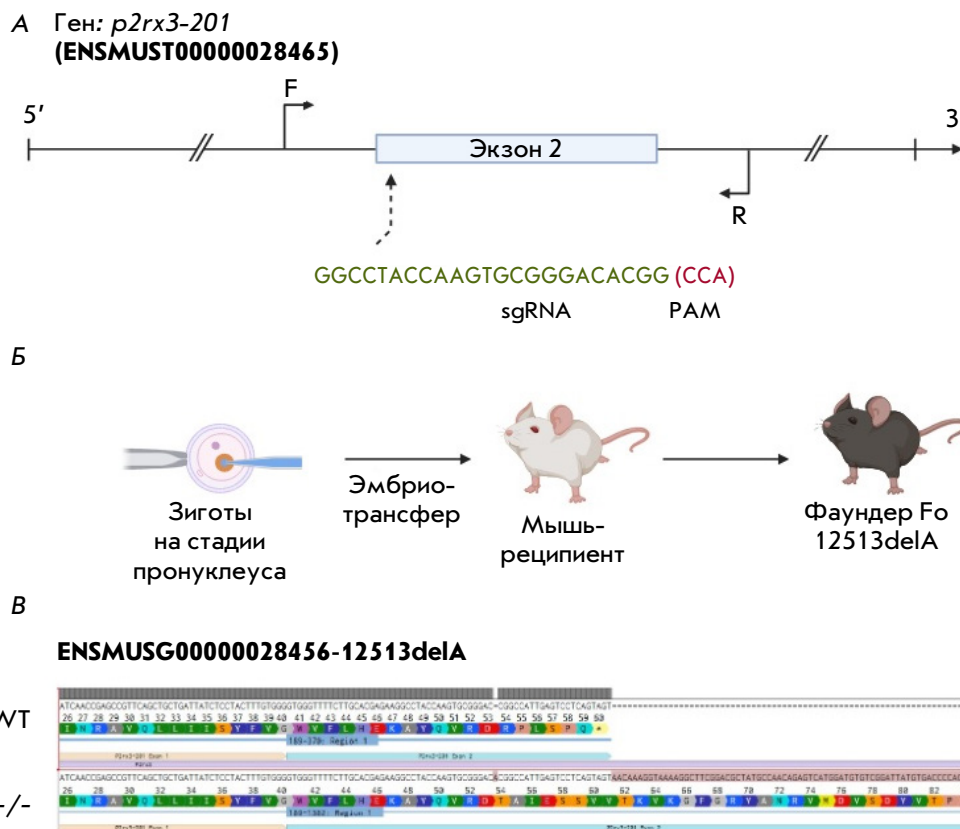


Рис. 1. Создание мыши с нокаутом гена *p2rx3*. **А** – направляющая РНК, выбранная для редактирования гена методом CRISPR/cas9. **Б** – процесс пронуклеарной инъекции и создания поколения F0. **В** – транскрипт гена *p2rx3* дикой мыши (WT) и мыши с нокаутом этого гена

(рис. 1А), не имеющая нецелевых сайтов менее чем с тремя несоответствиями, была протестирована в серии контрольных экспериментов на бластоцистах и использована при создании мышей с нокаутом гена *p2rx3*.

Генетический анализ потомства

Генотипирование мышей проводили секвенированием по Сенгеру ПЦР-продукта, содержащего зону узнавания выбранной sgRNA (прямой и обратный праймеры 5'-АСТААГСАГГААСТСАТСССАА-3', 5'-САТААТССГАСАТССАТГАС-3' («Евроген», Россия), рис. 1А. в ЦКП «Геном» согласно рекомендованному протоколу. Результаты анализировали с помощью Интернет-ресурса Decodr.

В результате получили животных со сдвигом рамки считывания гена *p2rx3* на один нуклеотид в экзоне 2, что привело к замене шести кодонов и образованию стоп-кодона (рис. 1В). Мутация успешно закрепилась в первом поколении. Мыши с гомо- и гетерозиготной мутацией жизнеспособны. Животные были переведены на генетический фон С57Bl/6.

Выделение, посев и культивирование первичной смешанной культуры гиппокампа новорожденных мышат

Первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа получали от двухдневных мышат, которых подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации позвонков. Ножницами разрезали кожу у основания черепа. Отделяли голову и погружали в лоток с измельченным льдом. Извлекали мозг и помещали его в чашку Петри с охлажденным фосфатно-солевым раствором (PBS, pH 7.4). Большие полушария головного мозга разделяли под бинокулярным (Leica, Германия). Гиппокамп помещали на предметное стекло с «лункой» в каплю охлажденного PBS, измельчали на 6–8 частей и переносили в пробирку с 0.25% раствором трипсин-EDTA. Ткань трипсинизировали в 0.25% растворе трипсин-EDTA (Gibco, 25200056) в течение 20 мин при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе Binder (ФРГ). После трипсинизации проводили трехкратную отмывку клеточной суспензии в PBS (pH 7.4). К полученной суспензии добавляли 2 мл нейробазальной среды (Gibco, 21103049), содержащей 2% добавки белка B-27 (Gibco, 17504044), 0.5 мМ L-глутамакса (Gibco, 25030081), 1% ПенСтреп («ПанЭко», Россия) [10].

Первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа культивировали в восьмилуночных планшетах для анализатора клеточного метаболизма Seahorse HS mini (Agilent, США). В канавки вокруг лунок вносили по 400 мкл стерильной дистиллированной воды. Культуральные лунки В–Г покрывали 10 мкл

поли-D-лизина в концентрации 0.01 мг/мл, в лунки коррекции фона А и Н вносили по 180 мкл дистиллированной воды. Планшеты оставляли на 1 ч в ламинарном шкафу под УФ-лампой. Затем планшеты трижды промывали дистиллированной водой и высушивали в ламинарном шкафу. В каждую ячейку планшета Cell Culture Miniplates (Agilent) вносили по 80 мкл клеточной суспензии, содержащей 2×10^4 клеток гиппокампа. В три ячейки восьмилуночного планшета вносили первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа мышей *p2rx3*^{-/-}, в другие три ячейки вносили культуру клеток гиппокампа мышей с генотипом *p2rx3*^{+/+}. Число клеток для посева и выбор оптимальной концентрации FCCP для выполнения митостресс-теста определяли, выполнив предварительно калибровку прибора по оптимизации числа клеток и поиску концентрации FCCP для заданного типа клеток, согласно инструкции производителя. Клетки в планшетах выращивали в течение 3 сут с ежедневной сменой ½ порции среды.

Метаболические тесты

Для проведения метаболических тестов были сформированы две группы животных (по 30 особей в каждой) с генотипами *p2rx3*^{-/-} (опытная) и *p2rx3*^{+/+} (контрольная).

Оценка параметров митохондриального дыхания. Дыхание митохондрий измеряли на анализаторе клеточного метаболизма Seahorse Bioscience HS mini (Agilent). За 24 ч до анализа гидратировали сенсорный картридж (Agilent), заполняя его калибровочным стандартным раствором (Seahorse XF Calibrant) по 200 мкл в каждую лунку. Картридж помещали в инкубатор без CO₂ при температуре 37°C на 24 ч. Готовили аналитическую среду, используя среду Seahorse XF DMEM Media, содержащую глюкозу в конечной концентрации 10 мМ, пируват 1 мМ и L-глутамин 2 мМ, согласно рекомендациям производителя. Для оценки митохондриальной функции использовали набор MitostressTest kit. Стоковые растворы готовили согласно инструкции производителя. Набор включает олигомицин, FCCP, смесь ротенона и антимицина А. В эксперименте готовили рабочие растворы в конечной концентрации на лунку: олигомицин – 1 мкМ, FCCP – 2.5 мкМ, ротенон/антимицин А – 0.5 мкМ. Митострессоры вводили в клеточные культуры инъекционно через порты сенсорного картриджа Cartridge Agilent Seahorse XFp (Agilent, США). Выполняли калибровку картриджа, а затем меняли калибровочную тарелку на тарелку с клетками и измеряли скорость потребления кислорода (OCR), отражающую степень митохондриального дыхания в клетке. Выполняли по три технических

измерения в каждой опытной и контрольной ячейке. Данные нормировали по числу клеток. Используя программный продукт Multi-File Seahorse XF Mitostress test (США), рассчитывали базальное дыхание, утечку протонов, максимальное дыхание, запасную дыхательную емкость, немитохондриальное дыхание, продукцию АТР, коэффициент сопряжения дыхания. Немитохондриальное дыхание оценивали как минимальное измеренное значение OCR после инъекции смеси ротенон/антимидин А. Базальное дыхание рассчитывали как последнее значение параметра OCR, измеренное до первой инъекции за вычетом немитохондриального дыхания. Максимальное дыхание вычисляли как разницу между максимальными значениями OCR после инъекции FCCP и немитохондриальным дыханием. Потерю протонов рассчитывали как минимальное значение OCR после инъекции олигомицина за вычетом немитохондриального дыхания. Продукцию АТР рассчитывали после добавления олигомицина по разнице между последним значением OCR, измеренным до инъекции олигомицина и минимальным значением OCR после инъекции олигомицина. Запасную дыхательную емкость митохондрий рассчитывали как разницу между максимальным и базальным дыханием. Коэффициент эффективности дыхания вычисляли как отношение продукции АТР к базальному дыханию.

Изучение биоэнергетического баланса клетки. Энергетический фенотип нейронов оценивали с использованием набора Cell Energy Phenotype (Kit 103325-100, Agilent). В наборе использовали олигомицин (ингибитор АТР-синтазы) в конечной концентрации 100 мкМ и FCCP (митохондриальный разобщитель) в конечной концентрации 100 мкМ. Концентрация стрессового раствора олигомицин/FCCP, которую вносили в порт картриджа, составляла 1.0/1.0 мкМ. По результатам измерений с помощью программного продукта Multi-File Seahorse XF Cell Energy Phenotype (США) рассчитывали стрессовый OCR и ECAR согласно формулам:

$$\text{Stressed OCR} = \frac{\text{Stressed OCR}}{\text{Baseline OCR}} \times 100, \quad (1)$$

$$\text{Stressed ECAR} = \frac{\text{Stressed ECAR}}{\text{Baseline ECAR}} \times 100, \quad (2)$$

где *Stressed OCR* – стрессовый фенотип по скорости поглощения кислорода, %;

Stressed ECAR – стрессовый фенотип по скорости закисления среды, %;

Stressed OCR/ECAR – скорость поглощения кислорода / скорость закисления среды после внесения в среду митострессоров (смесь олигомицина и FCCP);

Baseline OCR/ECAR – скорость поглощения кислорода / скорость закисления среды до внесения стрессоров.

Гликотест-стресс. Анализ проведен с использованием набора Glycolysis Stress Test.

В наборе использовали глюкозу в конечной концентрации 10 мМ, олигомицин (1 мкМ) и 2-дезоксиглюкозу (500 мМ), которые инъецировали в клеточные культуры через порты сенсорного картриджа Cartridge Agilent (Seahorse XfP). Выполняли калибровку картриджа, а затем меняли калибровочную тарелку на тарелку с клетками и измеряли скорость закисления среды (ECAR). Данные нормировали по числу клеток. Используя программный продукт Multi-File Seahorse XF Glycotest (США), рассчитывали скорость гликолиза, гликолитическую емкость нейронов, гликолитический резерв и негликолитическое заселение. Скорость гликолиза рассчитывали как разницу между максимальным значением ECAR до инъекции олигомицина и последним измерением ECAR до инъекции глюкозы. Гликолитическую емкость оценивали как разницу между максимальным измеренным ECAR после инъекции олигомицина и последним измерением ECAR до инъекции глюкозы. Гликолитический резерв оценивали как гликолитическую емкость, деленную на скорость гликолиза (мрН/пмоль/мин/клетка) и умноженную на 100%. Негликолитическое закисление учитывали как последнее измерение ECAR до инъекции глюкозы. Все метаболические тесты выполняли в четырех повторностях по три технических измерения в каждой.

Статистический анализ

Экспериментальные данные обрабатывали, используя программное обеспечение Wave 2.6 (США), а также пакет описательной статистики Excel 10.0. Экспериментальные данные представлены медианой и стандартным отклонением ($M \pm SD$). Учитывая, что все полученные числовые данные не подчиняются гипотезе нормального распределения, статистическую значимость полученных результатов оценивали с использованием критерия Манна–Уитни для выборок с числом измерений $n \leq 20$. Критическим уровнем значимости считали $p = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У трансгенных животных был изучен энергетический фенотип первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа. В тестах данного типа надежным индикатором скорости гликолиза является скорость закисления среды (ECAR). Однако, когда высокоаэробные клетки подвергаются стрессу, продукция углекислого газа митохондриями может провоциро-

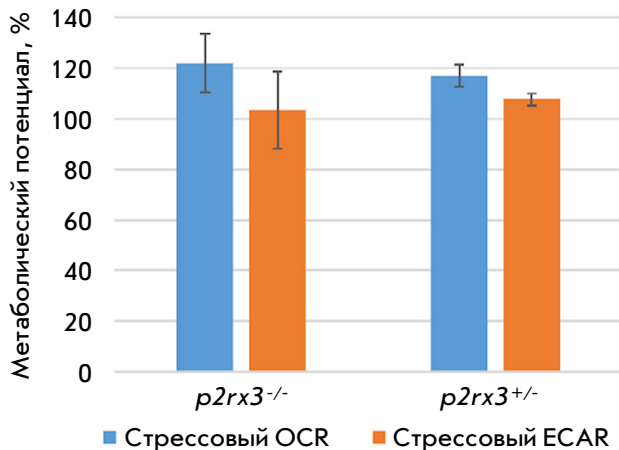


Рис. 2. Метаболический потенциал первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа трансгенных мышей с нокаутом гена $p2rx3$

вать усиление ECAR [11] и увеличивать вклад гликолиза в метаболический потенциал. С помощью этого теста оценили восприимчивость клеток гиппокампа полученных трансгенных мышей к этому эффекту. Показано, что нейроны гиппокампа трансгенных животных как гомозиготных, так и гетерозиготных данному эффекту не подвержены. Энергетический фенотип митохондриального дыхания первичной смешанной культуры гиппокампа нейронов трансгенных животных – аэробное дыхание, основу которого составляет окислительное фосфорилирование. В первичной смешанной культуре нейронов гиппокампа, полученных от мышей $p2rx3^{-/-}$, соотношение скорости потребления кислорода (OCR) к скорости закисления среды (ECAR) составило 1.2, у мышей с генотипом $p2rx3^{+/-}$ – $OCR/ECAR = 1.1$. Явно выраженных различий в метаболическом фенотипе нейронов гиппокампа между исследуемыми группами животных не обнаружено (рис. 2).

При изучении особенности митохондриального дыхания получили кривые скорости поглощения

кислорода в режиме реального времени (приложение рис. 1SA). Установлено увеличение практически всех параметров митохондриального дыхания за исключением запасной дыхательной емкости, полученной от гомозигот $p2rx3^{-/-}$ (табл. 1).

Согласно данным табл. 1, в культуре нейронов, полученных от мышей $p2rx3^{-/-}$, существенно возрас-тали немитохондриальное, базальное и максимальное дыхание, а также дыхательный резерв, соответственно, на 52.4% ($p < 0.05$), 72.3% ($p < 0.05$) и 61.3% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. Для культуры нейронов гиппокампа, полученной от мышей $p2rx3^{-/-}$, было характерно повышение продукции АТР на 84.4% ($p < 0.05$), дыхательного резерва – на 36% ($p < 0.05$) и коэффициента эффективности дыхания – на 43% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем. Вследствие высокой интенсивности митохондриального дыхания запасная дыхательная емкость первичной смешанной культуры гиппокампа мышей $p2rx3^{-/-}$ снижена на 36.6% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем.

В первичной смешанной культуре нейронов гиппокампа мышей $p2rx3^{-/-}$ скорость гликолиза и гликолитическая емкость существенно снижены – на 75.7% ($p < 0.05$) и 78.6% ($p < 0.05$) – по сравнению с аналогичными показателями у мышей с генотипом $p2rx3^{+/-}$ (рис. 3).

Гликолитический резерв нейронов гиппокампа мышей $p2rx3^{-/-}$ повышен практически в 2 раза: $351.3 \pm 158.2\%$ против $163.2 \pm 60.5\%$ в культуре гиппокампа мышей $p2rx3^{+/-}$ (гликолитические кривые, полученные в режиме реального времени, представлены в приложении рис. 1SB).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа, полученной как от животных с генотипом $p2rx3^{-/-}$, так и с $p2rx3^{+/-}$, характерен аэробный тип дыхания, когда клетка использует преимущественно окислительное фосфорилирование. Установленный

Таблица 1. Параметры митохондриального дыхания культуры нейронов гиппокампа мышей с нокаутом гена $p2rx3$

Параметр	$p2rx3^{+/-}$ (контроль)	$p2rx3^{-/-}$ (опыт)	U-критерий Укрит ≤ 17
Немитохондриальное дыхание, пмоль/мин/клетка	27.1 ± 5.3	$56.9 \pm 18.0^*$	0
Базальное дыхание, пмоль/мин/клетка	65.9 ± 12.2	$238.1 \pm 7.9^*$	0
Максимальное дыхание, пмоль/мин/клетка	124.3 ± 8.9	$320.9 \pm 18.5^*$	0
Потеря протонов (H^+), пмоль/мин/клетка	14.5 ± 8.1	40.4 ± 16.4	19
АТР-продукция, пмоль/мин/клетка	36.1 ± 12.8	$231.5 \pm 9.9^*$	0
Дыхательный резерв, пмоль/мин/клетка	56.0 ± 16.4	$87.4 \pm 14.3^*$	0
Запасная дыхательная емкость, %	188.3 ± 45.20	$137.8 \pm 7.2^*$	0
Коэффициент эффективности дыхания, %	58.8 ± 21.6	$103.4 \pm 10.4^*$	1

*Достоверность различий при $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

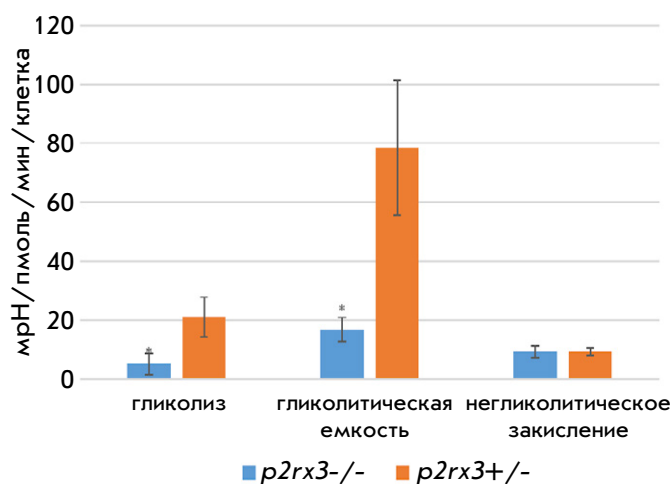


Рис. 3. Показатели гликолитической функции первичной смешанной культуры нейронов гиппокампа мышей с нокаутом гена *p2rx3*. * – достоверность различий при $p < 0.05$ по сравнению с гетерозиготами

в эксперименте аэробный тип метаболизма нейронов гиппокампа и отсутствие переключения энергетического фенотипа при введении стрессоров митохондриального дыхания указывает на повышенную биоэнергетическую функцию митохондрий.

Мы установили, что нейроны гиппокампа мышей с нокаутом гена *p2rx3*^{-/-} имеют повышенное базальное и немитохондриальное дыхание по сравнению с нейронами гиппокампа, полученными от мышей *p2rx3*^{+/-}. Наши результаты также показывают, что нейроны гиппокампа *p2rx3*^{-/-} имеют высокий уровень продукции АТФ и сниженную скорость гликолиза и гликолитической емкости, которая фактически характеризует максимальную способность генерировать АТФ в процессе гликолиза. Полученные данные свидетельствуют, что нейроны гиппокампа с нокаутом гена *p2rx3*^{-/-} в базальном состоянии работают уже близко к максимуму своей митохондриальной энергетической мощности. Сочетание интенсивного митохондриального дыхания вместе с утечкой протонов, которые направляются на производство активных форм кислорода (АФК), на фоне сниженной запасной дыхательной емкости указывает на снижение способности нейронов справляться со значительными колебаниями в биоэнергетических потребностях при различных клеточных стрессах, а также при старении. Усиление окислительного фосфорилирования в нейронах является основной причиной повышенного уровня АФК [12]. Основной вопрос заключается в том, вследствие чего нейроны с нокаутом гена *p2rx3* имеют такие большие энергетические потребности. Согласно опубликованным данным, более высокие энергетические

потребности имеют нейроны дофаминовой субстанции мышей с болезнью Альцгеймера [13]. Такие энергозатраты связаны с большим аксональным разветвлением, которое требует высокоэффективной продукции митохондриального АТФ за счет увеличения плотности митохондрий в терминалях [13]. Мы не определяли степень ветвления нейронов у полученных трансгенных мышей, поэтому, исходя из опубликованных данных, можем только выдвинуть гипотезу о роли ионотропных рецепторов в усилении биоэнергетики нейронов гиппокампа.

Ген *p2rx3* кодирует рецептор P2X3, который экспрессируется в разных областях мозга, в том числе в пирамидных нейронах, зубчатых гранулярных клетках и интернейронах гиппокампа [14]. Учитывая, что гиппокамп является ключевой структурой мозга, связанной с формированием долговременной памяти, изменения активности ионотропных рецепторов – пуринергических (P2X) и глутаматергических (NMDA) – могут модулировать пластичность и гиппокамп-зависимое обучение, а также память. Эта пластичность основана на активации гиппокампальных киназ и изменении уровня внутриклеточного кальция [15]. Описаны перекрестные взаимодействия рецепторов семейства P2X с NMDA. Доказано, что активация рецепторов семейства P2X ингибирует токи Ca^{2+} через рецепторы семейства NMDA. Функциональное значение такого взаимодействия связано с тем, что рецепторы P2X служат низкочастотными фильтрами кальциевого сигнала в условиях физиологического покоя, когда для входа кальция не требуется деполяризация мембраны, как в случае с рецепторами NMDA [3]. У мышей с нокаутом гена *p2rx3* наблюдалось нарушение долговременной депрессии в синапсах гиппокампа CA1, CA3 и зубчатых гранулярных клетках, а также лучшая способность к обучению и ориентации в пространстве [5]. Ингибирование рецепторов семейства P2X (семейства P2X3, P2X4, P2X6) усиливает индукцию долговременной памяти [3]. Известно, что во время долгосрочной потенциации, лежащей в основе памяти и обучения, изменяется выработка энергии в митохондриях [16], увеличивается активность митохондриального кальциевого насоса [17] и усиливается экспрессия митохондриальных генов [18]. Блокирование митохондриального окислительного фосфорилирования приводит к значительному ухудшению долгосрочной депрессии синапсов [19]. Выработка энергии в митохондриях имеет решающее значение для высвобождения транмиттеров посредством экзоцитоза везикул, мобилизации везикул резервного синаптического пула и регуляции синаптической силы [20]. Не исключено, что повышенные биоэнергетические потребности нейронов могут

быть связаны с чрезмерной активацией NMDA-рецепторов. Согласно [21], активация рецепторов NMDA увеличивает объем шипиков в культивируемых нейронах гиппокампа и повышает поверхностную экспрессию рецепторов AMPA (альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота). Описана регуляция деления митохондрий в дендри-тах, сопровождающаяся увеличением содержания Ca^{2+} в митохондриальном матриксе, опосредованного активацией Ca^{2+} и кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CAМК II) [22]. Показана локализация NMDA-подобного рецептора на мембране митохондрий, который усиливает активность АТФ-синтазы и выработку АТФ нейронами [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в работе результаты свидетельствуют о том, что у мышей с нокаутом гена *p2rx3* повышена биоэнергетическая функция митохондрий. Для трансгенных мышей с генотипом *p2rx3*^{-/-} характерен аэробный тип митохондриального дыхания, высокая продукция АТФ, повышенное базальное и немитохондриальное дыхание, усиление потери протонов, достаточно высокий уровень коэффициента эффективности дыхания, при этом запасная дыхательная емкость митохондрий, скорость гликолиза

и гликолитическая емкость снижены. Полученные данные указывают на работу митохондрий, близкую к максимуму своей энергетической мощности. Не исключено, что такая активация энергетического метаболизма клетки связана с реципрокными взаимодействиями между ионотропными пуринергическими и глутаматергическими рецепторами. Важным и открытым остается вопрос о том, как будет изменяться биоэнергетический баланс нейронов гиппокампа у животных с нокаутом гена *p2rx3* на фоне блокады NMDA-рецепторов. Понимание взаимодействий между пуринергическими и глутаматергическими рецепторами имеет важное значение, поскольку эти рецепторы вовлечены в определенные типы гиппокамп-зависимой памяти. Животные с нокаутом гена *p2rx3* являются уникальной моделью для поиска фармакологических мишеней, направленных на коррекцию энергетического метаболизма клеток головного мозга и устраняющих когнитивные дисфункции. ●

*Научное исследование проведено
при поддержке Российского научного фонда
(грант № 23-24-00600).*

*Приложения доступны на сайте
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27551>*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rubin R.D., Watson P.D., Duff M.C., Cohen N.J. // *Front. Hum. Neurosci.* 2014. V. 8. P. 742.
- Lalo U., Pankratov Y. // *Neuropharmacology.* 2023. V. 229. P. 109477.
- Pankratov Y.V., Lalo U.V., Krishtal O.A. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 19. P. 363–369.
- Wang Y., Mackes J., Chan S., Haughey N.J., Guo Z., Ouyang X., Furukawa K., Ingram D.K., Mattson M.P. // *J. Neurochem.* 2006. V. 99. № 5. P. 1425–1434.
- Zhou X., Ma L.M., Xiong Y., Huang H., Yuan J.X., Li R.H., Li J.N., Chen Y.M. // *Neurochem. Res.* 2016. V. 41. № 6. P. 1263–1273.
- Oparin P., Khokhlova O., Cherkashin A., Nadezhdin K., Palikov V., Palikova Y., Korolkova Y., Mosharova I., Rogachevskaja O., Baranov M., et al. // *Mol. Ther.* 2025. V. 33. № 2. P. 771–785.
- Gurskiy Y.G., Garbuz D.G., Soshnikova N.V., Krasnov A.N., Deikin A., Lazarev V.F., Sverchinsky D., Margulis B.A., Zatsepina O.G., Karpov V.L., et al. // *Cell Stress Chaperones.* 2016. V. 21. № 6. P. 1055–1064.
- Silaeva Y.Y., Kirikovich Y.K., Skuratovskaya L.N., Deikin A.V. // *Russ. J. Develop. Biol.* 2018. V. 49. № 6. P. 356–361.
- Kalmykov V.A., Kusov P.A., Yablonskaia M.I., Korshunov E.N., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Silaeva Y.Yu., Deykin A.V., Lukyanov N.E. // *Research Results in Pharmacology.* 2018. V. 4. № 4. P. 115–122. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.4.32209>
- Zelentsova A.S., Borisova A.Y., Shmigerova V.S., Skorkina M.Y., Deykin A.V. // *Genes and Cells.* 2024. V. 19. № 1. P. 201–210. doi: 10.17816/gc529662
- Vohwinkel C.U., Lecuona E., Sun H., Sommer N., Vadász I., Chandel N.S., Sznajder J.I. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 43. P. 37067–37076.
- Hill B.G., Benavides G.A., Lancaster J.R. Jr., Ballinger S., Dell'Italia L., Jianhua Z., Darley-Usmar V.M. // *Biol. Chem.* 2012. V. 393. № 12. P. 1485–1512.
- Pacelli C., Giguère N., Bourque M.J., Lévesque M., Slack R.S., Trudeau L.É. // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. № 18. P. 2349–2360.
- Jang I.S., Rhee J.S., Kubota H., Akaike N., Akaike N. // *J. Physiol.* 2001. V. 536. P. 505–519.
- Medina J.H., Viola H. // *Front. Mol. Neurosci.* 2018. V. 11. P. 361.
- Wieraszko A. // *Brain Res.* 1982. V. 237. № 2. P. 449–457.
- Stanton P.K., Schanne F.A. // *Brain Res.* 1986. V. 382. № 1. P. 185–188.
- Williams J.M., Thompson V.L., Mason-Parker S.E., Abraham W.C., Tate W.P. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998. V. 60. № 1. P. 50–56.
- Cunha R.A., Vizi E.S., Ribeiro J.A., Sebastião A.M. // *J. Neurochem.* 1996. V. 67. № 5. P. 2180–2187.
- Ivannikov M.V., Sugimori M., Llinás R.R. // *J. Mol. Neurosci.* 2013. V. 49. № 1. P. 223–230.
- Divakaruni S.S., van Dyke A.M., Chandra R., LeGates T.A., Contreras M., Dharmasri P.A., Higgs H.N., Lobo M.K., Thompson S.M., Blanpied T.A. // *Neuron.* 2018. V. 100. № 4. P. 860–875.e7.
- Duarte F.V., Ciampi D., Duarte C.B. // *Cell Mol. Life Sci.* 2023. V. 80. № 6. P. 173.
- Korde A.S., Maragos W.F. // *Mitochondrion.* 2021. V. 59. P. 76–82.

УДК 615.017

Дизайн, синтез и оценка биологической активности гидроксамовых производных сорафениба

А. А. Клеймёнова¹, И. А. Абрамов¹, Я. В. Ткачев¹, П. С. Галеева¹, В. А. Клеймёнова²,
Н. Ф. Закирова¹, С. Н. Кочетков¹, М. В. Козлов^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*E-mail: kozlovmavi@gmail.com

Поступила в редакцию 26.11.2024

Принята к печати 13.05.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27566

РЕФЕРАТ Получены гидроксамовые производные ингибитора тирозиновых протеинкиназ сорафениба, в структуру которого были введены элементы фармакофора ингибиторов цинкзависимых гистондеацетилаз. Показано, что подавление пролиферации опухолевых клеток полученными гибридными ингибиторами критически зависит от структуры «деацетилазной» компоненты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА сорафениб, вориностат, тирозиновые протеинкиназы, цинкзависимые гистондеацетилазы, антипролиферативная активность, гибридные ингибиторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PTKs – тирозиновые протеинкиназы; HDACs – цинкзависимые гистондеацетилазы; B-RAF – сигнальная тирозинкиназа; SRF – сорафениб; DMSO-d⁶ – дейтерированный диметилсульфоксид; IC₅₀ – концентрация, вызывающая 50% снижение количества клеток; АМС – 7-амино-4-метилкумарин.

ВВЕДЕНИЕ

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) – одна из самых трудноизлечимых гетерогенных форм рака [1]. В качестве препарата первой линии для лечения поздних неоперабельных стадий заболевания хорошо зарекомендовал себя сорафениб (*SRF*, рис. 1) – мультипотентный ингибитор тирозиновых протеинкиназ (PTKs): сигнальной RAF, рецепторных тирозинкиназ VEGFR и PDGFR и некоторых других [2]. Однако длительное применение сорафениба неэффективно из-за приобретенной или наследственной резистентности у части трансформированных гепатоцитов [3].

Совместное применение сорафениба с мультипотентными ингибиторами цинкзависимых гистондеацетилаз (HDACs) является перспективным направлением лечения ГЦК, так как многие ингибиторы HDACs демонстрируют не только антипролиферативную активность сами по себе, но и синергичное действие в комбинации с сорафенибом [4]. Так, например, сочетание сорафениба с вориностатом (*SAHA*, рис. 1) эффективно инициирует апоптоз в клетках гепатомы [5], а комбинация с вальпроевой кислотой (VPA) сильно замедляет возникновение устойчивости [6]. По сравнению с сочетанным применением двух препаратов мономолекулярные гибриды

имеют более предсказуемые фармакокинетические и фармакодинамические параметры, включая метаболизм и биодоступность. Кроме того, их применение гарантирует одновременную активацию нескольких противоопухолевых механизмов в опухолевом очаге в необходимом оптимальном соотношении [7]. Таким образом, создание гибридных ингибиторов PTKs/HDACs представляется весьма перспективным и актуальным направлением исследований.

В фармакофоре ингибиторов гистондеацетилаз (HDACi) в совокупности выделяют четыре элемента: (а) цинк-связывающую группу (ZBG); (б) линкер (linker), занимающий «лизиновый канал» активного центра, который ведет к каталитическому иону цинка; (в) соединительный элемент (connecting unit, CU) и (г) ароматический/гетероциклический фрагмент (cap), отвечающий за распознавание поверхности активного центра фермента у входа в «лизиновый канал» [8]. Нами синтезированы новые гибридные ингибиторы – гидроксамовые производные сорафениба, в структуру которого введены элементы фармакофора ингибиторов цинкзависимых гистондеацетилаз. Изучена антипролиферативная активность полученных соединений, а также класс-селективность ингибирования HDACs.

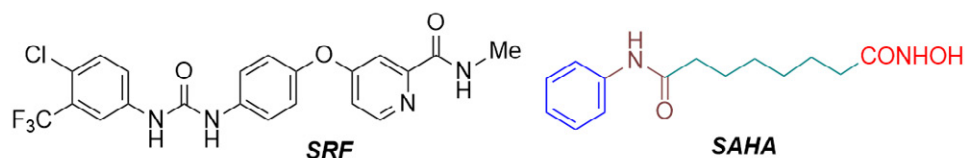
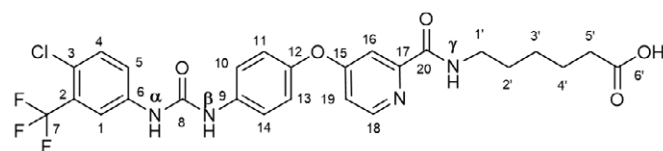


Рис. 1. Структура сорафениба (SRF) и вориностата (SAHA) с выделенными элементами фармакофора: кап (cap) – синий, соединительный элемент (CU) – коричневый, линкер (linker) – зеленый, цинк-связывающая группа (ZBG) – красный

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: аминокaproновую кислоту, 4-(аминометил)-бензойную кислоту, диазабициклоундецен (DBU), 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI), гидроксилламин гидрохлорид, гидроксилламин 50% водный раствор, гидразин гидрат – все фирмы Sigma-Aldrich (США); этиловый эфир 4-аминобензойной кислоты (Acros Organics, США) бис(2-оксо-3-оксазолидинил)фосфинхлорид (BOP-Cl) LEAPChem (КНР); 4-формил-N-гидроксibenзамид синтезирован согласно [9]. Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Kieselgel 0.060–0.200 мм фирмы Acros Organics, системы для элюции указаны в тексте. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 (Supelco, США). Спектры ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на спектрометре Avance III (Bruker, ФРГ) с рабочей частотой 300 МГц для ^1H -ЯМР (внутренний стандарт – Me_4Si , растворитель $\text{DMSO}-d_6$), 100.6 МГц для ^{13}C -ЯМР (с подавлением углерод-протонного взаимодействия, растворитель $\text{DMSO}-d_6$) и 282 МГц для ^{19}F -ЯМР (растворитель $\text{DMSO}-d_6$). Химические сдвиги приведены в миллионных долях, КССВ – в герцах. Спектры ^1H -ЯМР NOESY и ROESY записывали в сухом $\text{DMSO}-d_6$. Время смешивания, использованное при записи спектров NOESY, подбирали специально для максимизации интенсивности дипольных кросс-пиков (0.25 с).

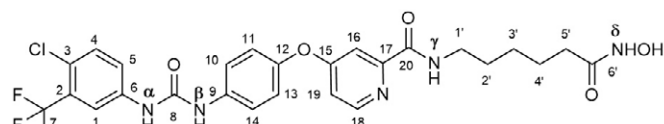
Синтез гидроксамовых производных сорафениба – SRF-CHA, SRF-BHA, SRF-THA и SRF-H-BHA



(i) SRF-CA

6-(4-(4-(3-(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)уреидо)фенокси)пиколинамид)гексановая кислота (SRF-CA). Смесь 466 мг (1 ммоль) метилового эфира сорафенибкарбоновой кислоты (SRF-ME) [10], 262 мг (2 ммоль) аминокaproновой кислоты и 383 мг (2.5 ммоль) DBU в 10 мл MeOH перемешивали при кипячении в течение 6 ч. Охлаждали

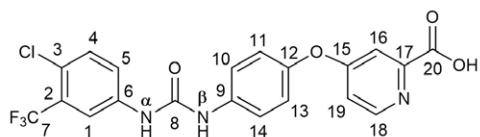
до комнатной температуры, разбавляли реакционную смесь 10 мл H_2O , нейтрализовали с помощью HCl (1:1) до pH 5–6 и охлаждали при 10°C в течение 18 ч. Выпавший осадок затирали, отфильтровывали, промывали H_2O и сушили на воздухе. Продукт выделяли хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента смесь CHCl_3 –EtOH, 10 : 1. Отобранные фракции упаривали, остаток растворяли в 3 мл CHCl_3 и охлаждали при 10°C в течение 18 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали CHCl_3 и после высушивания на воздухе получали 400 мг (71%) SRF-CA. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 11.94 (1H, с, OH), 9.20 (1H, с, NH^α), 8.97 (1H, с, NH^β), 8.76 (1H, т, J 6.0, NH^γ), 8.51 (1H, д, J 5.6, H18), 8.12 (1H, д, J 2.1, H16), 7.73–7.53 (4H, м, H4, H10 и H14, H19), 7.40 (1H, д, J 2.5, H1), 7.24–7.08 (3H, м, H5, H11 и H13), 3.26 (2H, к, J 6.5, H1'), 2.19 (2H, т, J 7.3, H5'), 1.65–1.43 (4H, м, H2' и H4'), 1.36–1.20 (2H, м, H3'). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 174.87 (C6'), 166.46 (C15), 163.60 (C20), 152.96 (C8 или C17), 152.94 (C8 или C17), 150.77 (C18), 148.35 (C12), 139.80 (C9), 137.51 (C6), 132.44 (C4 или C5), 127.21 (к, J 30.3, C2), 123.57 (C4 или C5), 123.29 (к, J 273, C7), 122.85 (C3), 121.89 (C10 и C14), 121.00 (C11 и C13), 117.33 (к, J 5.5, C1), 114.53 (C19), 109.24 (C16), 39.17 (C1'), 34.04 (C5'), 29.30 (C2'), 26.41 (C3'), 24.68 (C4'). Сигнал ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ -61.47 (CF_3).



(ii) SRF-CHA

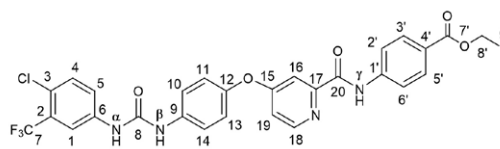
4-(4-(3-(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)уреидо)фенокси)-N-(6-(гидроксиамино)-6-оксогексил)пиколинамид (SRF-CHA). К раствору 363 мг (0.643 ммоль) SRF-CA в 0.7 мл DMF добавляли 115 мг (0.71 ммоль) CDI. Через 1 ч 40 мин добавляли 70 мг (1.00 ммоль) гидроксилламина гидрохлорида, перемешивали до растворения в течение 10 мин и оставляли на 2 ч. Разбавляли реакционную смесь 3.5 мл H_2O и охлаждали при 10°C в течение 18 ч. Супернатант декантировали, а выпавшее масло за-

тирали в 7 мл холодной воды до рыхлого осадка, отфильтровывали и подсушивали на воздухе. Продукт выделяли хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента смесь CHCl_3 –EtOH, сначала 7.5 : 1, а затем 5 : 1. Отобранные фракции упаривали и получали 262 мг (70%) *SRF-CHA*. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 10.30 (1H, с, NH^δ), 9.23 (1H, с, NH^α), 9.01 (1H, с, NH^β), 8.75 (1H, т, J 5.9, NH^γ), 8.63 (1H, с, OH), 8.51 (1H, д, J 5.5, H18), 8.13 (1H, с, H16), 7.74–7.54 (4H, м, H4, H10 и H14, H19), 7.39 (1H, д, J 2.3, H1), 7.22–7.12 (3H, м, H5, H11 и H13), 3.25 (2H, к, J 6.6, H1'), 1.94 (2H, т, J 7.3, H5'), 1.61–1.41 (4H, м, H2' и H4'), 1.34–1.17 (2H, м, H3'). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 169.57 (C6'), 166.47 (C15), 163.60 (C20), 152.95 (C8 и C17), 150.77 (C18), 148.35 (C12), 139.79 (C9), 137.51 (C6), 132.44 (C4 или C5), 127.21 (к, J 30.7, C2), 123.58 (C4 или C5), 123.29 (к, J 273, C7), 122.85 (C3), 121.89 (C10 и C14), 121.00 (C11 и C13), 117.33 (к, J 5.5, C1), 114.54 (C19), 109.24 (C16), 39.21 (C1'), 32.67 (C5'), 29.34 (C2'), 26.49 (C3'), 25.33 (C4'). Сигнал ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ -61.47 (CF_3).



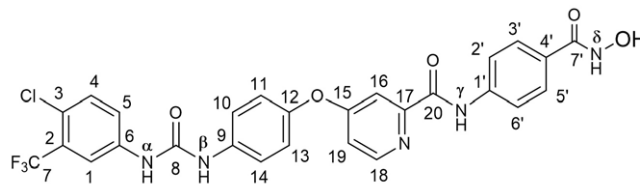
(iii) *SRF-A*

4-(4-(3-(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)уреидо)фенокси)пиколиновая кислота (SRF-A). В 12 мл смеси THF–MeOH– H_2O , 1 : 1 : 1, растворяли 0.67 г (12 ммоль) KOH и добавляли при перемешивании 2.32 г (5 ммоль) *SRF-ME* двумя равными порциями с интервалом 10 мин и после растворения исходного соединения оставляли при комнатной температуре на 1 ч. Разбавляли реакционную смесь 12 мл H_2O , нейтрализовали с помощью HCl (1 : 1) до pH $\approx$ 1.5, затирали выпавший осадок, добавляли еще 12 мл H_2O и охлаждали при 10°C в течение 1 ч. Осадок отфильтровывали, промывали H_2O и после высушивания на воздухе получали 2.20 г (97%) *SRF-A*. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 9.29 (1H, с, NH^α), 9.06 (1H, с, NH^β), 8.58 (1H, д, J 5.7, H18), 8.13 (1H, д, J 2.4, H16), 7.70–7.56 (4H, м, H4, H10 и H14, H19), 7.44 (1H, д, J 2.5, H1), 7.24–7.13 (3H, м, H5, H11 и H13). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 166.47 (C20), 165.85 (C15), 152.96 (C8), 151.19 (C18), 150.86 (C17), 148.20 (C12), 139.81 (C9), 137.65 (C6), 132.44 (C4 или C5), 127.21 (к, J 30.5, C2), 123.54 (C4 или C5), 123.28 (к, J 273, C7), 122.83 (C3), 121.84 (C10 и C14), 120.99 (C11 и C13), 117.30 (к, J 5.5, C1), 115.12 (C19), 112.32 (C16). Сигнал ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ -61.46 (CF_3).



(iv) *SRF-BEE*

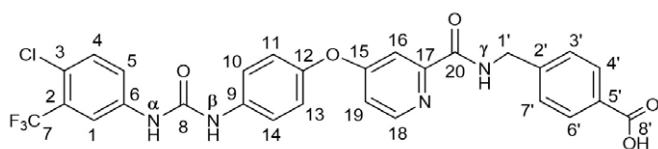
Этил 4-(4-(3-(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)уреидо)фенокси)пиколината бензоата (SRF-BEE). К суспензии 452 мг (1 ммоль) *SRF-A* в 10 мл смеси пиридин–THF, 1 : 1, добавляли 300 мг (1.18 ммоль) BOP-Cl и перемешивали в течение 10 мин, после чего добавляли 230 мг (1.39 ммоль) этилового эфира *n*-аминобензойной кислоты (АБКЭ). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1.5 ч, после чего добавляли еще 300 мг (1.18 ммоль) BOP-Cl и через 10 мин – 230 мг (1.39 ммоль) АБКЭ, продолжали перемешивание в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Добавляли 30 мл воды и перемешивали в течение 1–1.5 ч до формирования гомогенного осадка, после чего отфильтровывали, промывая водой (3 раза по 20 мл). После высушивания на воздухе осадок суспендировали в 10 мл метанола, фильтровали, промывали 5 мл метанола, фильтровали и после высушивания на воздухе получали 442 мг (74%) *SRF-BEE*. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 10.93 (1H, с, NH^γ), δ 9.22 (1H, с, NH^α), 9.01 (1H, с, NH^β), 8.64 (1H, д, J 5.6, H18), 8.13 (1H, д, J 1.9, H16), 8.05 (2H, д, J 8.8, H3' и H5'), 7.95 (2H, д, J 8.7, H2' и H6'), 7.71–7.59 (4H, м, H4, H10 и H14, H19), 7.54 (1H, д, J 2.5 H1), 7.29–7.16 (3H, м, H5, H11 и H13), 4.30 (2H, к, J 7.1, H8'), 1.32 (3H, т, J 7.1, H9'). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 166.70 (C7'), 165.75 (C15), 162.86 (C20), 152.94 (C8), 152.29 (C17), 150.94 (C18), 148.25 (C12), 142.97 (C1'), 139.78 (C9), 137.62 (C6), 132.43 (C4 или C5), 130.46 (C3' и C5'), 127.20 (к, J 30.5, C2), 125.48 (C4'), 123.57 (C4 или C5), 123.28 (к, J 273, C7), 122.85 (C3), 121.88 (C10 и C14), 121.02 (C11 и C13), 120.20 (C2' и C6'), 117.31 (к, J 5.4, C1), 115.19 (C19), 110.02 (C16), 60.93 (C8'), 14.63 (C9'). Сигнал ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ -61.44 (CF_3).



(v) *SRF-BHA*

4-(4-(3-(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)уреидо)фенокси)-N-(4-(гидроксикарбамоил)-фенил)пиколинамид (SRF-BHA). К раствору 300 мг (0.50 ммоль) *SRF-BEE* в 7.5 мл смеси MeOH–THF, 1 : 2, добавляли

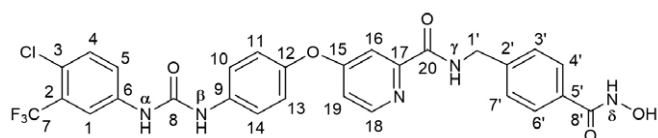
500 мг (7.58 ммоль) NH_2OH (50%), охлаждали до 0°C и добавляли 56 мг (1.00 ммоль) KOH , растворенного в 1 мл MeOH . Через 30 мин убирали охлаждение и оставляли на 18 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли 28 мг (0.5 ммоль) KOH , растворенного в 0.5 мл MeOH . Через 30 мин убирали охлаждение и оставляли на 3 ч, после чего добавляли 0.5 мл (8.75 ммоль) AcOH и упаривали до половины исходного объема, добавляли 4 мл MeOH и упаривали также до половины объема. Добавляли к остатку 5 мл MeOH , выпавший осадок затирали, отфильтровывали, высушивали на фильтре и последовательно промывали два раза по 3 мл 2% раствора триэтиламина в MeCN , 3 мл MeCN и 3 мл CH_2Cl_2 , высушивали на воздухе и получали 230 мг (71%) *SRF-BHA*. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 11.13 (1H, с, NH^δ), δ 10.82 (1H, с, NH^γ), δ 9.28 (1H, с, NH^α), δ 9.07 (1H, с, NH^β), δ 8.96 (1H, с, OH), 8.63 (1H, д, J 5.6, H18), 8.13 (1H, д, J 2.0, H16), 7.96 (2H, д, J 8.7, H3' и H5'), 7.75 (2H, д, J 8.7, H2' и H6'), 7.71–7.58 (4H, м, H4, H10 и H14, H19), 7.53 (1H, д, J 2.5, H1), 7.29–7.16 (3H, м, H5, H11 и H13). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 166.73 (C7'), 164.35 (C15), 162.86 (C20), 152.97 (C8), 152.43 (C17), 150.94 (C18), 148.26 (C12), 141.18 (C1'), 139.82 (C9), 137.65 (C6), 132.45 (C4 или C5), 128.51 (C4'), 128.03 (C3' и C5'), 127.21 (к, J 30.8, C2), 123.59 (C4 или C5), 123.29 (к, J 273, C7), 122.84 (д, J 1.5, C3), 121.91 (C10 и C14), 121.03 (C11 и C13), 120.16 (C2' и C6'), 117.33 (к, J 5.4, C1), 115.16 (C19), 109.93 (C16). Сигнал ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ -61.44 (CF_3).



(vi) *SRF-TA*

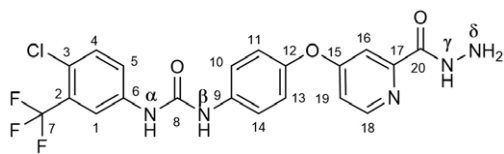
4-(4-(4-(3-(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)уреидо)фенокси)пиколинамид)метилбензойная кислота (SRF-TA). Смесь 466 мг (1 ммоль) *SRF-ME*, 302 мг (2 ммоль) 4-(аминометил)бензойной кислоты и 383 мг (2.5 ммоль) DBU в 6 мл MeOH перемешивали при кипячении в течение 14 ч. Охлаждали до комнатной температуры, разбавляли реакционную смесь 15 мл H_2O , нейтрализовали с помощью AcOH до $\text{pH} \approx 5$ –6, затирали выпавший осадок и охлаждали при 10°C в течение 4 ч. Осадок отфильтровывали, промывали H_2O и высушивали на воздухе. Продукт выделяли хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента смесь CHCl_3 – EtOH (5 : 1), с добавлением AcOH (1% от общего объема). Отобранные фракции упаривали, остаток затирали

в 10 мл MeOH , отфильтровывали, промывали 4 мл MeOH и после высушивания на воздухе получали 269 мг (46%) *SRF-TA*. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 12.82 (1H, с, OH), 9.44 (1H, т, J 6.4, NH^γ), 9.20 (1H, с, NH^α), 8.98 (1H, с, NH^β), 8.54 (1H, д, J 5.6, H18), 8.12 (1H, д, J 2.4, H16), 7.89 (2H, д, J 8.3, H4' и H6'), 7.70–7.57 (4H, м, H4, H10 и H14, H19), 7.45–7.37 (3H, м, H1, H3' и H7'), 7.24–7.13 (3H, м, H5, H11 и H13), 4.54 (2H, д, J 6.3, H1'). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 167.64 (C8'), 166.51 (C15), 164.06 (C20), 152.94 (C8 или C17), 152.67 (C8 или C17), 150.93 (C18), 148.31 (C12), 145.00 (C2'), 139.79 (C9), 137.55 (C6), 132.44 (C4 или C5), 129.83 (C4' и C6'), 129.78 (C5'), 127.75 (C3' и C7'), 127.21 (к, J 30.6, C2), 123.58 (C4 или C5), 123.29 (к, J 273, C7), 122.83 (C3), 121.91 (C10 и C14), 121.01 (C11 и C13), 117.33 (к, J 5.6, C1), 114.78 (C19), 109.46 (C16), 42.78 (C1'). Сигнал ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ -61.45 (CF_3).



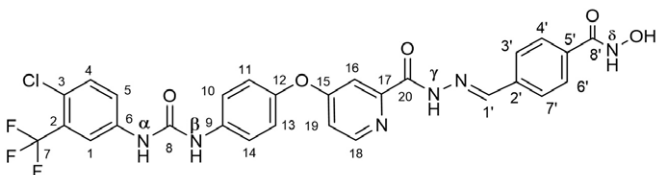
(vii) *SRF-TA*

4-(4-(4-(3-(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)уреидо)фенокси)N-(4-(гидроксикарбамоил)-бензил)-пиколинамид (SRF-TA). К раствору 275 мг (0.47 ммоль) *SRF-TA* в 0.55 мл DMF добавляли 120 мг (0.74 ммоль) CDI . Через 1 ч 30 мин добавляли 120 мг (1.73 ммоль) гидроксиламингидрохлорида, перемешивали до растворения в течение 10 мин и оставляли на 18 ч. Разбавляли реакционную смесь 7 мл H_2O , тщательно затирали осадок, через 30 мин отфильтровывали, промывали на фильтре 7 мл H_2O , высушивали на воздухе. Продукт выделяли хроматографией на силикагеле, используя в качестве элюента смесь CHCl_3 – EtOH , 7 : 1. Отобранные фракции упаривали и получали 125 мг (44%) *SRF-TA*. Спектр ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 11.14 (1H, с, NH^δ), 9.41 (1H, т, J 6.3, NH^γ), 9.23 (1H, с, OH), 9.01 (1H, с, NH^α), 8.96 (1H, с, NH^β), 8.54 (1H, д, J 5.6, H18), 8.12 (1H, д, J 1.8, H16), 7.76–7.55 (6H, м, H4, H10 и H14, H19, H4' и H6'), 7.41 (1H, д, J 2.5, H1), 7.36 (2H, д, J 8.2, H3' и H7'), 7.26–7.12 (3H, м, H5, H11 и H13), 4.50 (2H, д, J 6.3, H1'). Спектр ^{13}C -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ 166.50 (C15), 164.63 (C8'), 164.01 (C20), 152.94 (C8 или C17), 152.70 (C8 или C17), 150.93 (C18), 148.32 (C12), 143.12 (C2'), 139.79 (C9), 137.54 (C6), 132.45 (C4 или C5), 131.81 (C5'), 127.66 (C2, C4' и C6'), 127.37 (C2, C3' и C7'), 127.01 (C2), 123.58 (C4 или C5), 123.29 (к, J 273, C7), 122.84 (C3), 121.91 (C10 и C14), 121.01 (C11 и C13), 117.33 (к, J 5.4, C1), 114.77 (C19), 109.44 (C16), 42.72 (C1'). Сигнал ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): δ -61.44 (CF_3).



(viii) SRF-H

1-(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)-3-(4-((2-(гидразинкарбонил)пиридин-4-ил)окси)-фенил)мочевина (SRF-H). К суспензии 466 мг (1 ммоль) SRF-ME в 3 мл смеси MeOH–CH₂Cl₂, 2 : 1, добавляли 250 мг (5 ммоль) гидразин гидрата и перемешивали в течение 10 мин до растворения исходного соединения. Через 2 ч добавляли 2 мл MeOH и упаривали до густого сиропа, добавляли 10 мл H₂O, затирали до формирования гомогенного осадка, охлаждали при 0°C в течение 1.5 ч, отфильтровывали, промывали водой (2 раза по 3 мл), после высушивания на воздухе получали 404 мг (87%) SRF-H. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): δ 9.86 (1H, с, NH^γ), 9.19 (1H, с, NH^α), 8.97 (1H, с, NH^β), 8.48 (1H, д, *J* 5.6, H18), 8.12 (1H, д, *J* 2.3, H16), 7.72–7.55 (4H, м, H4, H10 и H14, H19), 7.38 (1H, д, *J* 2.5, H1), 7.17 (2H, д, *J* 8.9, H11 и H13), 7.12 (1H, дд, *J* 5.6 и 2.6, H5), 4.56 (2H, с, NH^δ). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): δ 166.31 (C15), 162.45 (C20), 152.94 (C8), 152.60 (C17), 150.96 (C18), 148.36 (C12), 139.79 (C9), 137.51 (C6), 132.43 (C4 или C5), 127.22 (к, *J* 30.8, C2), 123.58 (C4 или C5), 123.29 (к, *J* 273, C7), 122.86 (д, *J* 1.7, C3), 121.86 (C10 и C14), 121.01 (C11 и C13), 117.34 (к, *J* 5.7, C1), 114.33 (C19), 109.25 (C16). Сигнал ¹⁹F-ЯМР (DMSO-*d*₆): δ -61.45 (CF₃).



(ix) SRF-H-BHA

(E)-4-((2-(4-(4-(3-(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)уреидо)фенокси)пиколиноил)гидразиноилиден)-метил)-N-гидроксибензамид (SRF-H-BHA). К суспензии 233 мг (0.50 ммоль) SRF-H в 3 мл смеси MeOH–CH₂Cl₂, 2 : 1, добавляли раствор 85 мг (0.515 ммоль) 4-формил-N-гидроксибензамида [9] в 3.5 мл смеси MeOH–CH₂Cl₂, 5 : 2, и 30 мкл AcOH_{кат} и перемешивали в течение 5 мин до растворения исходного соединения. Через 4 ч выпавший осадок отфильтровывали, последовательно промыва-

ли на фильтре 10 мл EtOH и 5 мл MeOH и после высушивания на воздухе получали 258 мг (84%) SRF-H-BHA. Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆): δ 12.23 (1H, с, NH^γ), 11.27 (1H, с, NH^δ), 9.25 (1H, с, NH^α), 9.08 (1H, с, OH), 9.04 (1H, с, NH^β), 8.69 (1H, с, H1'), 8.60 (1H, д, *J* 5.6, H18), 8.13 (1H, д, *J* 2.2, H16), 7.84 (2H, д, *J* 8.4, H3' и H7'), 7.71 (2H, д, *J* 8.4, H4' и H6'), 7.71–7.59 (4H, м, H4, H10 и H14, H19), 7.50 (1H, д, *J* 2.5, H1), 7.25–7.18 (3H, м, H5, H11 и H13). Спектр ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): δ 166.56 (C15), 164.14 (C8'), 160.49 (C20), 152.96 (C8), 152.23 (C17), 151.04 (C18), 148.98 (C1'), 148.27 (C12), 139.80 (C9), 137.62 (C6), 137.23 (C2'), 134.46 (C5'), 132.48 (C4 или C5), 127.93 (C3' и C7'), 127.47 (C4' и C6'), 127.21 (к, *J* 30.7, C2), 123.63 (C4 или C5), 123.30 (к, *J* 273, C7), 122.86 (д, *J* 1.3, C3), 121.94 (C10 и C14), 121.05 (C11 и C13), 117.35 (к, *J* 5.7, C1), 115.16 (C19), 110.14 (C16). Сигнал ¹⁹F-ЯМР (DMSO-*d*₆): δ -61.43 (CF₃).

Клетки, среды и реагенты

В работе использовали линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы Huh7, Huh7.5, HepG2, PLC/PRF/5, колоректального рака HCT116, нейробластомы SH-SY5Y, промиелоцитарного лейкоза HL60 и хронического миелоидного лейкоза K562. Дифференцированные клетки линии НераRG получены согласно [11]. Сорафениб и вориностат приобретены в Selleck Chemicals, флуорогенные субстраты Boc-Lys(АсyI)-АМС получены как описано ранее [12].

Определение жизнеспособности адгезионных клеток

Линии адгезионных клеток пересекали в 96-луночные культуральные планшеты так, чтобы через 24 ч после посева конфлюентность клеток составляла 50–60%. Клетки инкубировали с исследуемыми ингибиторами в различных концентрациях в течение 48 ч и определяли жизнеспособность клеток с помощью набора Cell Proliferation Kit I (MTT-тест) в соответствии с указаниями производителя (Sigma-Aldrich, США). Оптическую плотность продукта восстановления, формазана, измеряли с помощью многофункционального ридера Spark (Tecan Trading, Швейцария) на длине волны 544 нм. Проводили не менее шести повторов с каждой концентрацией ингибиторов.

Определение жизнеспособности дифференцированных клеток НераRG

Недифференцированные клетки линии НераRG пересекали в 96-луночные культуральные планшеты (~ 5 × 10⁴ клеток на лунку) и инкубировали как описано ранее [11]. По достижении клетками 100% кон-

флюоентности осуществляли их дифференцировку, для чего планшеты с клетками выдерживали в течение 14 дней со сменой среды 1 раз в 7 дней, затем выдерживали в течение 14 дней в среде, содержащей 1.8% DMSO (Sigma), со сменой среды 1 раз в 7 дней. По завершении дифференцировки (28 дней) заменяли среду на среду, содержащую 1.8% DMSO и тестируемые вещества в исследуемых концентрациях, и инкубировали в течение 72 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста как описано выше. С каждой концентрацией ингибиторов проводили не менее восьми повторов.

Определение жизнеспособности клеток в суспензионной культуре

Суспензию клеток пересевали в 96-луночные культуральные планшеты ($\sim 1.5 \times 10^4$ клеток на лунку). Через 24 ч после посева клетки инкубировали с различными концентрациями исследуемых ингибиторов в течение 48 ч, после чего добавляли 10 мкл раствора резазурина в PBS (2 мг/мл) и выдерживали в CO_2 -инкубаторе в течение 4 ч. Флуоресценцию продукта восстановления, резазурина, измеряли с помощью многофункционального ридера Spark (Tecan Trading, Швейцария) на длинах волн $571_{\text{ex}}/584_{\text{em}}$ нм. Для каждой концентрации ингибиторов делали не менее шести повторов.

Клеточная система тестирования силы и селективности ингибирования HDAC

Клетки НСТ116 пересевали в 96-луночные культуральные планшеты так, чтобы через 24 ч после посева конfluence клеток составляла 70–80%. Клетки инкубировали с различными концентрациями исследуемых ингибиторов в течение 24 ч. Затем три четверти объема из каждой лунки удаляли и заменяли тем же объемом клеточной среды, содержащим как ингибитор в той же концентрации, так и один из трех субстратов, т.е. $\text{Sub}^{\text{Ac/Pro/Tfa}}$, в концентрации 30 мкМ. После дополнительной 4-часовой инкубации аликвоты культуральной жидкости переносили в планшет для измерения флуоресценции (SPL Life Sciences, Республика Корея), разбавляли в 2 раза раствором трипсина (2 мг/мл в буфере Трис-НСl pH 8.0) и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Флуоресценцию измеряли с помощью многофункционального ридера Spark (Tecan Trading) на длинах волн $360_{\text{ex}}/470_{\text{em}}$ нм. Интенсивность флуоресценции в каждой лунке нормализовали на значения цитотоксичности, полученные для той же лунки. Величину флуоресцентного сигнала (RFU) для каждой концентрации испытуемого соединения рассчитывали по приведенной ниже формуле:

$$\text{RFU} = \frac{\sum_n (F_i - F_0)}{C_v \cdot n};$$

где F_i — величина флуоресценции в лунке с пробой, F_0 — величина флуоресценции в лунке с растворенным в среде субстратом без клеток, C_v — жизнеспособность клеток, а n — количество повторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн структуры гидроксамовых производных сорафениба

При конструировании гибридных ингибиторов (ГИ) мы руководствовались желанием максимально сохранить структуру сорафениба в качестве заведомо сильной «киназной» компоненты и использовать в составе «деацетилазной» компоненты остатки гидроксамовых кислот, n -гексановой и бензойной, характерных для высокоэффективных HDACi (рис. 2). Чтобы выполнить оба требования, местом стыковки «киназной» и «деацетилазной» компонент был выбран пиколинамидный остаток сорафениба, по данным кристаллографии экспонированный к выходу из сайта связывания сорафениба с активным центром киназы B-RAF [13]. Мы рассчитывали, что «деацетилазный» фрагмент гибридного ингибитора — линкер-ZBG — не создаст стерических препятствий для взаимодействия с B-RAF.

Синтез гидроксамовых производных сорафениба

В соответствии со схемой синтеза (рис. 2) для получения всех ГИ в качестве исходного соединения использовали метиловый эфир сорафенибкарбоновой кислоты *SRF-ME*, получение которого описано ранее [10]. Этот пиколиновый эфир оказался существенно активированным, так что образование амидной связи с аминогруппой ϵ -аминокапроновой и 4-(аминометил)бензойной кислот достигалось кипячением в метаноле в присутствии сильного основания (DBU). Конверсию полученных карбоновых кислот *SRF-CA* и *SRF-TA* в соответствующие гидроксаматы *SRF-CHA* и *SRF-THA* осуществляли обработкой CDI и гидроксидом гидроксилamina как описано ранее [14].

Высокая реакционная способность *SRF-ME* позволила нам в ходе мягкого щелочного гидролиза получить сорафенибкарбоновую кислоту *SRF-A* с практически количественным выходом по аналогии с [15], однако процедура выделения была нами существенно упрощена. Амидирование *SRF-A* этил n -аминобензоатом в присутствии конденсирующего реагента BOP-Cl дало промежуточный сложный эфир *SRF-BEE*, из которого путем гидроксамидолиза был приготовлен целевой гидроксамат *SRF-BHA* (рис. 2).

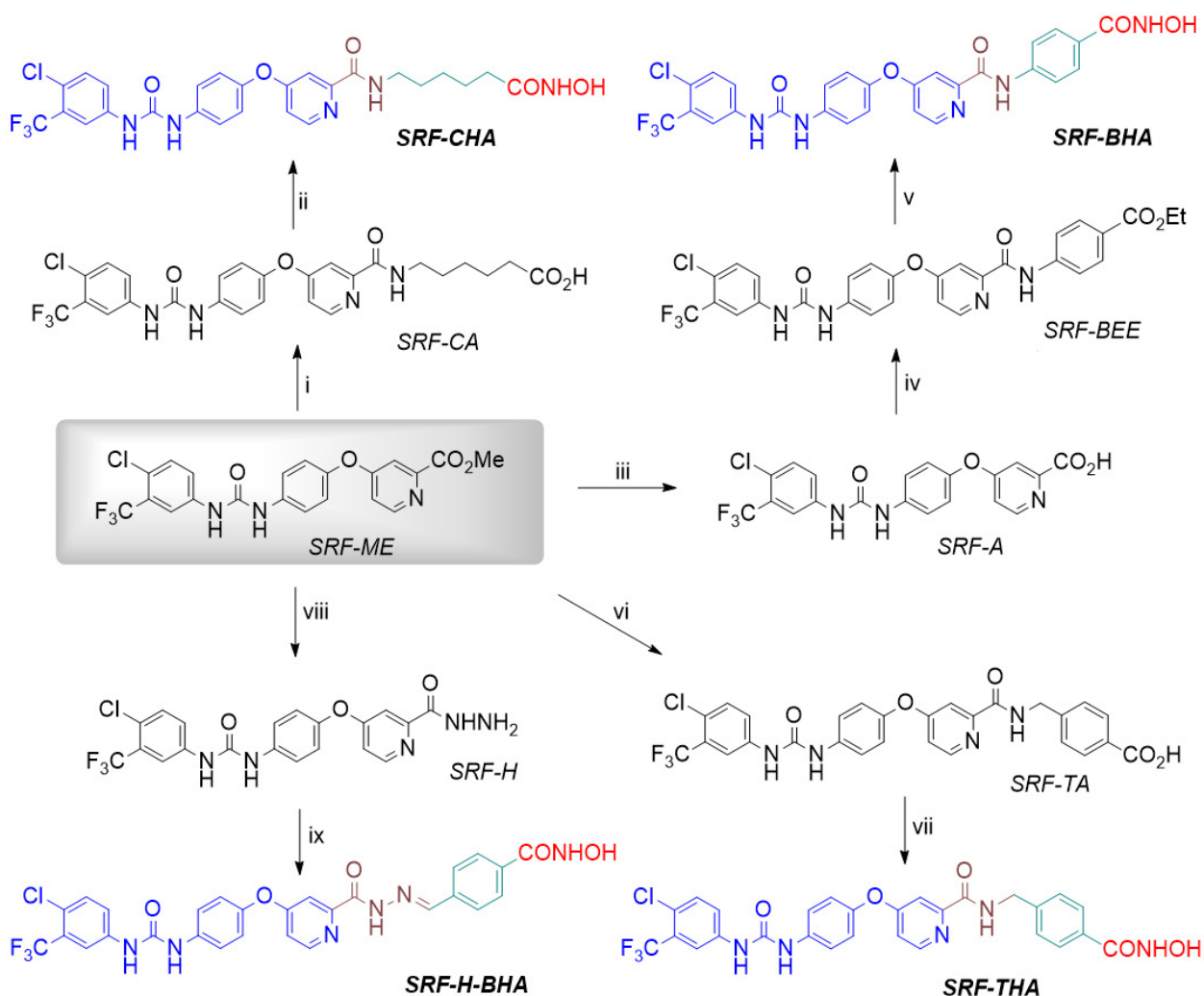


Рис. 2. Схема синтеза гидроксамовых производных сорафениба: **SRF-CHA**, **SRF-BHA**, **SRF-TA** и **SRF-H-BHA** (кеп – синий, соединительный элемент (CU) – коричневый, линкер (linker) – зеленый, цинк-связывающая группа (ZBG) – красный). Реагенты, условия и выход (%): (i) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2\text{H}$, DBU, MeOH, D, 6 ч (71%); (ii) CDI, DMF, 2 ч, затем $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, 18 ч (70%); (iii) KOH, THF/MeOH/ H_2O , 1 ч (97%); (iv) $p\text{-NH}_2\text{PhCO}_2\text{Et}$, BOP-Cl, THF/ Py , 3 ч (74%); (v) NH_2OH , MeOH/THF, 0°C, 0.5 ч, затем 18 ч (71%); (vi) $p\text{-NH}_2\text{CH}_2\text{PhCO}_2\text{H}$, DBU, MeOH, D, 14 ч (46%); (vii) CDI, DMF, 1.5 ч, затем $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, 18 ч (44%); (viii) $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, MeOH/ CH_2Cl_2 , 2 ч (87%); (ix) $p\text{-(CHO)-PhCONHOH}$, $\text{AcOH}_{\text{кат}}$, MeOH/ CH_2Cl_2 , 4 ч (84%)

Так же гладко, как и в [10], но несколько быстрее протекал гидролиз **SRF-ME**, а полученный гидразид сорафенибкарбоновой кислоты **SRF-H** в ходе клик-реакции с 4-формил-N-гидроксибензамидом [9] давал требуемый **SRF-H-BHA** в виде (*E*)-изомерного пиколиноилгидразона (рис. 2 и 3). Заметим, что в структуре всех синтезированных нами гибридных ингибиторов был сохранен N-монозамещенный пиколинамидный фрагмент сорафениба (PyCONHR), который, по данным кристаллографии, в составе комплекса взаимодействует с пептидным остовом Cys532 киназы B-Raf [13].

Определение конфигурации пиколиноилгидразона

Для подтверждения того, что полученное вещество **SRF-H-BHA** представляет собой (*E*)-изомер, были записаны двумерные корреляционные спектры NOESY [16] (рис. 3А), в которых наблюдался интенсивный положительный кросс-пик на (12.23, 8.69), что соответствует взаимодействию протонов $\text{H1}'$ и NH^x . Ввиду того, что молекулярная масса вещества лежит в области от 0.5 до 1.0 кДа, где ЯЭО (ядерный эффект Оверхаузера) меняет знак ($\omega\tau_c \sim 1$), и по знаку наблюдаемые диполь-диполь-

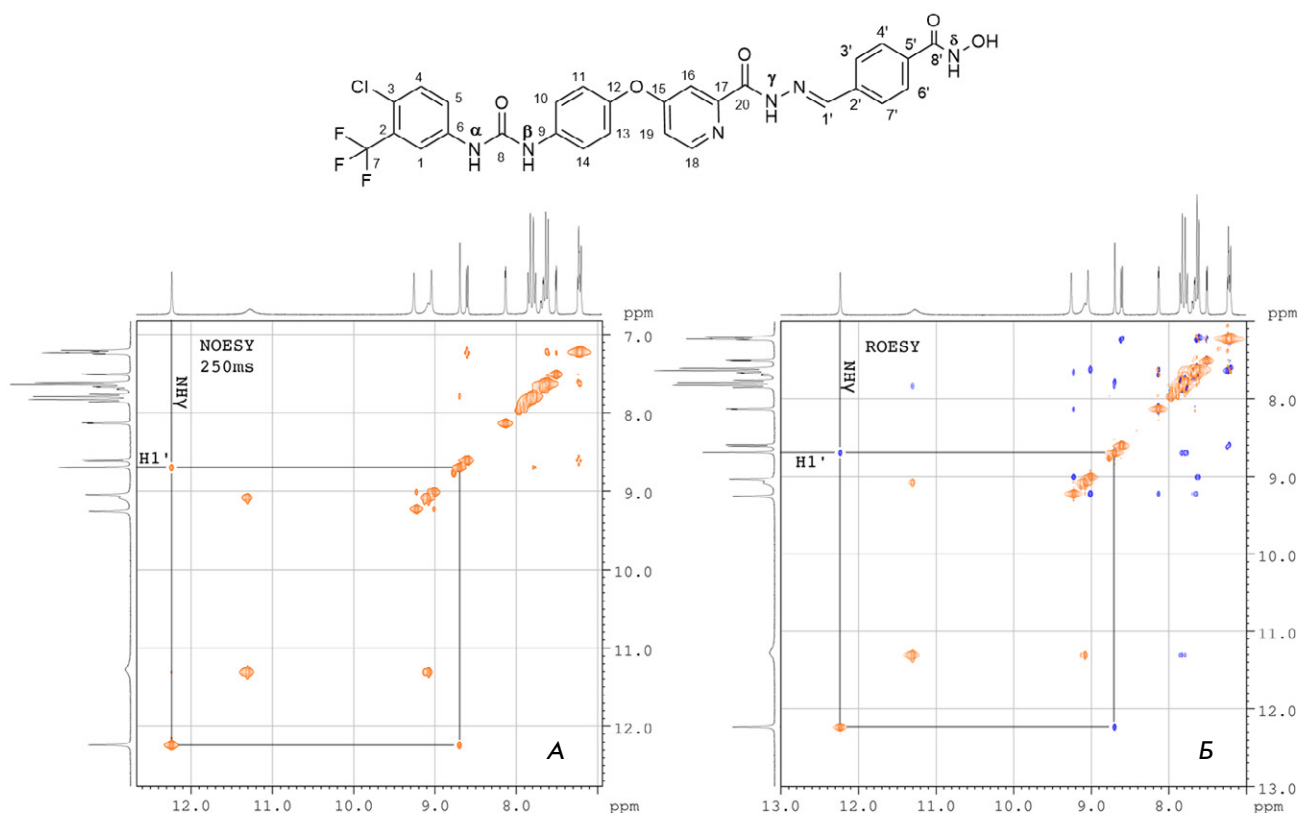


Рис. 3. Структура (*E*)-изомера *SRF-H-BHA* с нумерацией атомов и двумерные ^1H -спектры NOESY при времени смешивания 0.25 с (А) и ROESY (Б) 8 мг вещества *SRF-H-BHA* в DMSO-d_6 . Отмечены кросс-пики между пиколиноилгидразоновым протоном NH^γ и протоном $\text{H1}'$ при двойной связи. NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, ROESY – Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy

ные кросс-пики нельзя, в общем случае, отличить от обменных, был записан спектр ROESY [17] (ЯЭО во вращающейся системе координат, рис. 3Б), где также наблюдался интенсивный кросс-пик на (12.23, 8.69) отрицательной интенсивности, что однозначно подтверждало его диполь-дипольную природу. Молекулярные модели соединения ***SRF-H-BHA*** (данные не приведены) показывают, что в (*E*)-изомере расстояние между протонами $\text{H1}'$ и NH^γ составляет приблизительно 0.25 нм, что соответствует сильному ЯЭО, наблюдавшемуся в двумерных корреляционных спектрах. В то же время в (*Z*)-изомере это расстояние составляет 0.37 нм и лежит вблизи границы возможности экспериментального обнаружения ЯЭО, следовательно, вероятность детекции интенсивных кросс-пиков ничтожна.

Оценка цитотоксичности гидроксамовых производных сорафениба

Цитотоксическое действие полученных ингибиторов сначала тестировали на панели из четырех линий клеток гепатомы человека: Huh7, Huh7.5, HepG2

и PLC/PRF/5 (табл. 1). С этой же целью использовали дифференцированные клетки линии HepaRG, которые, являясь суррогатом первичных гепатоцитов человека, широко применяются для изучения цитотоксического действия ксенобиотиков [11]. В качестве соединений сравнения использовали сорафениб (***SRF***) и вориностат – ингибитор HDACs класса I/IIb (***SAHA***) (рис. 1).

Как видно из результатов, представленных на табл. 1, антипролиферативная активность ГИ против клеточных линий гепатомы критически зависела от структуры линкера «деацетилазной» компоненты. По сравнению с сорафенибом протяженный алкильный линкер в молекуле ***SRF-CHA*** ассоциировался с ослаблением антипролиферативного действия в 3–4 раза и, наоборот, ***SRF-BHA*** и ***SRF-H-BHA***, несущие фенильный линкер, действовали в 1.5–2 раза сильнее. Значения IC_{50} у ингибитора ***SRF-THA***, в составе которого присутствовал бензильный линкер, были близки к значениям у сорафениба с отклонениями в ту или иную сторону не более чем в 1.5 раза.

Таблица 1. Антипролиферативное/цитотоксическое действие гибридных ингибиторов в культурах клеток гепатомы [■], нейробластомы [■], промиелоцитарного и хронического миелоидного лейкоза [■]; время инкубации 48 ч, клеток HeparG – 72 ч

Клетки	Huh7	Huh7.5	HepG2	PLC/PRF/5	HeparG	SH-SY5Y	HL60	K562
IC ₅₀ , мкМ								
<i>SRF Sorafenib</i>	3.87±1.14	4.54±0.59	16.6±2.4	18.0±0.9	13.7±2.6	9.19±2.61	6.34±0.21	9.33±0.02
<i>SRF-BHA</i>	3.63±1.42	2.86±1.09	12.9±6.1	7.69±0.81	12.4±4.8	4.00±0.21	5.08±1.50	4.17±0.27
<i>SRF-THA</i>	5.60±0.40	5.27±0.46	8.80±2.21	12.4±3.4	11.3±3.1	7.15±0.27	8.45±3.15	13.1±1.9
<i>SRF-H-BHA</i>	1.80±0.10	2.47±0.82	9.87±1.34	8.33±2.82	12.4±3.9	3.41±0.85	6.97±2.31	9.08±1.23
<i>SRF-CHA</i>	18.1±2.2	14.6±3.5	77.9±4.1	61.3±2.5	69.5±4.8	39.5±9.9	54.5±1.7	51.6±4.6
<i>SAHA Vorinostat</i>	1.73±0.18	1.89±0.22	1.88±0.19	11.4±2.6	14.3±0.6	1.90±0.08	9.43±2.98	8.74±3.06
1–3 мкМ	3–10 мкМ	10–30 мкМ	30–100 мкМ					

Поскольку дифференцированные клетки линии HeparG не пролиферируют, то очевидно, что снижение MTT-сигнала в этом случае вызвано цитотоксическим действием ингибиторов. Гидроксамовые производные, **SRF-BHA**, **SRF-THA** и **SRF-H-BHA**, и соединения сравнения, **SRF** и **SAHA**, имели приблизительно равную цитотоксичность в узком диапазоне значений IC₅₀ = 11.3–14.3 мкМ, а ингибитор **SRF-CHA** был примерно в 5 раз менее токсичен. Интересно, что полученный профиль значений IC₅₀ для всего набора соединений во многом повторял результаты тестирования на пролиферирующих клетках линии PLC/PRF/5, что позволяет предположить схожие механизмы ингибирования в обоих случаях.

Цитотоксическое действие полученных ингибиторов дополнительно изучали на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y, а также на двух суспензионных линиях клеток лейкоза HL60 и K562 (табл. 1). Показано, что производное **SRF-CHA** гораздо менее активно в отношении и нейробластомы, и лейкоза, чем сорафениб, тогда как активность **SRF-BHA**, **SRF-THA** и **SRF-H-BHA** была приблизительно такой же, как у сорафениба. Таким образом, в клеточных линиях нейробластомы и лейкоза зависимость антипролиферативной активности ГИ от структуры «деацетилазной» компоненты была такой же, как и в случае клеточных линий гепатомы.

Тестирование силы и селективности ингибирования гистондеацетилаз

Ингибитор гистондеацетилаз **SAHA**, взятый в качестве контроля, оказывал сильное цитотоксическое действие на большинство изученных нами клеточных линий (табл. 1). Чтобы оценить связь противоопухолевой активности гидроксамовых производных сорафениба с подавлением активности гистондеацетилаз *in cell*, определили остаточную активность HDAC в присутствии ГИ с помощью клеточной

тест-системы s³CTS как описано ранее [12]. Сигнал s³CTS отражал уровень деацилирования *in cell* трех класс-селективных флуорогенных субстратов гистондеацетилаз общей структуры Boc-Lys(Acyl)-AMC, где Acyl = пропионил (Sub^{Pro}, HDACs класс I), ацетил (Sub^{Ac}, HDACs класс I и IIb) и трифторацетил (Sub^{Tfa}, HDACs класс IIa). В качестве отрицательного и положительного контроля работы тест-системы использованы сорафениб и вориностат соответственно.

Оказалось, что вплоть до концентрации 3 мкМ соединения **SRF**, **SRF-BHA** и **SRF-H-BHA** не ингибировали активность гистондеацетилаз *in cell* (рис. 4). В то же время **SRF-CHA** и **SAHA**, при существенном превосходстве последнего в силе ингибирования, демонстрировали одинаковую селективность ингибирования HDACs классов I и IIb. И наконец, в присутствии **SRF-THA** зафиксировано панингибирование гистондеацетилазной активности. Однако наблюдаемое в этом случае одновременное падение трех флуоресцентных сигналов могло говорить о сбое в работе тест-системы s³CTS за счет дополнительного ингибирования цинкзависимой пальмитоил-КоА-тиоэстеразы MBLAC2. Стоит заметить, что этот эффект часто наблюдается как раз в случае толуилгидроксамовых селективных ингибиторов HDAC6 класса IIb, включая тубастатин А и некстурастат А [12, 18].

Таким образом, по результатам тестирования из четырех полученных гидроксамовых производных сорафениба только **SRF-CHA** и **SRF-THA** являлись ингибиторами гистондеацетилаз (рис. 4). Учитывая данные по антипролиферативной активности (табл. 1), сделан вывод, что алкильный линкер в составе **SRF-CHA** препятствовал ингибированию тирозиновых протеинкиназ, и данный эффект лишь отчасти компенсировался ингибированием гистондеацетилаз. Сильное негативное влияние на активность производных сорафениба с протяженными

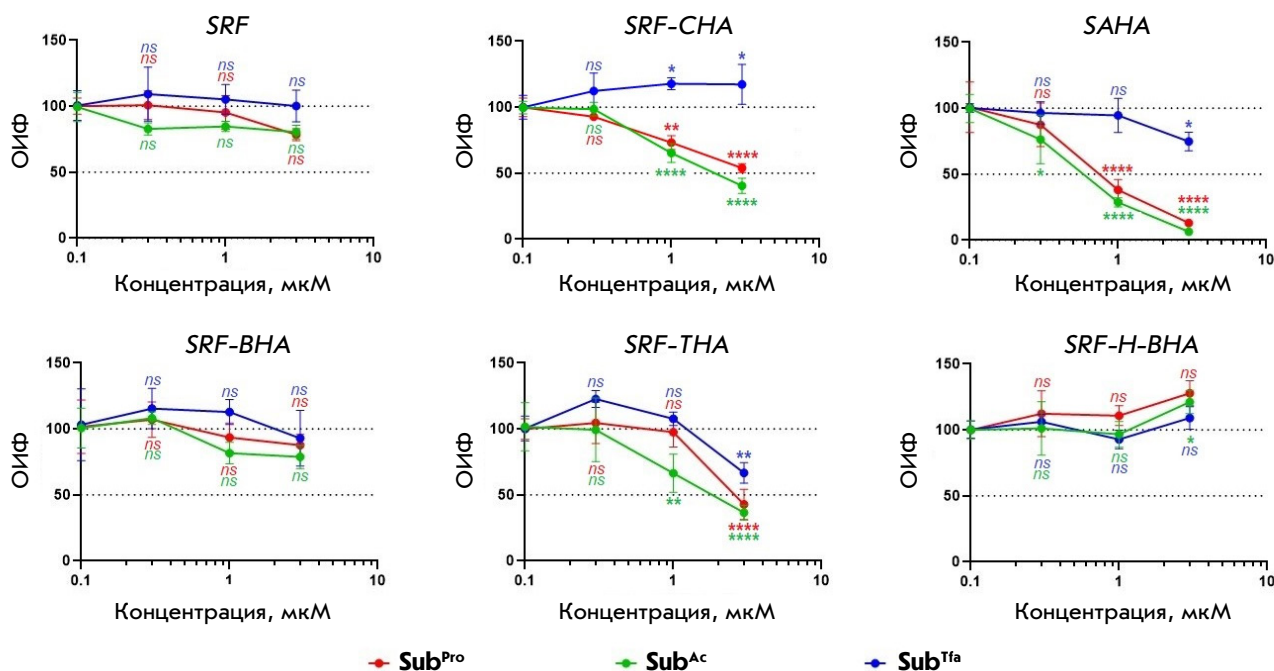


Рис. 4. Результаты *in cell* тестирования селективности и силы ингибирования HDACs в присутствии сорафениба (SRF), гибридных ингибиторов (SRF-CHA, SRF-BHA, SRF-THA и SRF-H-BHA) и вориностата (SAHA). Флуорогенные субстраты гистондеацетилаз – Sub^{Pro} (HDACs класс I), Sub^{Ac} (HDACs класс I и IIb) и Sub^{Tfa} (HDACs класс IIa); ОИФ – относительная интенсивность флуоресценции. Статистическая значимость рассчитана с помощью теста ANOVA (GraphPad Prism 8): **** $p < 0.001$, ** $0.01 < p < 0.05$, * $0.05 < p < 0.1$, ns – не существенно

ми алкильными заместителями в пиколинамидном остатке отмечали и ранее [10, 19]. То обстоятельство, что сила противоопухолевого действия **SRF-THA** и сорафениба на все исследованные клеточные линии была примерно одинаковой, не противоречит опубликованным ранее данным о близких значениях антипролиферативной активности сорафениба и его N-бензильного производного [20]. Исходя из этого, мы полагаем, что структуру **SRF-THA** вполне можно использовать для дизайна производных, несущих в своем составе более эффективную «деацетилазную» компоненту.

Интересно, что антипролиферативное действие и **SRF-BHA**, и **SRF-H-BHA** в подавляющем числе случаев заметно превосходило действие сорафениба, хотя эти соединения и не являются ингибиторами гистондеацетилаз (табл. 1 и рис. 4), что косвенно указывало на усиление «киназной» компоненты в этих соединениях. Нами уже отмечалось, что сорафениб взаимодействует с пептидным остовом Cys532 киназы B-RAF у выхода из сайта связывания, при этом пиколинамидный фрагмент ингибитора и остаток индола Trp530 располагаются параллельно и расстояние между ними составляет около 4.3 Å [10, 13]. Исходя из этого, можно предположить существование стекинг-взаимодействия между индольным остатком Trp530 и фенильным линкером

SRF-BHA или **SRF-H-BHA** благодаря взаимной компланарности обеих кольцевых систем и их пространственной сближенности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе путем модификаций пиколинамидного остатка ингибитора разработан дизайн и осуществлен синтез четырех гидроксамовых производных сорафениба. Структура всех полученных соединений подтверждена методами ЯМР. Методом тестирования *in cell* показано, что только два производных – **SRF-CHA** и **SRF-THA** – обладали способностью ингибировать HDACs в низких микромолярных концентрациях. Тестирование антипролиферативного действия целевых соединений на панели клеток гепатомы, нейробластомы и лейкоза показало высокую активность трех соединений – **SRF-BHA**, **SRF-THA** и **SRF-H-BHA**, сравнимую или превосходящую активность сорафениба. Используя **SRF-THA** в качестве базовой молекулы, представляется возможным получить новые гибридные ингибиторы PTKs/HDACs с высокой токсичностью в отношении опухолевых клеток. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда – грант № 23-24-00542.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fan G., Wei X., Xu X. // *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2020. V. 12. P. 1–21. doi: 10.1177/1758835920927602.
2. Wilhelm S.M., Adnane L., Newell P., Villanueva A., Llovet J.M., Lynch M. // *Mol. Cancer Ther.* 2008. V. 7. № 10. P. 3129–3140. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0013.
3. Cabral L.K.D., Tiribelli C., Sukowati C.H.C. // *Cancers.* 2020. V. 12. P. 1576. doi: 10.3390/cancers12061576.
4. Chang Y., Lee Y.B., Cho E.J., Lee J.-H., Yu S.J., Kim Y.J., Yoon J.-H. // *BMC Cancer.* 2020. V. 20. P. 1001. doi: 10.1186/s12885-020-07471-3.
5. Hsu F.-T., Liu Y.-C., Chiang I.-T., Liu R.-S., Wang H.-E., Lin W.-J., Hwang J.-J. // *Int. J. Oncol.* 2014. V. 45. P. 177–188. doi: 10.3892/ijo.2014.2423.
6. Liu J., Yang X., Liang Q., Yu Y., Shen X., Sun G. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2020. V. 126. P. 105820. doi: 10.1016/j.biocel.2020.105820.
7. Bass A.K.A., El-Zoghbi M.S., Nageeb E.M., Mohamed M.F.A., Badr M., Abuo-Rahma G.E.A. // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. V. 209. P. 112904. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112904.
8. Melesina J., Simoben C.V., Praetorius L., Bülbül E.F., Robaa D., Sippl W. // *ChemMedChem.* 2021. V. 16. P. 1336–1359. doi: 10.1002/cmdc.202000934.
9. Rodrigues D.A., Ferreira-Silva G.À., Ferreira A.C.S., Fernandes R.A., Kwee J.K., Sant'Anna C.M.R., Ionta M., Fraga C.A.M. // *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. № 2. P. 655–670. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01525.
10. Wang K., Kuerbana K., Wan Q., Yu Z., Ye L., Chen Y. // *Molecules.* 2020. V. 25. P. 573. doi: 10.3390/molecules25030573.
11. Gutmann M., Stimpfl E., Langmann G., Koudelka H., Mir-Karner B., Grasl-Kraupp B. // *Toxicol. Lett.* 2023. V. 390. P. 15–24. doi: 10.1016/j.toxlet.2023.10.014.
12. Kleymenova A., Zemskaya A., Kochetkov S., Kozlov M. // *Biomedicines.* 2024. V. 12. P. 1203. doi: 10.3390/biomedicines12061203.
13. Wan P.T., Garnett M.J., Roe S.M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V.M., Jones C.M., Marshall C.J., Springer C.J., Barford D., et al. // *Cell.* 2004. V. 116. P. 855–867. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00215-6.
14. Kozlov M.V., Konduktorov K.A., Malikova A.Z., Kamarova K.A., Shcherbakova A.S., Solyev P.N., Kochetkov S.N. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 183. P. 111723. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111723.
15. Le P., Kunold E., Macsics R., Rox K., Jennings M.C., Ugur I., Reinecke M., Chaves-Moreno D., Hackl M.W., Fetzter C., et al. // *Nat. Chem.* 2019. V. 12. P. 145–158. doi: 10.1038/s41557-019-0378-7.
16. Jeener J., Meier B.H., Bachmann P., Ernst R.R. // *J. Chem. Phys.* 1979. V. 71. P. 4546–4553. doi: 10.1063/1.438208.
17. Bax A., Davis D.G. // *J. Magn. Reson.* 1985. V. 63. P. 207–213. doi: 10.1016/0022-2364(85)90171-4.
18. Lechner S., Malgapo M.I.P., Grätz C., Steimbach R.R., Baron A., Rüther P., Nadal S., Stumpf C., Loos C., Ku X., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2022. V. 18. P. 812–820. doi: 10.1038/s41589-022-01015-5.
19. Khire U.R., Bankston D., Barbosa J., Brittelli D.R., Carin-gal Y., Carlson R., Dumas J., Gane T., Heald S.L., Hibner B., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004. V. 14. P. 783–786. doi: 10.1016/j.bmcl.2003.11.041.
20. Babić Ž., Crkvenčić M., Rajić Z., Mikecin A.-M., Kralj M., Balzarini J., Petrova M., Vanderleyden J., Zorc B. // *Molecules.* 2012. V. 17. P. 1124–1137. doi: 10.3390/molecules17011124.

УДК 577.25

Сервер PepString для поиска коротких аминокислотных подпоследовательностей: определение возможных мишеней бета-амилоида

С. А. Козин¹, А. А. Анашкина^{1*}, Д. Г. Мацуга^{2,3}, Б. С. Суваан³, В. Г. Туманян¹,
В. А. Митькевич¹, А. А. Макаров¹

¹Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, Москва, 119991 Россия

²Астраханский государственный медицинский университет, кафедра биологической химии и клинической лабораторной диагностики, Астрахань, 414000 Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*E-mail: anastasia.a.anashkina@mail.ru

Поступила в редакцию 09.02.2025

Принята к печати 22.04.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27630

РЕФЕРАТ Представлен новый биоинформатический инструмент для поиска коротких – от 3 и выше – аминокислотных последовательностей в белковых молекулах, аннотированных в публичных базах данных (UniprotKB, SwissProt), а также продемонстрировано его использование на примере поиска в протеоме человека тетрапептида EVNH, который является молекулярной детерминантой бета-амилоида и участвует в критических для патогенеза болезни Альцгеймера взаимодействиях. Актуальность создания такого инструмента, с одной стороны, связана с появлением экспериментальных данных о роли коротких тетрапептидных мотивов в архитектуре межмолекулярных интерфейсов. С другой стороны, в настоящее время нет доступных программных продуктов для эффективного поиска коротких (три и более) аминокислотных последовательностей в публичных базах данных, что резко ограничивает возможности выявления белков с точными вхождениями коротких подпоследовательностей. Представленная программа (сервер PepString, <http://pepstring.eimb.ru/>) позволяет с помощью интуитивно понятных запросов получить информацию обо всех возможных белках, в которых присутствуют интересующие последовательности, включая также и их комбинации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, короткие аминокислотные последовательности, PepString, лекарственная мишень, пептид, EVNH, HAEE.

ВВЕДЕНИЕ

Белок-белковые взаимодействия играют принципиальную роль практически во всех клеточных процессах. Особый интерес для биомедицины и фармацевтики имеют белок-белковые интерфейсы, в которых участвуют молекулы, ассоциированные с развитием патологических состояний. Нейродегенеративные заболевания ассоциированы с агрегацией определенных белков в упорядоченные надмолекулярные структуры, при этом инициирование патологической агрегации происходит по зародышевому механизму, в котором ключевую роль играют повторяющиеся белок-белковые взаимодействия с одинаковыми межмолекулярными интер-

фейсами. Одной из ведущих стратегий разработки болезнь-модифицирующих лекарственных средств для терапии нейродегенеративных заболеваний является использование агентов различной природы (например, антител, пептидов, пептидомиметиков), способных специфически разрушать образование болезнь-ассоциированных межмолекулярных интерфейсов и за счет этого предотвращать нежелательную агрегацию [1]. Соответственно, критически важна идентификация аминокислотных остатков, образующих такие интерфейсы.

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание и ведущая причина деменции в мире [2]. БА характери-

зуется конформационной трансформацией молекул эндогенного амилоида- β (А β) из мономерного состояния в растворимые олигомеры и нерастворимые агрегаты [3], которые инициируют нейровоспаление и другие патологические процессы, связанные с развитием БА [4]. Нерастворимые агрегаты А β присутствуют в мозге как в виде диффузных агрегатов на стенках кровеносных сосудов, так и в виде фибриллярных агрегатов (амилоидных бляшек) на поверхности нейронов [5], и такие агрегаты находятся в динамическом равновесии с растворимыми олигомерами А β [6].

А β – это небольшая полипептидная молекула, состоящая из 38–43 аминокислотных остатков (а.о.) [7]. А β образуется в результате протеолиза белка-предшественника амилоида (АРР) [8]. Аминокислотная последовательность наиболее часто встречающейся в амилоидных бляшках изоформы А β , А β 42, содержит 42 а.о. [9, 10]. Пептид А β присутствует как в тканях мозга, так и в периферических органах [11]. В крови А β образуется в основном в тромбоцитах [12] и проходит через гематоэнцефалический барьер [11]. В крови как здоровых людей, так и пациентов с диагнозом спорадической формы болезни Альцгеймера А β находится в пикомолярном диапазоне концентраций [13]. Физиологические функции А β заключаются в подавлении микробных инфекций, регуляции синаптической пластичности, содействии восстановлению после травмы мозга, герметизации гематоэнцефалического барьера и, возможно, в подавлении пролиферации опухолевых клеток [14, 15].

Агрегация молекул А β *in vivo* инициируется межмолекулярными взаимодействиями, в которых критическую роль играют металлсвязывающий домен (А β 16), расположенный на участке 1–16 А β , и ионы цинка. Соответственно, данные о трехмерной структуре А β 16 и молекулярном механизме цинкзависимой олигомеризации А β используются для рационального поиска и конструирования молекул-кандидатов в рамках антиамилоидной стратегии [16]. Определена пространственная структура А β 16 нескольких природных вариантов А β в свободном и связанном с ионами цинка состоянии [17–21]. Имеются также экспериментальные данные о структуре А β 16 в амилоидных фибриллах, выделенных из мозга пациентов с диагнозом БА [22]. На основании этих данных было установлено, что участок 11-EVHH-14 А β человека имеет такую структуру основной полипептидной цепи, которая остается практически неизменной как в свободной молекуле А β 16, так и в комплексе А β 16 с ионом цинка, а также в N-концевой части фибрилл А β , выделенных из ткани мозга больных БА.

В совокупности перечисленные свойства характеризуют сайт 11-EVHH-14 А β как структурный инвариант и позволяют предположить, что этот сайт играет важную роль во взаимодействии А β с другими биологическими молекулами. Действительно, установлено, что сайт 11-EVHH-14 А β : (1) является основным центром распознавания и связывания ионов цинка; (2) находится на межмолекулярном интерфейсе в комплексах между А β и никотиновым ацетилхолиновым рецептором подтипа α 4 β 2 [23, 24]; (3) образует симметричный цинкзависимый интерфейс как в димерах А β [25, 26], так и в олигомерах А β [17]; (4) участвует в цинкзависимом связывании нуклеиновых кислот [27]. Аминокислотная последовательность металлсвязывающего домена А β (А β 16) находится во внеклеточной мембранной части белка-предшественника амилоида (АРР), а также составляет С-концевой фрагмент растворимой α -формы АРР (sАРР α) [28], и оба эти белка, АРР и sАРР α , выполняют жизненно важные физиологические функции [29]. Более того, и в АРР, и в sАРР α область 11-EVHH-14 металлсвязывающего домена А β стерически доступна для взаимодействия как с ионами цинка, так и с другими биомолекулами, включая А β . Таким образом, оба эти белка могут выступать в качестве потенциальных партнеров для связывания А β посредством цинкзависимых взаимодействий через симметричные области 11-EVHH-14 металлсвязывающих доменов из соответствующих молекул.

В патогенезе болезни Альцгеймера взаимодействие А β с ионами цинка, которое опосредуется сайтом 11-EVHH-14 А β , является ключевым фактором формирования и распространения амилоидных бляшек, поэтому этот сайт представляет собой перспективную лекарственную мишень [16]. Важно отметить, что большинство моноклональных антител, используемых для нейтрализации олигомеров А β в терапии БА, блокируют сайт 11-EVHH-14 [30]. Однако моноклональные антитела имеют множество побочных эффектов [31], поэтому актуальным представляется поиск и разработка низкомолекулярных агентов различных химических классов [32], включая пептидомиметики и пептиды природного или искусственного происхождения [33].

Недавно было обосновано использование синтетического аналога сайта 35-NAEE-38 субъединицы α 4 никотинового ацетилхолинового рецептора подтипа α 4 β 2 в качестве эффективного средства ингибирования агрегации эндогенных молекул А β в патогенезе болезни Альцгеймера [23]. Такой аналог (далее НАЕЕ) специфически связывается с 11-EVHH-14-сайтом А β как в отсутствие, так и в присутствии ионов цинка, приводя к образованию стабильных

Peptide Search

Here you can search peptide sequences with small size starting with 3 amino acids and greater. For sequences greater than 6 amino acids you may use this site or move to [UniProt peptide search](#) section. To apply some kind of sorting - use settings below.

Type your peptide sequence here, min length - 3

Example: ALCC

Operator

☒ AND
☐ OR (only Swiss-Prot)

Lineage taxon

Type NCBI ID or Taxon Name and choose from the list

Database

Swiss-Prot & Isoforms

Search

Reset

You may type several sequences like this:

ALC, RADGG / ALC,RADGG / ALC RADGG.

Or you may put every peptide on a separate line.

Use only uppercase letters.

Max amount of sequences in one query is 5.

OPTIONS:

AND: find sequences with several peptides inside one sequence.

Example: ALC, RADGG

Result: **ALCCCCRADGGVLM**

OR: find sequences which contain at least one of the peptides from a list.

Example: ALC, RADGG

Result: MGLK**ALC**GLLCVLFV, WDM**DGLRADGG**GAGGAP

Lineage taxon: find peptide sequences in organisms that contain particular taxon inside taxon lineage. Example: Homo Sapiens as well as Mus musculus contain taxon Vertebrata 'vertebrates' inside its lineage so when you choose Vertebrata 'vertebrates' in lineage taxon option - both of these organisms will be used in peptide search.

Database: find peptide sequence in particular database. UniProtKB (Swiss-Prot + TrEMBL)

Рис. 1. Форма запроса для поиска последовательностей белков, содержащих точные вхождения коротких пептидов, с помощью сервера PepString (<http://pepstring.eimb.ru>)

комплексов, которые, в свою очередь, блокируют образование и распространение агрегатов Аβ [34]. Однако неизвестно, может ли НАЕЕ связываться с сайтами EVNH в других белках и как это может повлиять на пациентов при возможном использовании НАЕЕ в качестве лекарственного средства.

Учитывая ключевую роль тетрапептидного участка EVNH в формировании межмолекулярных интерфейсов с участием Аβ, важно идентифицировать все белки протеома человека, которые содержат этот сайт, так как такие белки могут быть потенциальными партнерами для Аβ. Однако к моменту настоящего исследования эффективные биоинформатические инструменты для поиска коротких (3 а.о. и более) подпоследовательностей в известных белках отсутствовали. В настоящей работе представлен оригинальный сервер PepString для поиска точных вхождений коротких фрагментов последовательности белка. Использование ресурсов сервера PepString показано на примере последовательности EVNH бета-амилоида, которая представляет собой перспективную мишень для разработки патогенетических препаратов антиамилоидного действия в терапии болезни Альцгеймера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сервер PepString

Сервер PepString (<http://pepstring.eimb.ru>) разработан на основе PostgreSQL-версии актуальных баз

данных UniprotKB и SwissProt. Этот сервер позволяет пользователю искать точные совпадения коротких пептидов в белковых последовательностях. Запрос может быть ограничен определенным таксоном, например, Mammalia, Bacteria или Vertebrata, или всеми видами. Запрос также может быть основан на наличии нескольких фрагментов в одной последовательности (пять или менее фрагментов) или на наличии в последовательности хотя бы одного фрагмента из списка. Снимок начальной страницы показан на *рис. 1*. Несколько последовательностей могут быть введены с использованием запятой или/и пробела в качестве разделителя, например, «ALC,RADGG», «ALC, RADGG», «ALC RADGG». Каждую из нескольких последовательностей можно разместить на отдельной строке. Один запрос может содержать не более пяти последовательностей. Для поиска можно использовать два оператора: AND и OR. Оператор AND позволяет найти белковые последовательности, включающие все пептиды из запроса. Оператор OR позволяет найти белковые последовательности, включающие хотя бы один пептид из списка запроса. Поиск можно ограничить, выбрав таксон любого уровня, например Vertebrata или Archaea, или Mammalia, или *Homo sapiens*.

На *рис. 2* приведен пример вывода результатов. Результаты отсортированы по названию организма. Пользователь может сохранить результат запроса в форматах FASTA или CSV. Поиск 3-аминокислотного фрагмента в базе данных SwissProt занима-

Entry	Entry name	Peptide name	NCBI ID	Organism name	UniProt name	Rank	Length	Sequence
Q8N2Y8	RUSC2_HUMAN	AP-4 complex accessory subunit RUSC2	9606	Homo sapiens[9606]	Homo sapiens	species	1516	MDSPPKLTGETLVHHIPLVHCQVDRQCCGGAGGGGGSTF
Q80U22	RUSC2_MOUSE	AP-4 complex accessory subunit RUSC2	10090	Mus musculus[10090]	Mus musculus	species	1514	MDSPPKLTGETLVHHIPLVHCQVDRQCCGGAGGGGGSTI
Q6PDK2	KMT2D_MOUSE	Histone-lysine N-methyltransferase 2D	10090	Mus musculus[10090]	Mus musculus	species	5588	MDSQKPPAEDKSDPAADGLAAPEKPGATEPDLPLICIGEV

The amount of species is 2 of 9792 (Mammalia[40674] species);

Total results: 3

[Download CSV](#)
[Download full CSV](#)
[Download FASTA](#)
[Download Tax info](#)

Рис. 2. Результат поиска двух пептидов ALC RADGG сервером PepString среди белков из видов Mammalia

ет несколько секунд, в то время как в базе данных UniprotKB – от 10 мин до нескольких часов.

Для создания базы данных белковых последовательностей на основе UniprotKB (SwissProt+TrEMBL) были использованы Python и PostgreSQL. Схема структуры базы данных приведена в Приложении, рис. S1. База данных обновляется автоматически практически в то же время, что и официальная база данных UniProtKB, то есть примерно 1 раз в 8 недель. Веб-интерфейс написан с использованием фреймворка Django.

Таксономия в нашей базе данных идентична таксономии NCBI. Обратите внимание, что идентификаторы NCBI и названия организмов могут не совпадать с данными из базы данных UniProt. Причина в том, что UniProt обновляет свою таксономию также 1 раз в 8 недель. Однако наша база данных использует базу данных NCBI Taxonomy, которая получает новые обновления ежедневно, поэтому может случиться так, что версия, которую мы использовали для обновления, отличается от версии UniProt.

Результат выполнения запроса пользователя хранится в таблице `django_celery_results_taskresult` в течение 24 ч, а затем удаляется.

Расчеты консервативности с помощью BLAST

Консервативность сайта EVNH рассчитывали по гомологичным белковым последовательностям других видов среди челюстноротых позвоночных с помощью программы BLAST [35]. Для каждого идентификатора белка Uniprot из табл. 1 найдено 1000 гомологичных последовательностей. Количество последовательностей, содержащих сайт EVNH (первое число в колонке Консервативность в табл. 1), делили на количество последовательностей со всеми вариантами этого сайта (второе число в колонке

Консервативность в табл. 1) и умножали на 100, чтобы получить значение Консервативности в %.

Варианты сайтов EVNH

Была написана короткая программа на C++ для разбора файлов последовательности fasta и подсчета всех вариантов сайтов EVNH. Текст программы доступен по запросу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сервером PepString в протеоме человека найдены 63 последовательности изоформ 24 белков, содержащих фрагмент EVNH. Если взять 1000 гомологичных белков из базы данных Uniprot и подсчитать, сколько из них содержат фрагмент, гомологичный EVNH, и в скольких случаях этот фрагмент именно EVNH, то можно получить некоторое представление о консервативности этого фрагмента в белке у разных видов организмов. В табл. 1 мы собрали информацию о консервативности фрагмента EVNH в белковых последовательностях и положении этого фрагмента в последовательности. Более длинная версия таблицы, в которой перечислены все изоформы, содержащие фрагмент EVNH, и структурная информация, представлена в табл. S1 Приложения. Фрагмент EVNH в белке APP является наиболее консервативным (89.8%) (табл. 1). Несколько менее консервативны участки EVNH в последовательностях белка кадгерин-18 и рецептора вируса Коксаки и аденовирусов – 85.4 и 71.7% соответственно. Нейрональная изоформа дистонина также заслуживает внимания, поскольку, помимо консервативной формы EVNH, найденной в 168 из 779 последовательностей (21.6%), 315 из 779 последовательностей (40.4%) гомологичных белков из разных видов содержат очень похожую по физико-химическим свойствам последовательность этого сайта EANH.

Таблица 1. Консервативность фрагмента EVNH в белках человека, определенная с помощью BLAST*

Консервативность	Идентификатор Uniprot	Белок	Локализация EVNH
885/985 (89.8%)	P05067	Белок-предшественник амилоида-бета	682–685, YEVHHQ
683/800 (85.4%)	Q13634	Кадгерин-18	46–49, TEVHHR
667/930 (71.7%)	P78310	Рецептор коксакивируса и аденовируса	272–275, KEVNHD
437/995 (43.9%)	Q06124	Тирозин-протеинфосфатаза нерецепторного типа 11	441–444, EEVHHK
405/950 (42.6%)	Q9NH8M1	Митохондриальный гомолог В коэнзим-Q-связывающего белка COQ10	234–237, NEVNHT
276/965 (28.6%)	Q9Y2E6	Е3-убиквитин-протеинлигаза DTX4	575–578, NEVHHK
168/779 (21.6%)	Q03001-11	Нейрональная изоформа дистонина	101–104, VEVHHQ
154/844 (18.2%)	Q58FF7	Предполагаемый белок теплового шока HSP90-beta-3	4–7, EEVHHG
133/859 (15.5%)	P08238	Белок теплового шока HSP 90-beta	4–7, EEVHHG
134/990 (13.5%)	Q6ZSZ5	Фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Rho 18	459–462, TEVHHV
105/1000 (10.5%)	O75676	Киназа рибосомного белка S6 альфа-4	471–474, NEVNHD
100/991 (10.1%)	Q86SQ4	Адгезионный G-белок-связанный рецептор G6	797–800, QEVHNP
81/872 (9.6%)	Q7Z3D6	D-глутаматциклаза, митохондриальная	273–276, PEVHHI
47/522 (9.0%)	Q9Y4G2	Член 1 семейства М, содержащего домен гомологии плекстрина	233–236, IEVHNS
87/974 (8.9%)	Q53F39	Металлофосфоэстераза 1	309–312, CEVHHG
60/1000 (6.0%)	P54296	Миомезин-2	751–754, REVHHK
48/959 (5.0%)	O76064	Е3-убиквитин-протеинлигаза RNF8	229–232, TEVHNE
48/1000 (4.8%)	Q5TG30	Белок 40, активирующий Rho GTPазу	392–395, DEVHHN
43/998 (4.3%)	Q2M3C7	A-киназный якорный белок SPHKAP	682–685, DEVHHK
25/960 (2.7%)	P10912	Рецептор гормона роста	71–74, DEVHHG
26/999 (2.6%)	Q8NH48	Обонятельный рецептор 5B3	171–174, NEVHHF
4/262 (1.5%)	Q9H0D2	Белок с цинковыми пальцами 541	218–221, YEVHHG
9/949 (0.9%)	Q5VT97	Активирующий Rho GTPазу белок SYDE2	567–570, REVHNT
4/998 (0.4%)	P41226	Убиквитин-подобный модификаторактивирующий фермент 7	283–286, QEVHNA

*Записи перечислены в порядке убывания консервативности.

В последовательности белка-предшественника амилоида человека (APP) EVNH находится в пептиде Aβ, может связывать ион Zn²⁺ и образовывать димеры и олигомеры [17, 21, 25]. Анализ последовательностей белка APP других видов челюстноротых позвоночных показал, что у всех птиц, рептилий, амфибий, рыб и почти у всех млекопитающих последовательности APP содержат высококонсервативный вариант EVNH, за некоторыми исключениями (табл. 2). Например, обе изоформы APP синих и полосатых китов содержат последовательность EVRH, хотя у других морских млекопитающих мы видим консервативный вариант EVNH. Тот же вариант EVRH встречается у некоторых грызунов – мышей, крыс, кротов, сусликов, дегу и голого землекопа (полный список см. в табл. 2). Замена встречается не у всех грызунов. Например, мы обнаружили консервативный вариант EVNH в последовательностях APP *Oryctolagus cuniculus* (кролик) и *Chrysochloris asiatica* (капский золотистый крот).

Другим исключением является *Puma concolor* (горный лев), который имеет единственную изоформу APP, содержащую в этом месте совершенно непохожий сайт RGGW.

Далее рассмотрим, что известно про функцию каждого найденного белка. Белок кадгерин-18 аннотирован в Uniprot как участвующий в кальцийзависимой межклеточной адгезии, клеточной миграции и морфогенезе. В последовательности кадгерина-18 фрагмент EVNH расположен в пропептиде 25–53, который выщепляется из белка во время созревания. В модели AlphaFold-структуры этого белка сайт EVNH расположен в неупорядоченной петле, на поверхности белка (табл. S1 Приложения). Функция этого пропептида пока не известна. По данным Uniprot, остаток аспарагина 36 может быть гликозилирован, что делает пропептид чувствительным к уровню глюкозы в крови. Известно, что кадгерин-18 ассоциирован с болезнью Альцгеймера. Экспериментально показано, что кад-

Таблица 2. Варианты сайтов EVNH, найденные среди гомологов человеческого белка APP (P05067) у разных видов челюстноротых позвоночных

Мотив	Число видов	Организм
EVNH	885	Все птицы, рептилии, амфибии, угри и костистые рыбы <i>Albula goreensis</i> , <i>Aldrovandia affinis</i> (галозавр Гильберта), <i>Latimeria chalumnae</i> (Коморская латимерия), <i>Megalops atlanticus</i> (атлантический тарпон), <i>Clupea gigantea</i> (ископаемая гигантская сельдь), рыбы, такие как <i>Salmonidae</i> и другие, и почти все млекопитающие
EVRH	64	<i>Balaenoptera acutorostrata scammoni</i> (кит северный малый полосатик), <i>Balaenoptera musculus</i> (синий кит), <i>Castor canadensis</i> (американский бобр), длиннохвостая шиншилла (<i>Chinchilla lanigera</i>), <i>Dipodomys ordii</i> (кенгуровая крыса Орда), <i>Fukomys damarensis</i> (дамараландская кротовая крыса), <i>Haplochromis burtoni</i> (ротан Бертон), голый землекоп (<i>Heterocephalus glaber</i>), <i>Ictidomys tridecemlineatus</i> (полосатый суслик), <i>Jaculus jaculus</i> (малый египетский тушканчик), <i>Marmota marmota marmota</i> (альпийский сурок), <i>Mesocricetus auratus</i> (золотистый хомяк), <i>Microtus ochrogaster</i> (прерийная полевка), <i>Mus musculus</i> (мышь), <i>Mus spicilegus</i> (степная мышь), <i>Nannospalax galili</i> (североизраильский слепыш), <i>Octodon degus</i> (дегу), <i>Peromyscus maniculatus bairdii</i> (олений хомячок), <i>Rattus norvegicus</i> (серая крыса), <i>Sciurus vulgaris</i> (евразийская рыжая белка), <i>Urocyon parryi</i> (арктическая земляная белка), <i>Pundamilia nyererei</i> (пундамия Найерера), <i>Maylandia zebra</i> (зебровая мбуна), <i>Atractosteus spatula</i> (крокодиловый гар), <i>Lepisosteus oculatus</i> (пятнистый гар), <i>Oreochromis aureus</i> (израильская тилapia), <i>Oreochromis niloticus</i> (нильская тилapia)
EVYH	24	<i>Cyprinus carpio carpio</i> (сазан), <i>Cirrhinus molitorella</i> (илистый карп), <i>Onychostoma macrolepis</i> , <i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i> , <i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i> , <i>Danio rerio</i> (полосатый данио), <i>Sinocyclocheilus grahami</i> (дианчинская золотая рыбка), <i>Triplophysa rosa</i> (пещерный вьюн)
AVNH	7	<i>Oryzias javanicus</i> (яванская рисовая рыба), <i>Oryzias latipes</i> (японская рисовая рыба), <i>Oryzias melastigma</i> (морская медака), <i>Oryzias sinensis</i> (китайская медака)
-VNH	1	<i>Clupea harengus</i> (атлантическая сельдь)
EVHP	1	<i>Denticeps clupeoides</i> (зубастая сельдь)
EV-H	1	<i>Astyanax mexicanus</i> (слепая пещерная рыба)
EVYP	1	<i>Triplophysa tibetana</i> (тибетский голец)
RGGW	1	<i>Puma concolor</i> (горный лев)

герин взаимодействует с пресенилином-1, роль которого в болезни Альцгеймера доказана [36].

Рецептор вирусов Коксаки и аденовируса является компонентом комплекса эпителиального апикального соединения, который может функционировать как гомофильная молекула клеточной адгезии и необходим для поддержания плотного контакта [37]. Также он участвует в трансэпителиальной миграции лейкоцитов через адгезивные взаимодействия с JAML – трансмембранным белком плазматической мембраны лейкоцитов. После связывания с эпителиальным рецептором вируса Коксаки и аденовируса (CXADR), JAML вызывает последующие сигнальные события в гамма-дельта Т-клетках через PI3-киназу и MAP-киназу. Это приводит к пролиферации и выработке Т-клетками цитокинов и факторов роста, которые, в свою очередь, стимулируют восстановление эпителиальных тканей [38]. Фрагмент EVNH расположен в домене 269–285 этого рецептора, аннотированном как домен, обогащенный заряженными аминокислотами. Это означает, что данный фрагмент очень подвижен и может изменять свою конформацию в зависимости от структуры партнера по взаимодействию. Рецептор вируса Коксаки и аденовируса ассоцииро-

ван с болезнью Альцгеймера. Показано, что инфицирование вирусами Коксаки [39] и аденовирусами [40] может служить пусковым моментом начала болезни Альцгеймера у пожилых людей, поскольку провоцирует экспрессию прионного белка.

Следующий по консервативности фрагмента EVNH белок – это тирозиновая фосфатаза нерецепторного типа 11, которая участвует в каскадах различных рецепторных и цитоплазматических тирозинкиназ, участвуя в передаче сигнала с поверхности клетки в ядро. Активация киназы подавляет функцию интегринов и вызывает дефосфорилирование киназы фокальной адгезии [41]. Она является одним из важных негативных регуляторов ядерного экспорта теломеразной обратной транскриптазы [42]. Мутации в этом белке связаны с рядом заболеваний, которые развиваются при нарушении регуляции внутриклеточной сигнализации через путь RAS/MAPK, таких как синдром LEOPARD [43] или синдром Нунана [44]. Данные про ассоциацию с болезнью Альцгеймера в настоящее время отсутствуют.

Митохондриальный гомолог В коэнзим Q-связывающего белка COQ10 (Q9H8M1) необходим для функционирования коэнзима Q10 в дыхательной

цепи и может служить шапероном или участвовать в переносе Q10 от места его синтеза к каталитическим сайтам дыхательных комплексов. Сайт EVNH, согласно модели AlphaFold, расположен на поверхности белка в составе β -стренда (см. табл. S1 Приложения). В научном сообществе существует мнение, что введение коэнзима Q10 увеличивает концентрацию митохондрий в мозге и оказывает нейропротекторное действие [45, 46], однако в клинических исследованиях II стадии эффект не был показан убедительно, поэтому клинические исследования III стадии было решено не проводить [47].

Е3-убиквитинлигаза DTX4 (Q9Y2E6) участвует в негативной регуляции интерферонового сигналинга I типа посредством NLRP4, направляя киназу TBK1 на деградацию [48]. В дополнение к 276/965 (28.6%) встречающимся консервативным последовательностям EVNH, в 687/965 (71.2%) последовательностях был обнаружен фрагмент EINH с очень похожими физико-химическими свойствами. Гомологичная убиквитинлигаза DTX2 ассоциирована с повреждением мелких сосудов на ранних стадиях болезни Альцгеймера [49].

Нейрональная изоформа дистонина (Q03001-11), помимо варианта сайта EVNH, найденного в 168 из 779 последовательностей (21.6%), встречается также в виде очень похожего по физико-химическим свойствам варианта сайта EANH в 315 из 779 последовательностей (40.4%). Мутации в гене этого белка приводят к прогрессирующей дегенерации сенсорных нейронов у мышей. Такие мыши страдают сенсорной атаксией и погибают к возрасту отъема [50], у них развивается тяжелое двигательное расстройство, приписываемое дегенерации сенсорных нейронов [51].

Нами рассмотрено расположение сайта EVNH в структуре белков и его конформацию. Конформации сайтов EVNH в структурах белков человека образуют четыре кластера (рис. 3). Самую близкую к структуре цинксвязывающего домена A β конформацию имеет сайт EVNH миомезина. Найдена также ассоциация миомезина-2 с болезнью Альцгеймера. Изучение кардиомиопатии у трансгенных мышей показало, что агрегаты, присутствующие в больных сердцах и образованные небольшим белком теплового шока α -B-кристаллином (CryAB), содержат амилоидный олигомер, который может представлять собой основной токсичный вид при болезни Альцгеймера и других дегенеративных заболеваниях, связанных с амилоидом [52]. Известно, что α -B-кристаллин взаимодействует с миомезином-2 [53].

В 21 структуре из 24 сайт EVNH расположен на поверхности белковой структуры. Для последо-

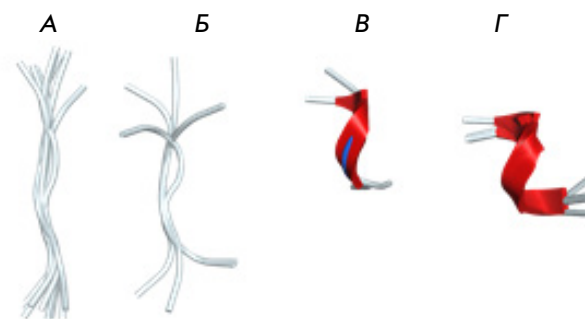


Рис. 3. Конформации сайтов EVNH в структурах белков человека образуют четыре кластера. А – развернутая (Q76064, Q9H8M1, Q5VT97, Q13634, Q7Z3D6, Q9Y4G2, P08238, Q58FF7, P10912, Q75676, Q53F39). Б – неструктурированная (Q9Y2E6, Q5TG30, Q8NH48, Q86SQ4). В – свернутая (P54296, 1ze9). Г – α -спираль (Q2M3C7 (сайт EVNH внутри глобулы), Q9H0D2, 3B7O, P78310, Q6ZSZ5 (сайт EVNH внутри глобулы), P41226). Только сайты EVNH из Q6ZSZ5 и Q2M3C7 утоплены в белковую глобулу и недоступны

вательности дистонина (Q03001-11) не существует модели AlphaFold, в модели структуры фактора обмена гуаниновых нуклеотидов Rho 18 (Q6ZSZ5) сайт EVNH расположен внутри белковой глобулы, а в модели структуры якорного белка А-киназы SPHKAP (Q2M3C7) сайт EVNH окружен неструктурированными петлями.

Суммируя, можно сказать, что сайт 11-EVNH-14 в последовательности A β является очень консервативным среди всех челюстноротых позвоночных. Челюстноротые составляют более 99% всех видов живых позвоночных, включая человека. Ранее было показано, что замена H13R защищает крыс от болезни Альцгеймера [18]. У *Balaenoptera acutorostrata scammoni* (кит северный малый полосатик) и *Balaenoptera musculus* (синий кит), а также у некоторых грызунов, таких как *Heterocephalus glaber* (голый землекоп) или *Nannospalax galili* (североизраильский слепыш) (табл. 2), наблюдается именно такая замена, преобразующая EVNH в EVRH, что, по-видимому, делает эти виды защищенными от патологической агрегации A β и, таким образом, не подверженными болезни Альцгеймера. Объяснение этому следует из молекулярного механизма Zn-зависимой олигомеризации A β [17], который указывает на ключевую роль сайта EVNH в патологическом процессе.

Мы обнаружили, что сайт EVNH присутствует в 63 изоформах 24 белков. Каждый из этих белков

может быть потенциальным молекулярным партнером цинкзависимого взаимодействия с молекулой бета-амилоида. Уже известно, что некоторые из них связаны с патогенезом болезни Альцгеймера, однако данные о механизмах действия отсутствуют. Шесть из 24 найденных белков, а именно APP, кадгерин-18, рецептор вируса Коксаки и аденовируса, G-белок адгезии, сопряженный с рецептором G6, рецептор гормона роста и обонятельный рецептор 5B3 расположены в клеточной мембране, являются рецепторами, и, вероятно, осуществляют передачу сигнала внутрь клетки.

Найденные белки являются как потенциальными мишенями для НАЕЕ, так и возможными партнерами Аβ. Как показано ранее [17, 25], остатки сайта 11–14 пептида Аβ (EVNH) образуют цинкопосредованный интерфейс с аналогичным участком другой молекулы Аβ. Логично предположить, что подобные взаимодействия могут происходить не только между идентичными молекулами бета-амилоида, но и с другими белками, имеющими аналогичный участок, доступный для взаимодействия.

Сделаем несколько предположений. Во-первых, APP функционирует как рецептор клеточной поверхности и выполняет физиологические функции на поверхности нейронов, связанные с ростом нейритов, адгезией нейронов и аксоногенезом [54]. В настоящее время известно, что взаимодействие между молекулами APP на соседних клетках способствует синаптогенезу [54]. Поскольку ионы цинка вовлечены в процесс синаптогенеза, логично предположить, что взаимодействие между молекулами APP происходит через Zn-зависимый интерфейс сайтов EVNH. Это смелое предположение, оно, несомненно, требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Сайты EVNH обнаружены в митохондриальных белках – D-глутаматциклазе и коэнзим-Q-связывающем белке Q9H8M1. Поскольку известно, что пептид Аβ вызывает AGER-зависимый путь, включающий активацию p38 MAPK, что приводит к интернализации пептида Аβ и митохондриальной дисфункции в культивируемых нейронах коры головного мозга [55], второе предположение заключается в том, что пептид Аβ способен проникать через мембрану митохондрий и образовывать цинкзависимые комплексы с одним или обоими белками.

Отметим, что другой из обнаруженных белков с сайтом EVNH, а именно тирозин-протеинфосфатаза нерецепторного типа 11, положительно регулирует путь передачи сигнала MAPK [44]. Третье предположение заключается в том, что Аβ регулирует путь трансдукции сигнала MAPK через цинкзависимый интерфейс с тирозин-протеинфосфатазой

нерецепторного типа 11. Еще один белок из этого списка, а именно рецептор вируса Коксаки и аденовируса, также запускает один из путей активации MAPK.

Еще одна группа белков, которая, как мы выяснили, участвует в регуляции активности нейронов, это кадгерин-18, рецептор вируса Коксаки и аденовируса, рецептор адгезии G-белка G6, который взаимодействует с ламинином-2, фактором обмена гуаниннуклеотидов Rho 18 и дистонином. Кадгерины – кальцийзависимые белки клеточной адгезии. Они преимущественно взаимодействуют между собой гомофильным образом при соединении клеток; таким образом, кадгерины могут способствовать сортировке гетерогенных типов клеток. Рецептор вируса Коксаки и аденовируса, помимо своей негативной роли в проникновении вируса, является компонентом комплекса эпителиального апикального контакта, который может функционировать как гомофильная молекула клеточной адгезии и необходим для целостности плотных контактов. G-белок адгезии, сопряженный с рецептором G6, является основным компонентом базальной мембраны. Он соединяется с G(i)-, а также с G(s)-белками и необходим для нормальной дифференцировки промиелинизирующих шванновских клеток и для нормальной миелинизации аксонов [56]. Фактор Rho 18 действует как фактор обмена гуаниннуклеотидов (GEF) для GTPазы RhoA, индуцируя образование актиновых стрессовых волокон и выработку реактивных видов кислорода (ROS). Он может быть активирован субъединицами бета-гамма G-белков [57]. Нейрональная изоформа дистонина изучена плохо, но известно, что мутации в гене этого белка у мышей приводят к прогрессирующей дегенерации сенсорных нейронов. Такие мыши страдают сенсорной атаксией и погибают к возрасту отъема [50]. Четвертое предположение заключается в том, что эти белки являются партнерами G-белка, и взаимодействие с ними через цинкзависимый интерфейс влияет на функцию G-белка и связанные с ним процессы в клетке. Модель структуры фактора обмена гуаниннуклеотидов Rho 18, однако, предполагает, что сайт EVNH находится внутри белковой глобулы и недоступен для растворителя.

Пятое предположение заключается в том, что пептид Аβ может образовывать комплексы с двумя белками теплового шока – HSP 90-beta (P08238) и 90-beta-3 (Q58FF7) через цинкзависимый интерфейс и влияет на созревание, поддержание структуры и правильную регуляцию специфических белков-мишеней. Помимо шаперонной активности, он также играет роль в регуляции механизма транскрипции. HSP90 и его кошаперо-

ны модулируют транскрипцию, по крайней мере, на трех различных уровнях. Во-первых, они изменяют стабильные уровни определенных факторов транскрипции в ответ на различные физиологические сигналы. Во-вторых, они модулируют активность некоторых эпигенетических модификаторов, таких как деацетилазы гистонов или ДНК-метилтрансферазы, и реагируют на изменения в окружающей среде. В-третьих, они участвуют в миграции гистонов из промоторной области определенных генов и тем самым включают экспрессию генов [58].

На экспрессию генов также может влиять белок типа «цинковых пальцев» 541 (Q9H0D2). Этот регулятор транскрипции необходим для мужской фертильности и завершения мейотической профазы в сперматоцитах. Упомянутая выше тирозин-протеинфосфатаза нерецепторного типа 11 (Q06124) также задействована в каскаде различных рецепторных и цитоплазматических протеин-тирозинкиназ, участвуя в передаче сигнала с поверхности клетки в ядро. Известно, что белки с цинковыми пальцами [59] и тирозиновые фосфатазы [60] связаны с болезнью Альцгеймера, но точный механизм взаимодействия пока неизвестен.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе представлен оригинальный сервер PepString для поиска коротких аминокислотных последовательностей в базах данных UniprotKB и SwissProt. С использованием сервера PepString впервые показано, что тетрапептидный сайт EVNH, который является структурно-функциональной детерминантой бета-амилоида человека как в норме, так и при болезни Альцгеймера, присутствует в 63 изоформах 24 белков. На основании анализа данных об ассоциации этих белков с болезнью Альцгеймера предложена потенциальная роль кадгерина-18, рецептора Коксаки и аденовирусов, Е3-убиквитинлигазы DTX4, нейрональной изоформы дистонина и миомезина-2 в патогенезе болезни Альцгеймера. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда № 19-74-30007.*

*Авторы выражают благодарность
Ю.В. Кравацкому за помощь и ценные советы.*

*Приложения доступны на сайте
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27630>.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baig M.H., Ahmad K., Saeed M., Alharbi A.M., Barreto G.E., Ashraf G.M., Choi I. // Biomed. Pharmacother. 2018. V. 103. P. 574–581. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.025
- Livingston G., Huntley J., Sommerlad A., Ames D., Ballard C., Banerjee S., Brayne C., Burns A., Cohen-Mansfield J., Cooper C., et al. // Lancet Lond. Engl. 2020. V. 396. № 10248. P. 413–446. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30367-6
- Walker L.C. // Free Neuropathol. 2020. V. 1. P. 1–31. doi: 10.17879/freeneuropathology-2020-3025
- Long J.M., Holtzman D.M. // Cell. 2019. V. 179. № 2. P. 312–339. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001
- Querfurth H.W., LaFerla F.M. // N. Engl. J. Med. 2010. V. 362. № 4. P. 329–344. doi: 10.1056/NEJMr0909142
- Cohen S.I.A., Linse S., Luheshi L.M., Hellstrand E., White D.A., Rajah L., Otzen D.E., Vendruscolo M., Dobson C.M., Knowles T.P.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 24. P. 9758–9763. doi: 10.1073/pnas.1218402110
- Surguchov A., Emamzadeh F.N., Titova M., Surguchev A.A. // Biomedicines. 2023. V. 11. № 4. P. 1215. doi: 10.3390/biomedicines11041215
- Golde T.E., DeKosky S.T., Galasko D. // Science. 2018. V. 362. № 6420. P. 1250–1251. doi: 10.1126/science.aau0437
- Masters C.L., Selkoe D.J. // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012. V. 2. № 6. P. a006262. doi: 10.1101/cshperspect.a006262
- Kepp K.P. // Chem. Rev. 2012. V. 112. № 10. P. 5193–5239. doi: 10.1021/cr300009x
- Wang J., Gu B.J., Masters C.L., Wang Y.-J. // Nat. Rev. Neurol. 2017. V. 13. № 10. P. 612–623. doi: 10.1038/nrneurol.2017.111
- Cadoni M.P.L., Coradduzza D., Congiargiu A., Sedda S., Zinellu A., Medici S., Nivoli A.M., Carru C. // J. Clin. Med. 2024. V. 13. № 7. P. 2102. doi: 10.3390/jcm13072102
- Roher A.E., Esh C.L., Kokjohn T.A., Castaño E.M., van Vickle G.D., Kalback W.M., Patton R.L., Luehrs D.C., Dausgs I.D., Kuo Y.-M., et al. // Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc. 2009. V. 5. № 1. P. 18–29. doi: 10.1016/j.jalz.2008.10.004
- Brothers H.M., Gosztyla M.L., Robinson S.R. // Front. Aging Neurosci. 2018. V. 10. P. 118. doi: 10.3389/fnagi.2018.00118
- Jeong H., Shin H., Hong S., Kim Y. // Exp. Neurol. 2022. V. 31. № 2. P. 65–88. doi: 10.5607/en22004
- Kozin S.A., Kechko O.I., Adzhubei A.A., Makarov A.A., Mitkevich V.A. // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. № 1. P. 72. doi: 10.3390/ijms25010072
- Istrate A.N., Kozin S.A., Zhokhov S.S., Mantsyzov A.B., Kechko O.I., Pastore A., Makarov A.A., Polshakov V.I. // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 1. P. 21734. doi: 10.1038/srep21734
- Istrate A.N., Tsvetkov P.O., Mantsyzov A.B., Kulikova A.A., Kozin S.A., Makarov A.A., Polshakov V.I. // Biophys. J. 2012. V. 102. № 1. P. 136–143. doi: 10.1016/j.bpj.2011.11.4006
- Kulikova A.A., Tsvetkov P.O., Indeykina M.I., Popov I.A., Zhokhov S.S., Golovin A.V., Polshakov V.I., Kozin S.A., Nudler E., Makarov A.A. // Mol. Biosyst. 2014. V. 10. № 10. P. 2590–2596. doi: 10.1039/c4mb00332b
- Nisbet R.M., Nuttall S.D., Robert R., Caine J.M., Dolezal O., Hattarki M., Pearce L.A., Davydova N., Masters C.L., Varghese J.N., et al. // Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 2013. V. 81. № 10. P. 1748–1758. doi: 10.1002/prot.24312
- Zirah S., Kozin S.A., Mazur A.K., Blond A., Cheminant M., Ségalas-Milazzo I., Debey P., Rebuffat S. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 4. P. 2151–2161. doi: 10.1074/jbc.M504454200
- Kollmer M., Close W., Funk L., Rasmussen J., Bsoul A.,

- Schierhorn A., Schmidt M., Sigurdson C.J., Jucker M., Fändrich M. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 4760. doi: 10.1038/s41467-019-12683-8
23. Barykin E.P., Garifulina A.I., Tolstova A.P., Anashkina A.A., Adzhubei A.A., Mezentshev Y.V., Shelukhina I.V., Kozin S.A., Tsetlin V.I., Makarov A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 17. P. 6272. doi: 10.3390/ijms21176272
24. Lawrence J.L.M., Tong M., Alfulaij N., Sherrin T., Contarino M., White M.M., Bellinger F.P., Todorovic C., Nichols R.A. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2014. V. 34. № 43. P. 14210–14218. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0326-14.2014
25. Kozin S.A., Mezentshev Y.V., Kulikova A.A., Indeykina M.I., Golovin A.V., Ivanov A.S., Tsvetkov P.O., Makarov A.A. // *Mol. Biosyst.* 2011. V. 7. № 4. P. 1053–1055. doi: 10.1039/c0mb00334d
26. Kechko O.I., Adzhubei A.A., Tolstova A.P., Indeykina M.I., Popov I.A., Zhokhov S.S., Gnuchev N.V., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Kozin S.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 14. P. 11241. doi: 10.3390/ijms241411241
27. Khmeleva S.A., Radko S.P., Kozin S.A., Kiseleva Y.Y., Mezentshev Y.V., Mitkevich V.A., Kurbatov L.K., Ivanov A.S., Makarov A.A. // *J. Alzheimers Dis. JAD.* 2016. V. 54. № 2. P. 809–819. doi: 10.3233/JAD-160415
28. Zheng H., Koo E.H. // *Mol. Neurodegener.* 2006. V. 1. P. 5. doi: 10.1186/1750-1326-1-5
29. Chasseigneaux S., Allinquant B. // *J. Neurochem.* 2012. V. 120 Suppl 1. P. 99–108. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x
30. van Dyck C.H., Swanson C.J., Aisen P., Bateman R.J., Chen C., Gee M., Kanekiyo M., Li D., Reyderman L., Cohen S., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2023. V. 388. № 1. P. 9–21. doi: 10.1056/NEJMoa2212948
31. Kepp K.P., Robakis N.K., Høilund-Carlsen P.F., Sensi S.L., Vissel B. // *Brain J. Neurol.* 2023. V. 146. № 10. P. 3969–3990. doi: 10.1093/brain/awad159
32. Cummings J., Zhou Y., Lee G., Zhong K., Fonseca J., Cheng F. // *Alzheimers Dement.* 2023. V. 9. № 2. P. e12385. doi: 10.1002/trc2.12385
33. Ribarić S. // *Mol. Basel Switz.* 2018. V. 23. № 2. P. 283. doi: 10.3390/molecules23020283
34. Mitkevich V.A., Barykin E.P., Eremina S., Pani B., Katkova-Zhukotskaya O., Polshakov V.I., Adzhubei A.A., Kozin S.A., Mironov A.S., Makarov A.A., et al. // *Aging Dis.* 2023. V. 14. № 2. P. 309–318. doi: 10.14336/AD.2022.0827
35. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
36. Zhou J., Liyanage U., Medina M., Ho C., Simmons A.D., Lovett M., Kosik K.S. // *Neuroreport.* 1997. V. 8. № 8. P. 2085–2090. doi: 10.1097/00001756-199705260-00054
37. Cohen C.J., Shieh J.T.C., Pickles R.J., Okegawa T., Hsieh J.-T., Bergelson J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 26. P. 15191–15196. doi: 10.1073/pnas.261452898
38. Luissint A.-C., Artus C., Glacial F., Ganeshamoorthy K., Couraud P.-O. // *Fluids Barriers CNS.* 2012. V. 9. № 1. P. 23. doi: 10.1186/2045-8118-9-23
39. Nakamura Y., Sakudo A., Saeki K., Kaneko T., Matsumoto Y., Toniolo A., Itohara S., Onodera T. // *J. Gen. Virol.* 2003. V. 84. № Pt 12. P. 3495–3502. doi: 10.1099/vir.0.19222-0
40. Caruso P., Burla R., Piersanti S., Cherubini G., Remoli C., Martina Y., Saggio I. // *Virology.* 2009. V. 385. № 2. P. 343–350. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.005
41. Miao H., Burnett E., Kinch M., Simon E., Wang B. // *Nat. Cell Biol.* 2000. V. 2. № 2. P. 62–69. doi: 10.1038/35000008
42. Jakob S., Schroeder P., Lukosz M., Büchner N., Spyridopoulos I., Altschmied J., Haendeler J. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 48. P. 33155–33161. doi: 10.1074/jbc.M805138200
43. Noda S., Takahashi A., Hayashi T., Tanuma S., Hatakeyama M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 469. № 4. P. 1133–1139. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.117
44. Pannone L., Bocchinfuso G., Flex E., Rossi C., Baldassarre G., Liszewski C., Pantaleoni F., Consoli F., Lepri F., Magliozzi M., et al. // *Hum. Mutat.* 2017. V. 38. № 4. P. 451–459. doi: 10.1002/humu.23175
45. Matthews R.T., Yang L., Browne S., Baik M., Beal M.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 15. P. 8892–8897. doi: 10.1073/pnas.95.15.8892
46. Yang X., Yang Y., Li G., Wang J., Yang E.S. // *J. Mol. Neurosci. MN.* 2008. V. 34. № 2. P. 165–171. doi: 10.1007/s12031-007-9033-7
47. Kaufmann P., Thompson J.L.P., Levy G., Buchsbaum R., Shefner J., Krivickas L.S., Katz J., Rollins Y., Barohn R.J., Jackson C.E., et al. // *Ann. Neurol.* 2009. V. 66. № 2. P. 235–244. doi: 10.1002/ana.21743
48. Cui J., Li Y., Zhu L., Liu D., Songyang Z., Wang H.Y., Wang R.-F. // *Nat. Immunol.* 2012. V. 13. № 4. P. 387–395. doi: 10.1038/ni.2239
49. Chen Y., Lu P., Wu S., Yang J., Liu W., Zhang Z., Xu Q. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 4. P. 2293. doi: 10.3390/ijms25042293
50. Brown A., Dalpé G., Mathieu M., Kothary R. // *Genomics.* 1995. V. 29. № 3. P. 777–780. doi: 10.1006/geno.1995.9936
51. Young K.G., Kothary R. // *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2007. V. 64. № 12. P. 897–905. doi: 10.1002/cm.20235
52. Sanbe A., Osinska H., Saffitz J.E., Glabe C.G., Kaye R., Maloyan A., Robbins J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 27. P. 10132–10136. doi: 10.1073/pnas.0401900101
53. Lutsch G., Vetter R., Offhauss U., Wieske M., Gröne H.J., Klemenz R., Schimke I., Stahl J., Benndorf R. // *Circulation.* 1997. V. 96. № 10. P. 3466–3476. doi: 10.1161/01.cir.96.10.3466
54. Baumkötter F., Schmidt N., Vargas C., Schilling S., Weber R., Wagner K., Fiedler S., Klug W., Radzimanowski J., Nickolaus S., et al. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2014. V. 34. № 33. P. 11159–11172. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0180-14.2014
55. Ariyoshi M., Katane M., Hamase K., Miyoshi Y., Nakane M., Hoshino A., Okawa Y., Mita Y., Kaimoto S., Uchihashi M., et al. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 43911. doi: 10.1038/srep43911
56. Mogha A., Benesh A.E., Patra C., Engel F.B., Schöneberg T., Liebscher I., Monk K.R. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2013. V. 33. № 46. P. 17976–17985. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1809-13.2013
57. Nakajima H., Tanoue T. // *J. Cell Biol.* 2011. V. 195. № 2. P. 245–261. doi: 10.1083/jcb.201104118
58. Khurana N., Bhattacharyya S. // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. P. 100. doi: 10.3389/fonc.2015.00100
59. Bu S., Lv Y., Liu Y., Qiao S., Wang H. // *Front. Neurosci.* 2021. V. 15. P. 760567. doi: 10.3389/fnins.2021.760567
60. Fontán-Baselga T., Cañeque-Rufo H., Rivera-Illades E., Gramage E., Zapico J.M., de Pascual-Teresa B., Ramos-Álvarez M.D.P., Herradón G., Vicente-Rodríguez M. // *Front. Pharmacol.* 2024. V. 15. P. 1506049. doi: 10.3389/fphar.2024.1506049

УДК 576.364

Получение и характеристика линии эмбриональных стволовых клеток мыши с нокаутом гена иммунопротеасомы *Psmb9*

Д. В. Кригер*, У. И. Поденкова, А. А. Кузьмин, Н. Д. Аксенов, А. В. Кропачева, А. С. Зиновьева, А. В. Селенина, А. Н. Томилин, А. С. Цимоха**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: daryamalikova@gmail.com; **E-mail: atsimokha@incras.ru

Поступила в редакцию 06.12.2024

Принята к печати 15.05.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27583

РЕФЕРАТ Иммунопротеасомы – специализированные протеасомные комплексы, играющие ключевую роль в презентации антигенов и регуляции клеточного гомеостаза. В отличие от конститутивной 20S протеасомы, каталитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ в иммунопротеасоме заменяются на индуцибельные изоформы: $\beta 1i$ (*Lmp2*), $\beta 2i$ (*Mecl-1*) и $\beta 5i$ (*Lmp7*). Экспрессия генов этих субъединиц (*Psmb9*, *Psmb10* и *Psmb8*) активируется под действием цитокинов, главным образом интерферона- γ . Накапливаются данные, свидетельствующие об экспрессии иммунопротеасом в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК), однако их роль в поддержании плюрипотентности, процессах самообновления и дифференцировки не изучена. С использованием технологии CRISPR/Cas9 нами создана линия эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши с нокаутом гена *Psmb9* (*Psmb9KO*). Клетки этой линии имеют нормальный кариотип, морфологию, пролиферативную активность и способность к образованию тератом, включающих производные всех трех зародышевых листков. Однако при дифференцировке под действием ретиноевой кислоты и интерферона- γ в клетках *Psmb9KO* накапливаются предшественники *Mecl-1*, что указывает на изменения в сборке иммунопротеасом. Кроме того, выявлено увеличение каспаза-подобной активности иммунопротеасом, что свидетельствует о включении конститутивной $\beta 1$ -субъединицы в состав комплекса вместо *Lmp2*. Показана пластичность убиквитин-протеасомной системы в поддержании протеостаза клетки за счет механизмов, компенсирующих отсутствие *Lmp2*. Линия *Psmb9KO* представляет собой удобную модель для изучения роли иммунопротеасом в регуляции протеостаза в дифференцировке на ранних этапах эмбриогенеза млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Psmb9*, *Lmp2*, иммунопротеасома, эмбриональные стволовые клетки мыши, дифференцировка.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ УПС – убиквитин-протеасомная система; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; АФК – активные формы кислорода; CL – каспаза-подобная активность; RA – ретиноевая кислота; IFN γ – интерферон- γ .

ВВЕДЕНИЕ

Для нормального функционирования и поддержания целостности организм должен обеспечивать постоянный оборот белков внутри клеток. Клеточный протеостаз – динамическое равновесие белков в клетке – обеспечивается скоординированной работой системы синтеза белков *de novo* и механизмов деградации поврежденных или ненужных белков. В клетке деградация белков осуществляется преимущественно двумя системами: аутофагией и убиквитин-протеасомной системой (УПС). УПС отвечает за деградацию не менее 80% внутриклеточных белков [1]. Эта специализированная система распознает

убиквитинированные белки и направляет их на расщепление в протеасоме.

Центральным элементом УПС является протеасома – мультисубъединичный белковый комплекс, который расщепляет белки на пептиды. Принято выделять несколько типов протеасомных комплексов в зависимости от состава протеолитических субъединиц и регуляторного комплекса, взаимодействующего с коровой частицей [2]. Протеасомные комплексы, содержащие коровую частицу 20S и регулятор 19S, принято называть 26S протеасомой. Коровая частица – 20S протеасома – образована сложенными друг на друга четырьмя кольца-

ми, что придает ей бочкообразную форму. Каждое кольцо включает семь субъединиц: либо альфа (α), либо бета (β), расположенных в строгой последовательности $\alpha\beta\beta\alpha$. Такое расположение колец приводит к образованию внутри протеасомы замкнутых пространств, известных как «камеры» [3]. Протеолитическое расщепление белковых субстратов, попавших в протеасому, происходит в «каталитической» камере, образованной двумя центральными β -кольцами. У эукариот протеолитической активностью обладают три субъединицы, которые принято называть $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$. Эти каталитические субъединицы различаются своей субстратной специфичностью. Субъединица $\beta 1$ обладает способностью расщеплять пептидные связи после «кислых» аминокислотных остатков, такая активность получила название каспаза-подобной. Субъединица $\beta 2$ имеет трипсиноподобную активность, она расщепляет полипептидные цепи после «основных» аминокислот. В свою очередь, $\beta 5$ -субъединица обладает химотрипсин-подобной активностью, гидролизует пептидные связи после гидрофобных остатков аминокислот. Каталитическая камера полностью закрыта для внешней среды, что предотвращает случайную деградацию белков и обеспечивает специфичность процесса. N-Концевые последовательности α -субъединиц образуют ворота, ограничивающие доступ белков-субстратов в каталитическую камеру коровой частицы и открываются только при связывании с регуляторной частицей [4], что обеспечивает строгую регуляцию процесса деградации белков.

В ответ на стимуляцию клеток млекопитающих интерфероном- γ (IFN γ) индуцируется экспрессия альтернативных каталитических субъединиц, что приводит к сборке модифицированной 20S протеасомы, известной как иммунопротеасома [5]. В иммунопротеасоме конститутивные каталитические β -субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$) заменены на индуцируемые аналоги: Lmp2 ($\beta 1i$), Mecl-1 ($\beta 2i$) и Lmp7 ($\beta 5i$). Эти замены приводят к изменению протеолитической активности протеасомного комплекса [5, 6], поскольку для субъединиц Lmp2 ($\beta 1i$) и Lmp7 ($\beta 5i$) характерна химотрипсин-подобная активность, для Mecl-1 ($\beta 2i$) – трипсин-подобная. Иммунопротеасомы играют центральную роль в формировании пептидных антигенов для представления через МНС I [7], что делает их ключевыми участниками противовирусной [8] и противоопухолевой защиты [9]. Помимо презентации антигенов, иммунопротеасомы участвуют в регуляции протеостаза, предотвращая накопление поврежденных или неправильно свернутых белков в клетке [10, 11]. Кроме того, в процессе дифференцировки эмбрио-

нальных стволовых клеток (ЭСК) человека наблюдается постепенное снижение активности иммунопротеасом, что предполагает их участие в адаптивных изменениях клеточного состояния [12]. Показано также, что иммунопротеасомы участвуют в деградации окисленных белков, что особенно важно для поддержания целостности протеома в условиях клеточного стресса, вызванного дифференцировкой. Например, в ЭСК мышцы иммунопротеасомы активируются в ответ на накопление окисленных белков, однако эта активность значительно возрастает именно в ходе дифференцировки, а не в состоянии плюрипотентности [13, 14]. Наши исследования показали, что в ЭСК мышцы активация экспрессии всех трех каталитических субъединиц иммунопротеасомы происходит при выходе клеток из состояния наивной плюрипотентности [15]. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что роль иммунопротеасом в плюрипотентных клетках может быть связана с подготовкой к дифференцировке, обеспечивая деградацию поврежденных белков и поддержание клеточного гомеостаза. Тем не менее функциональная роль иммунопротеасом в поддержании плюрипотентности и самообновления в ЭСК остается в значительной степени неизученной.

Ранее нами была получена и охарактеризована клеточная линия ЭСК мышцы с нокаутом гена *Psm8*, кодирующего субъединицу Lmp7 ($\beta 5i$) иммунопротеасомы [16]. Чтобы детально изучить вклад отдельных каталитических субъединиц иммунопротеасомы в раннем эмбриогенезе, мы получили ЭСК мышцы с нокаутом гена *Psm9*, кодирующего еще одну каталитическую субъединицу иммунопротеасомы – Lmp2 ($\beta 1i$). Полученные клеточные линии были генотипированы, кариотипированы и функционально охарактеризованы: определены скорость пролиферации, экспрессия маркеров плюрипотентности, уровни экспрессии Lmp7 и Mecl-1, протеолитические активности протеасом, а также способность к дифференцировке *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

В работе использовали ЭСК мышцы линии E14 Tg2a. Клетки культивировали при постоянной температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Использовали культуральную посуду, предварительно обработанную 0.1% раствором желатина (Sigma, США), и среду SL на основе Knockout DMEM (Thermo Fisher, США), дополненную 15% инактивированной эмбриональной бычьей сывороткой (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Великобритания), 100 Ед/мл пенициллина

Таблица 1. Последовательности gRNA и потенциальных off-target-сайтов с соответствующими праймерами для амплификации выбранных участков генома

Тип	Последовательность (5' -> 3')	Score	Хромосомный участок, подверженный разрезанию	Праймеры (5' -> 3')
gRNA	GTTTGACGGGGGTGTCGTGG	100	chr17:-34404735	AACTGCAGATAACACAGTCCATC
				CCAGGACCAGGAAAGACCTGG
Off-target 1	GTGTGAAGGGGGGTGTCATGG	0.9	chr7:+15781982	AAGTGCAGGTCCTCTGAAAAGAA
				AGAAATGGAGTAGTGTGCTCCACAA
Off-target 2	AGTAGACGGGGGTGTCGTGC	0.9	chr16:+96466310	CTCTTGTCTTCCTCTCCCTGT
				GCTTGGACCCTAGAGTGGAA
Off-target 3	GTCAGACTGGGGGTGTCCTGG	0.7	chr6:+28141384	TCGGATCTAGGAAGCAGTCTC
				GCAGTAGATAGCCTGAACCTG
Off-target 4	TTATGACGTGAGTGTCTGTGG	0.6	chr14:-118326405	AGTCTGGTCTAGAGCTGTCTCTC
				TCCTTTGGGAGTAGGGCTATGT
Off-target 5	GCTGGATGGGGGTGTCCTGG	0.5	chr5:+114566059	ATAAACGGCCAAGGTCAACC
				TGGGAGACACAGATTCCCTAAACT

и 100 мг/мл стрептомицина (Thermo Fisher, США), 2 mM L-глутамина (Thermo Fisher), 100 мкМ раствором заменимых аминокислот (Thermo Fisher), 100 мкМ β-меркаптоэтанола (Sigma, Германия) и 500 Ед/мл лейкоингибирующего фактора (LIF, получен в нашей лаборатории).

Для оценки уровня белков субъединиц иммунного протеасома клетки ЭСК дифференцировали в течение 2 дней в среде SL без LIF с добавлением 0.1 мкМ ретиноевой кислоты (RA, Sigma). Затем клетки продолжали культивировать еще сутки в среде с добавлением IFNγ (ProSpec, Израиль) в концентрации 150 Ед/мл.

Создание ЭСК мыши с нокаутом гена *Psmb9*

Нокаут гена *Psmb9* был выполнен с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. С помощью онлайн-инструмента Benchling (<https://www.benchling.com>) была подобрана последовательность гидовой РНК (gRNA: 5'-GTTTGACGGGGGTGTCGTGG-3') для последующего клонирования в вектор pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSp-Cas9 (Addgene), содержащий ген зеленого флуоресцентного белка GFP. Для получения контрольной линии ЭСК трансфицировали неспецифичной gRNA (Scrambled) [17]. Трансфекцию проводили с использованием реагента FuGene HD (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя. Селекцию трансфицированных клеток проводили методом сортировки при помощи S3e Cell Sorter (Bio-Rad Lab., США). Клетки подготавливали в соответствии с процедурой, описанной ранее [16]. Отсортированные клетки высевали с низкой плот-

ностью и культивировали в течение 10–14 дней. Отобранные клоны проверяли при помощи иммуноблотинга с антителами к Lmp2 и секвенирования.

Выделение геномной ДНК и секвенирование

Геномную ДНК выделяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [17]. Области, прилегающие к целевой последовательности gRNA, амплифицировали с помощью ПЦР, используя праймеры 5'-AACTGCAGATAACACAGTCCATC-3' и 5'-CCAGGACCAGGAAAGACCTGG-3', и клонировали в вектор pAL2-T («Евроген», Россия). Последующее секвенирование («Евроген») осуществляли с использованием универсального праймера M13.

Поиск потенциальных нецелевых участков (off target) для gRNA был выполнен также с помощью онлайн-инструмента Benchling. Геномные области, охватывающие эти участки, амплифицировали методом ПЦР с использованием специфичных праймеров (табл. 1) и секвенировали («Евроген»).

Кариотипирование

Метафазные пластинки были приготовлены в соответствии с процедурой, описанной ранее [18]. Микроскопический анализ препаратов проводили с использованием системы EVOS FL Auto Imaging System (Applied Biosystems, США), применяя иммерсионное масло, при ×100 увеличении. Хромосомы подсчитывали с использованием программы Fiji (ImageJ). Линию считали нормальной, если выборка содержала более 90% клеток со стандартным для мыши количеством хромосом – 40.

Определение пролиферативной активности ЭС клеток

Пролиферативную активность клеток контрольных линий (Scr) и с нокаутом гена *Psm9* (*Psm9*KO) оценивали на третьи сутки после посева. Клетки пассировали в концентрации 5×10^3 живых клеток/см². Перед подсчетом клетки трипсинизировали в растворе 0.05% трипсина/EDTA (Gibco, США), осаждали и осадок ресуспендировали в PBS, содержащем 50 мкг/мл йодида пропидия (PI). Подсчет клеток проводили на проточном цитометре Coulter EPICS XL Flow Cytometer (Beckman Coulter, США).

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток и микроскопия

Иммуноцитохимическое окрашивание проводили в соответствии с процедурой, описанной ранее [19]. Съемку и последующий анализ изображений осуществляли при помощи системы высокопроизводительного скрининга CellVoyager CQ1 (Yokogawa Electric, Япония). Использованные первичные антитела – Nanog (1:500, Bethyl A300-397), Oct4 (1:300, Santa Cruz sc-5279), и вторичные антитела, слитые с флуорофорами Alexa 488 и 568 (a-11008 и a-11004 соответственно (Invitrogen, США)).

Иммуноблоттинг

Клеточные экстракты получали с использованием метода, описанного ранее [15]. Каждый образец разделяли при помощи электрофореза в 13% полиакриламидном геле, содержащем SDS, белки переносили на 0.45 мкм PVDF-мембрану в трис-глициновом буфере (Bio-Rad). После переноса мембрану инкубировали в растворе 5% обезжиренного молока в буфере PBS. Для визуализации белков мембрану инкубировали со специфичными первичными антителами в течение ночи при +4°C, а затем в течение 1 ч с соответствующими вторичными антителами. Хемилюминесценцию регистрировали с помощью системы гель-документации ChemiDoc (Bio-Rad, США). В работе использовали первичные антитела к следующим белкам: Lmp2 (1:500, Abclonal A9549), Lmp7 (1:5000, любезно предоставлены профессором, доктором Ульрике Зайферт (Prof. Dr. Ulrike Seifert), Медицинский университет Грайфсвальда (Германия), Mecl-1 (1:500, Abcam ab183506), Oct4 (1:500, Santa Cruz sc-5279), Nanog (1:500, Cell Signaling #8822), α 7 (1:1000, Enzo Life Sciences PW8110), β 2 (1:1000, Enzo Life Sciences PW9300), β 5 (1:1000, Bethyl A303-847), Rpn1 (1:1000, ServiceBio GB113525), Rpt2 (1:1000, ServiceBio GB114427), β -Actin (1:5000, Cell Signaling #3700), а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP): против кроличьих IgG (1:5000, Jackson

ImmunoResearch, 111-035-003) и против мышинных IgG (1:5000, Jackson ImmunoResearch, 115-035-062).

Определение протеолитической активности протеасом

Каспаза-подобную (CL) пептидазную активность протеасом в клеточных экстрактах (~6 мкг) измеряли с использованием субстрата Z-LLE-AMC (карбоксибензил-Leu-Leu-Glu-7-амидо-4-метилкумарин) (Enzo Life Sciences, Германия) в концентрации 0.25 мМ. Реакцию проводили в буфере 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), содержащем 5 мМ MgCl₂, 40 мМ KCl, 1 мМ DTT и 1 мМ ATP, при 37°C в течение 30 мин согласно [20]. Реакцию останавливали, добавляя равный объем 2% SDS. Активность протеасом определяли по уровню флуоресценции свободного AMC (7-амино-4-метилкумарин) с использованием флуориметра VersaFluor (Bio-Rad) при длинах волн возбуждения 340–380 нм и эмиссии 455–465 нм. Полученные значения нормировали путем вычитания фоновой флуоресценции, пересчитывали с учетом уравнивающего коэффициента (получен после определения концентрации белка в пробах), вычисляли среднее значение и стандартное отклонение.

Тератомный тест

Эксперименты выполняли на мышах BALB/c, полученных из питомника лабораторных животных Лобачевского университета (Нижний Новгород). Животных содержали в индивидуальных клетках при 12-часовом цикле свет/темнота в помещении с контролируемой температурой (22°C) с доступом к пище и воде *ad libitum*. Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 года, а также были одобрены Комиссией по биологической безопасности и биоэтике Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), протокол № 02/24 от 06.06.2024. Полученные ЭСК для оценки их плюрипотентных свойств вводили подкожно (2×10^6 клеток) в задние конечности мышей. Через четыре недели после инъекции мышей подвергали эвтаназии. Полученные тератомы извлекали, взвешивали, фиксировали в растворе Буэна (пикриновая кислота, насыщенный водный раствор – 75 мл; формалин, 40% водный раствор – 25 мл; ледяная уксусная кислота – 5 мл) и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 7 мкм, которые депарафинировали, окрашивали гематоксилин-эозином (BioVitrum, Россия), проводили микроскопические исследования (EVOS FL Auto Imaging System, Applied Biosystems, США).

Статистический анализ

Все представленные изображения иммунофлуоресценции и иммуноблотинга являются репрезентативными для, как минимум, трех независимых экспериментов. При анализе образцов с использованием проточной цитометрии оценено не менее 1×10^4 клеток. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD) не менее трех повторностей. Статистическую значимость определяли при уровне $p < 0.05$ с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), выполненного в программе GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Линии ЭСК с нокаутом гена *Psmb9* (*Psmb9KO*) получали с использованием системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. gRNA, нацеленную на второй экзон гена *Psmb9*, клонировали в плазмиду pX330-U6-Chimeric-BB-CBh-hSp-Cas9, также кодирующую зеленый флуоресцентный белок GFP. Конструкцию в клетки доставляли с помощью трансфекции, после чего GFP-положительные клетки отбирали сортировкой (см. «Экспериментальную часть»). Таким образом было отобрано более 20 клонов, в которых, согласно данным иммуноблотинга, отсутствовал белок Lmp2. При помощи ТА-клонирования и секвенирования среди этих клонов были идентифицированы клоны, содержащие инделы (инсерции и/или делеции) в обоих аллелях гена *Psmb9* (рис. 1А). Как и ожидалось, такие мутации вызывали сдвиг рамки считывания, что приводило к нарушению трансляции функционального белка Lmp2 (рис. 1Б). В отобранных клонах *Psmb9KO* ЭСК проверили пять наиболее вероятных потенциальных нецелевых (off-target) участков (табл. 1), которые могли быть модифицированы в результате неспецифического взаимодействия с gRNA. Кроме того, подсчет числа хромосом во всех отобранных клонах *Psmb9KO* ЭСК подтвердил, что все отобранные линии *Psmb9KO* ЭСК содержат 40 хромосом (рис. 1В), что соответствует нормальному кариотипу ЭСК мыши. Все анализируемые клеточные линии КО2-3, КО2-5 и КО2-15, культивируемые на покрытой желатином пластиковой подложке, не отличались по морфологическим характеристикам от контрольных клеток (Scr) (рис. 2А). Кроме того, у всех трех линий показатели пролиферации и гибели клеток *in vitro* были сопоставимы с показателями у контрольных линий (рис. 2Б).

Иммуноцитохимическое определение экспрессии ключевых факторов плюрипотентности, таких как Nanog, Oct4 и Sox2, не выявили изменений в окрашивании этих факторов в зависимости от уровня экспрессии гена *Psmb9* (рис. 3А). Кроме того, результаты иммуноблотинга подтвердили,

что потеря белка Lmp2 не влияет на уровни факторов Nanog и Oct4 (рис. 3Б).

Далее мы проверили способность клеток *Psmb9KO* к дифференцировке *in vivo* в составе тератом. Размеры тератом, образованных клетками *Psmb9KO*, были такими же, как у тератом, образованных контрольными клетками (табл. 2, рис. 4А). Гистологический анализ показал, что как контрольные, так и *Psmb9KO* клетки успешно дифференцировались в производные всех трех зародышевых листков: участки ороговевающего эпителия и нейроэпителиальных розеток (эктодерма), хрящ (мезодерма) и реснитчатый эпителий (энтодерма) (рис. 4Б). Таким образом, нами успешно создана панель клеточных линий ЭСК мыши с нокаутом гена *Psmb9*, полезных для дальнейших исследований.

Иммуноблот-анализ экспрессии протеасомных белков в *Psmb9KO* ЭСК выявил отсутствие видимых изменений в уровнях субъединиц $\alpha 7$, $\beta 2$ и $\beta 5$ 20S протеасомы (рис. 5А, Б). Уровни белков субъединиц регуляторной субчастицы 19S (Rpn1 и Rpt2) оставались также неизменными, что указывает на стабильность базового состава протеасомного комплекса в отсутствие продукта гена *Psmb9*. Не зафиксировано также значимых различий в экспрессии иммунопротеасомных субъединиц Lmp7 ($\beta 5i$) и Mecl-1 ($\beta 2i$) между *Psmb9KO* и контрольными ЭСК. В то же время в дифференцированных с помощью ретиноевой кислоты (RA) и обработанных интерфероном- γ (IFN γ) клетках *Psmb9KO* наблюдалась тенденция к снижению содержания зрелой формы иммунопротеасомной субъединицы Mecl-1 ($\beta 2i$) и, напротив, к накоплению ее непротесированной формы (pro-Mecl-1) по сравнению с контрольными ЭСК, однако эти различия не достигали статистической значимости (рис. 5А, Б). Тем не менее расчет соотношения уровней сигнала от прекурсорной формы pro-Mecl-1 и от зрелой формы Mecl-1 выявил достоверное накопление прекурсора в клетках с нокаутом *Psmb9* по сравнению с контролем (рис. 5А, Б). Мы не имели возможности оценить уровни каталитической субъединицы $\beta 1$ в клетках *Psmb9KO* из-за отсутствия специфических антител, поэтому проанализировали пептидазную активность 20S протеасомы в клеточных экстрактах с помощью флуорогенного субстрата, специфического для данной субъединицы, и показали, что по сравнению с контрольными клетками каспаза-подобная активность существенно возрастает в *Psmb9KO* ЭСК при RA-индуцированной дифференцировке и последующей обработке клеток IFN γ , что свидетельствует об увеличенной экспрессии $\beta 1$ -субъединицы в клетках *Psmb9KO* и ее встраивании в 20S протеасому вместо Lmp2, $\beta 1i$ (рис. 5Б).

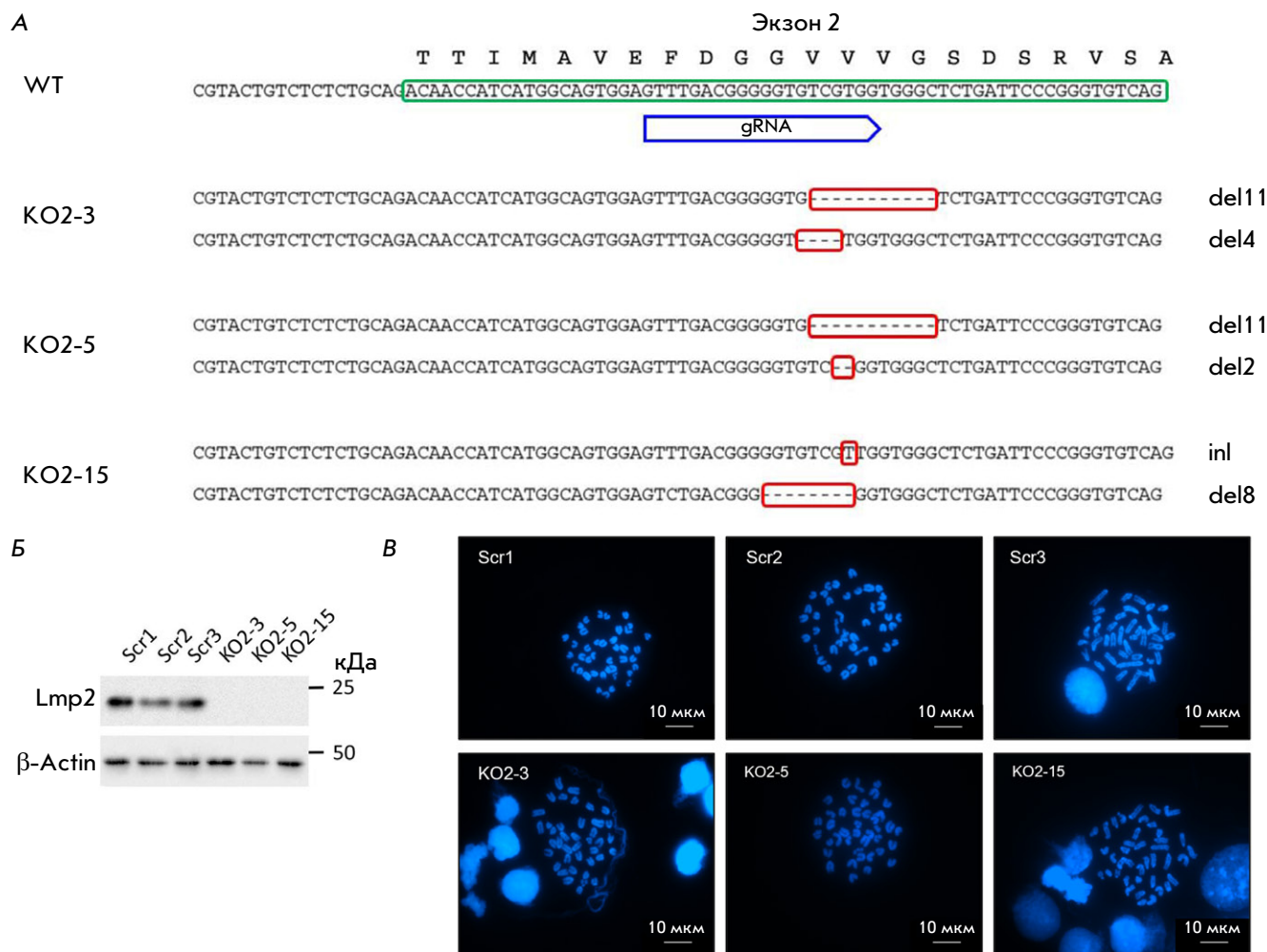


Рис. 1. Подтверждение получения нокаутов ЭСК мыши по гену *Psmb9*. А — результаты генотипирования трех линий ЭСК с нокаутом гена *Psmb9* (KO2-3, KO2-5, KO2-15). WT — последовательность второго экзона гена *Psmb9* ЭСК дикого типа. Инделы выделены красным прямоугольником; del — делеция, in — инсерция. Б — оценка уровня белка Lmp2 методом иммуноблоттинга в клеточных лизатах, полученных из клонов *Psmb9*КО и контрольных линий (Scr1–3) после дифференцировки, индуцированной обработкой RA и IFN γ (см. раздел «Экспериментальная часть»). β -Actin использован как контроль нагрузки белка. В — репрезентативные изображения метафазных пластинок клеток контрольных линий (Scr) и *Psmb9*КО; хромосомы окрашены DAPI. Масштабный отрезок — 10 мкм

Согласно опубликованным данным, отсутствие Lmp2 в клетках мыши и крысы может способствовать развитию окислительного стресса за счет накопления активных форм кислорода (АФК) [21, 22]. Нами проведен сравнительный анализ продукции АФК в клетках с нокаутом *Psmb9* и контрольных линиях. Обнаружено увеличение уровня АФК во всех исследуемых клетках, полученных в ходе RA-индуцированной дифференцировки и обработки IFN γ . Однако различий в продукции АФК, связанных с экспрессией *Psmb9*, не обнаружено (рис. 5Г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунопротеасомная субъединица Lmp2 (β 1i), кодируемая геном *Psmb9*, играет важную роль во мно-

жестве процессов, связанных с иммунной защитой [23–26], поддержанием клеточного гомеостаза [10, 21, 27, 28] и развитием тканей [22, 29]. Кроме того, показано, что экспрессия *Psmb9*, наряду с другими субъединицами иммунопротеасомы, важна на ранних этапах эмбриогенеза млекопитающих [12]. Учитывая многообразие функций Lmp2 в клетках человека, изучение механизмов ее действия представляет большой интерес. В рамках проведенного исследования с использованием технологии CRISPR/Cas9 нами создана клеточная модель ЭСК мыши с нокаутом гена *Psmb9*. Полученные линии не имели нарушений в скорости роста и уровне экспрессии ключевых маркеров плюрипотентности по сравнению с контрольными линиями. Кроме того, они

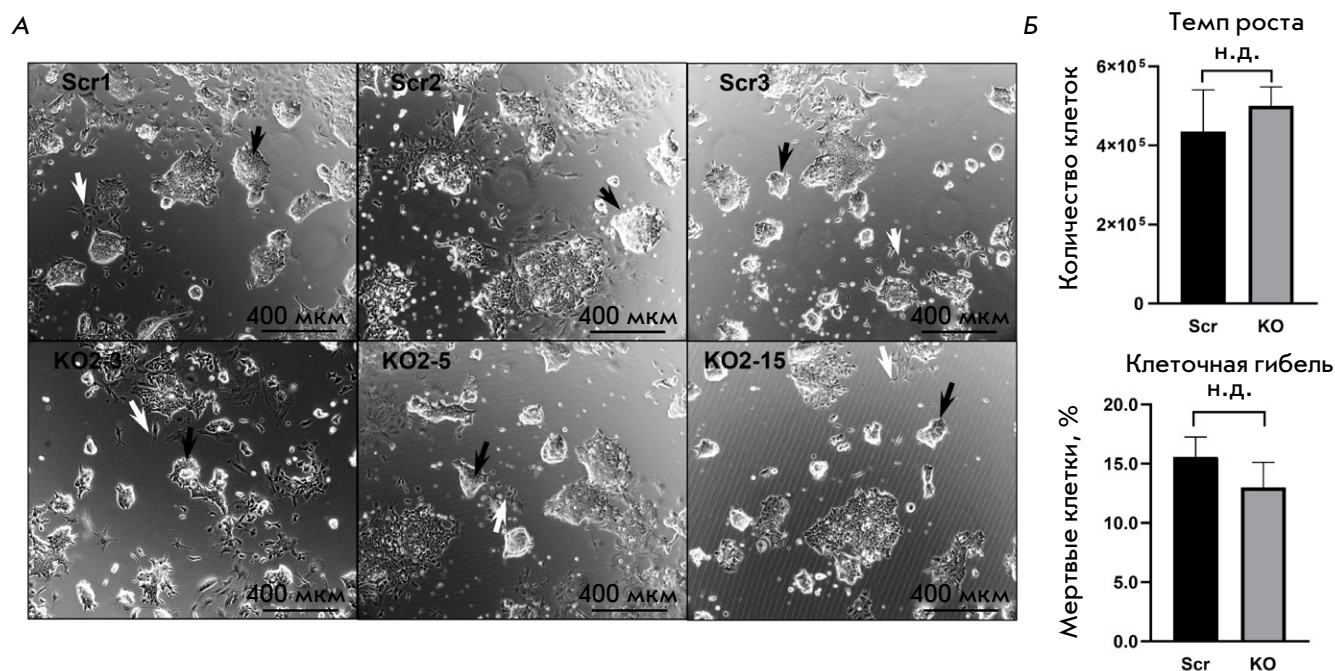


Рис. 2. Нокаут гена *Psmb9* не влияет на морфологические и пролиферативные характеристики ЭСК мыши. **А** — изображения культур ЭСК *Psmb9*KO и контрольных линий (Scr1–3). Колонии с морфологией, характерной для недифференцированных ЭСК, отмечены черными стрелками. Клетки, подвергшиеся спонтанной дифференцировке, отмечены белыми стрелками. **Б** — оценка пролиферативного потенциала линий *Psmb9*KO в сравнении с контрольными линиями (Scr). Анализ клеточной гибели проводили с использованием окрашивания йодидом пропидия (PI). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$). н.д. — статистически не достоверно (однофакторный дисперсионный анализ)

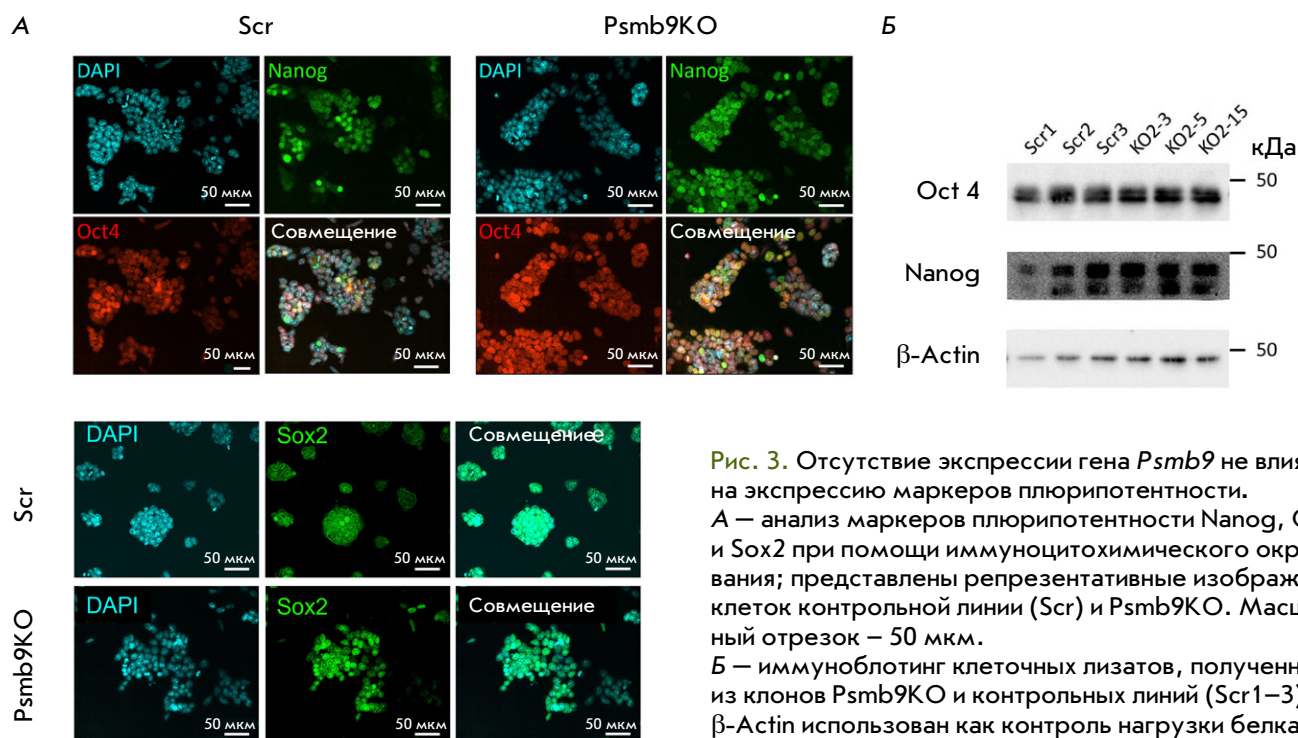


Рис. 3. Отсутствие экспрессии гена *Psmb9* не влияет на экспрессию маркеров плюрипотентности. **А** — анализ маркеров плюрипотентности Nanog, Oct4 и Sox2 при помощи иммуноцитохимического окрашивания; представлены репрезентативные изображения клеток контрольной линии (Scr) и *Psmb9*KO. Масштабный отрезок — 50 мкм. **Б** — иммуноблотинг клеточных лизатов, полученных из клонов *Psmb9*KO и контрольных линий (Scr1–3). β-Actin использован как контроль нагрузки белка

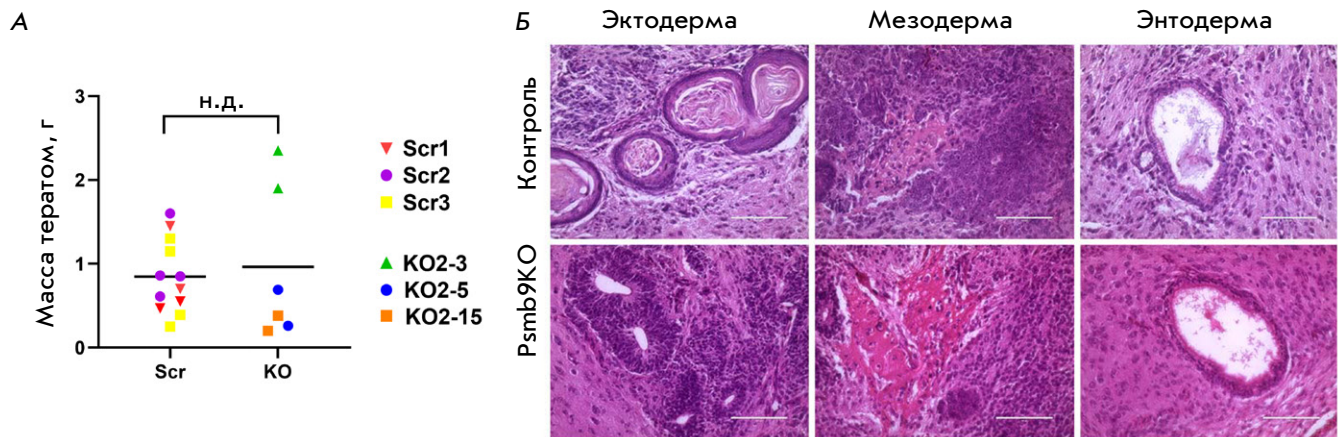


Рис. 4. Оценка плюрипотентных свойств *in vivo* линий ЭСК с нокаутом гена *Psmb9* с помощью тератомного теста. А — на диаграмме представлены индивидуальные значения массы тератом, образованных контрольными клетками (Scr) и линиями *Psmb9* KO. Горизонтальная линия обозначает среднее значение массы тератом для каждой группы. н.д. — статистически недостоверно (однофакторный дисперсионный анализ). Б — гистологический анализ тератом, образованных *Psmb9* KO ЭСК. Во всех тератомах обнаружены ткани, характерные для производных трех зародышевых листков: эктодермы (ороговевающий эпителий и нейроэпителиальные розетки), мезодермы (хондробласты и хондроциты в мезенхиме) и энтодермы (дифференцирующийся энтеродермальный эпителий). Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок — 100 мкм

Таблица 2. Индивидуальные значения массы тератом, полученных после трансплантации мышам контрольных (Scrambled) эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и с нокаутом гена *Psmb9* (*Psmb9* KO)

Группа	Тип ЭСК	Количество животных (n)	Индивидуальные значения массы тератом, г
Контроль	Scrambled #1	4	1.45, 0.7, 0.55, 0.47
	Scrambled #2	4	0.85, 1.6, 0.86, 0.61
	Scrambled #3	4	1.3, 1.15, 0.39, 0.25
<i>Psmb9</i> KO	KO 2-3	2	1.9, 2.35
	KO 2-5	2	0.69, 0.26
	KO 2-15	2	0.38, 0.20

успешно формировали тератомы в мышах с иммунодефицитом. Гистологический анализ тератом выявил структуры, относящиеся к производным всех трех зародышевых листков, что подтверждает сохранение плюрипотентных свойств *Psmb9*-дефицитных ЭСК. Отсутствие экспрессии *Psmb9* не вызывало изменений в уровне белков протеасом $\alpha 7$ и каталитических $\beta 2$ и $\beta 5$, а также двух других субъединиц иммунопротеасомы — *Lmp7* ($\beta 5i$) и *Mecl-1* ($\beta 2i$). Однако в дифференцированных с помощью RA и обработанных $IFN\gamma$ *Psmb9* KO ЭСК мы наблюдали накопление прекурсорной формы *Mecl-1*. Это свидетельствует о том, что в ЭСК мыши иммунопротеасомы без субъединицы *Lmp2* способны существовать в виде промежуточной, хотя и собирающейся с меньшей эффективностью формы, что соответствует ранее опубликованным данным [23]. Кроме того, в процессе дифференцировки *Psmb9* KO ЭСК увеличивалась ка-

спаза-подобная активность 20S протеасомы. Это указывает на вероятное компенсаторное встраивание в иммунопротеасомный комплекс $\beta 1$ -субъединицы вместо *Lmp2*. Такой механизм замещения можно рассматривать как адаптивный ответ на отсутствие *Lmp2*, который служит для поддержания функциональной активности УПС в дифференцированных клетках, индуцированных $IFN\gamma$.

Гены *Psmb9* и *Psmb8*, кодирующие субъединицы *Lmp2* и *Lmp7* соответственно, расположены в локусе главного комплекса гистосовместимости второго типа (МНС II) [30]. С момента первого их описания исследователи уделяли большое внимание изучению функций этих субъединиц в формировании иммунного ответа. Нарушение функции *Lmp2* приводило к нарушению презентации антигенов [24], изменению как репертуара T_{CD8+} -лимфоцитов [26], так и абсолютному снижению их количества у мы-

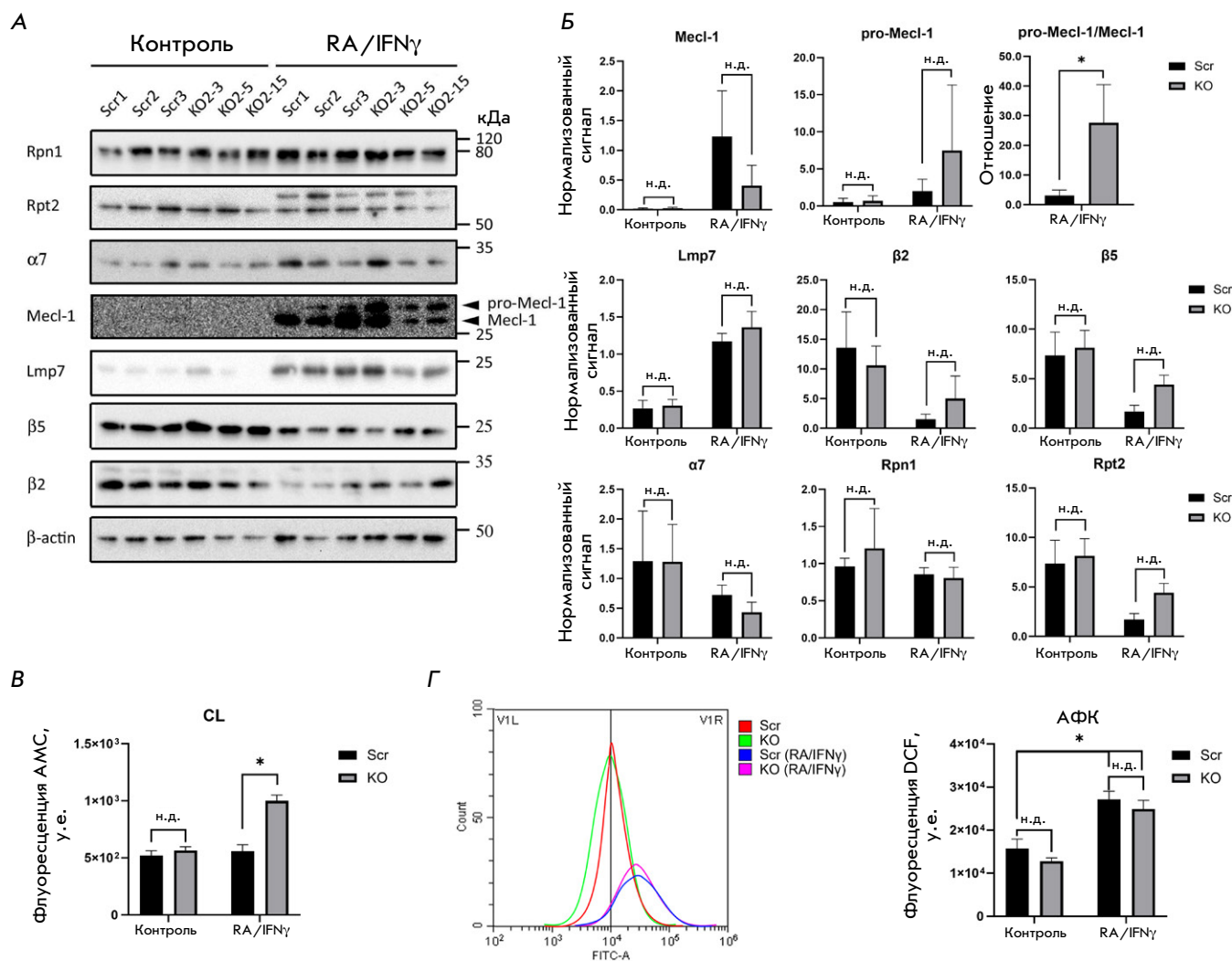


Рис. 5. Анализ функциональной активности протеасом и продукции активных форм кислорода в ЭСК мыши с нокаутом *Psmb9*. Клетки контрольных линий (Scr1–3) и клетки *Psmb9*КО ЭСК (KO2-3, 2-5 и 2-15) культивировали в среде SL. Дифференцировку индуцировали ретиноевой кислотой (RA) в течение 2 дней с последующей обработкой IFN γ в течение 1 дня. **А** — оценка уровней белков субъединиц конститутивных протеасом и иммунопротеасом в ЭСК с нокаутом гена *Psmb9*. Уровни белков в клеточных лизатах оценивали методом иммуноблоттинга. β -Actin использован как контроль нагрузки белка. **Б** — нормализация интенсивности полос вестерн-блоттинга, показанных на **А**, к β -актину. **В** — измерение каспаза-подобной активности (CL) 20S протеасомы. **Г** — оценка уровня активных форм кислорода (АФК). Слева приведены репрезентативные гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в FITC-канале. Сдвиг гистограммы вправо указывает на увеличение продукции АФК в клетках. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$). н.д. — статистически недостоверно; * $p < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ)

шей [25]. Помимо роли в работе иммунной системы, иммунопротеасомы, включая Lmp2, участвуют в поддержании протеостаза и регуляции дифференцировки клеток. В условиях клеточного стресса, вызванного, например, митохондриальной дисфункцией в клетках человека, возрастает уровень Lmp2, что способствует повышению активности протеасом и снижению накопления окисленных белков [27]. Также потеря Lmp2 связана с развитием нейроде-

генеративных изменений при болезни Альцгеймера. Так, у мышей с нокаутом гена *Psmb9* наблюдается потеря миелина, увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера, накопление амилоида- β и повышение уровня АФК. Эти факторы приводят к хроническому окислительному стрессу, усилению нейровоспаления и когнитивным нарушениям, что подчеркивает значение Lmp2 в поддержании нормального состояния клеток мозга [28]. Роль

Lmp2 в развитии тканей показана также в исследованиях, связанных с нейрогенезом. В условиях гиперактивности комплекса mTORC1 отсутствие Lmp2 замедляет пролиферацию нейрональных предшественников, нормализуя их дифференцировку [29]. Кроме того, субъединица Lmp2 играет важную роль в дифференцировке мышечных клеток. Ингибирование иммунопротеасом в миоблестах приводит к повышению уровня окисленных белков и нарушению дифференцировки миобластов [22].

Учитывая данные о роли Lmp2 в регуляции клеточного протеостаза в различных типах тканей, особый интерес представляет изучение функций иммунопротеасом в поддержании плюрипотентности ЭСК и их дифференцировке. Уникальная способность ЭСК к самообновлению и дифференцировке зависит от строго регулируемых механизмов, поддерживающих геномную стабильность и протеостаз. Под плюрипотентностью понимают способность ЭСК самообновляться и дифференцироваться в любые клеточные типы организма, за исключением некоторых внезародышевых тканей, таких как трофобласт и первичная энтодерма. Перед имплантацией эмбриона в эпибласте происходят значительные морфологические и молекулярные изменения, которые готовят клетки к развитию. Образованию постимплантационного эпибласта предшествует этап поляризации клеток эпибласта с образованием розеток и последующей люминизации эмбриона с образованием проамниотической полости [31, 32]. В этот период клетки эпибласта переходят от «наивного» состояния плюрипотентности к «праймированному», становясь готовыми к дифференцировке в экто-, мезо- и энтодерму. Этот переход включает несколько промежуточных состояний с уникальными характеристиками [33]. На сегодняшний день идентифицировано как минимум четыре различных типа плюрипотентных клеток, имеющих стабильные аналоги в условиях культивирования *in vitro* [33].

В ходе предыдущих исследований мы подтвердили, что экспрессия иммунопротеасом индуцируется на стадии эпибластоподобных клеток [15], достигая пика на третий день мезодермальной дифференцировки (неопубликованные данные) и постепенно снижаясь вплоть до полного исчезновения. Эпибластоподобные клетки и клетки на третий день мезодермальной дифференцировки в культуре соответствуют клеткам постимплантационного эпибласта и первичной полоски в ходе развития эмбриона мыши соответственно. Согласно открытым данным РНК-секвенирования отдельных клеток (ssRNA-seq), пик экспрессии иммунопротеасом также приходится на стадию закладывания первичной полоски [34, 35]. При формировании первичной по-

лоски клетки эпибласта подвергаются эпителиально-мезенхимному переходу, включая изменения формы клеток в результате ремоделирования актинового цитоскелета, разрушения межклеточных контактов, деградации базальной мембраны и активации взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом [36]. Кроме того, в этот период скорость деления клеток эпибласта сильно увеличивается. При переходе к этапу гаструляции клетки эпибласта мыши переключаются с типичного для млекопитающих клеточного цикла продолжительностью 12–14 ч на более короткий – 6–8 ч [37]. При значительных изменениях, характерных для раннего эмбрионального развития, критически важно обеспечить быструю адаптацию клеток к внутренним и внешним сигналам. Иммунопротеасомы отличаются быстрой кинетикой сборки и коротким временем полужизни [38]. Полагается, что в условиях стресса и провоспалительного сигналинга иммунопротеасомы могут более эффективно осуществлять деградацию поврежденных и полиубиквитинированных белков (см. обзор [11]). Можно предположить, что роль иммунопротеасом в раннем эмбриональном развитии заключается в предотвращении накопления ненужных и/или поврежденных белков. Однако важно отметить, что мыши с нокаутом всех трех каталитических субъединиц иммунопротеасом не имеют критических аномалий неонатального развития. Это может указывать на наличие компенсаторных механизмов, способных замещать их функции. Исследования с использованием клеток, лишенных как отдельных каталитических субъединиц иммунопротеасом, так и всех трех, позволяют уточнить роль иммунопротеасомы в поддержании протеостаза и участии в дифференцировке ЭСК.

ВЫВОДЫ

Таким образом, нами создана и охарактеризована линия ЭСК мыши с нокаутом гена *Psmb9*, кодирующего каталитическую субъединицу иммунопротеасомы – Lmp2 ($\beta 1i$). Установлено, что отсутствие Lmp2 не влияет на морфологию и пролиферативную активность ЭСК, а также на их плюрипотентный статус. Данная клеточная линия представляет перспективный инструмент для изучения роли гена *Psmb9* и иммунопротеасом в последующих этапах дифференцировки ЭСК *in vitro*. ●

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 22-14-00390).

Эксперименты по секвенированию выполнены за счет средств, предоставленных в рамках соглашения 075-15-2021-1075 с Минобрнауки от 28-09-2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jang H.H. // *J. Cancer Prev.* 2018. V. 23. № 4. P. 153–161. doi: 10.15430/JCP.2018.23.4.153.
2. Abi Habib J., Lesenfants J., Vigneron N., van den Eynde B.J. // *Cells.* 2022. V. 11. № 3. P. 421. doi: 10.3390/cells11030421.
3. Zhang H., Zhou C., Mohammad Z., Zhao J. // *bioRxiv.* 2024. doi: 10.1101/2024.08.08.607236.
4. Budenholzer L., Cheng C.L., Li Y., Hochstrasser M. // *J. Mol. Biol.* 2017. V. 429. № 22. P. 3500–3524. doi: 10.1016/j.jmb.2017.05.027.
5. Aki M., Shimbara N., Takashina M., Akiyama K., Kagawa S., Tamura T., Tanahashi N., Yoshimura T., Tanaka K., Ichihara A. // *J. Biochem.* 1994. V. 115. № 2. P. 257–269. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124327.
6. Boes B., Hengel H., Ruppert T., Multhaup G., Koszinowski U.H., Kloetzel P.M. // *J. Exp. Med.* 1994. V. 179. № 3. P. 901–909. doi: 10.1084/jem.179.3.901.
7. Strehl B., Seifert U., Kruger E., Heink S., Kuckelkorn U., Kloetzel P.M. // *Immunol. Rev.* 2005. V. 207. № 1. P. 19–30. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00308.x.
8. McCarthy M.K., Weinberg J.B. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. № 1. P. 21. doi: 10.3389/fmicb.2015.00021.
9. Chen B., Zhu H., Yang B., Cao J. // *Acta. Pharm. Sin. B.* 2023. V. 13. № 5. P. 1976–1989. doi: 10.1016/j.apsb.2022.11.005.
10. Seifert U., Bialy L.P., Ebstein F., Bech-Otschir D., Voigt A., Schroter F., Prozorovski T., Lange N., Steffen J., Rieger M., et al. // *Cell.* 2010. V. 142. № 4. P. 613–624. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.036.
11. Basler M., Groettrup M. // *Cells.* 2021. V. 10. № 11. P. 1–18. doi: 10.3390/cells10113216.
12. Atkinson S.P., Collin J., Irina N., Anyfantis G., Kyung B.K., Lako M., Armstrong L. // *Stem Cells.* 2012. V. 30. № 7. P. 1373–1384. doi: 10.1002/stem.1113.
13. Hernebring M., Fredriksson A., Liljevald M., Cvijovic M., Norrman K., Wiseman J., Semb H., Nystrom T. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. № 1. P. 1381. doi: 10.1038/srep01381.
14. Hernebring M., Brolen G., Aguilaniu H., Semb H., Nystrom T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 20. P. 7700–7705. doi: 10.1073/pnas.0510944103.
15. Kriger D., Podenkova U.I., Bakhmet E.I., Potapenko E., Ivanova E., Tomilin A.N., Tsimokha A.S. // *Cells.* 2024. V. 13. № 16. P. 1–13. doi: 10.3390/cells13161362.
16. Podenkova U.I., Kriger D.V., Kuznetsov A.V., Kuzmin A.A., Koltunova L.A., Yevreiskaya A., Aksenov N.D., Fokin N.P., Selenina A.V., Tomilin A.N. // *Cell Tissue Biol.* 2025. V. 19. № 2. P. 130–140. doi: 10.1134/S1990519X24600741.
17. Bakhmet E.I., Ponomartsev S.V., Dyban P.A., Nazarov I.B., Kuzmin A.A., Aksenov N.D., Potapenko E., Gordeev M.N., Tomilin A.N. // *Cell Tissue Biol.* 2020. V. 14. № 6. P. 413–418. doi: 10.1134/S1990519X20060036.
18. Gordeev M.N., Zinovyeva A.S., Petrenko E.E., Lomert E.V., Aksenov N.D., Tomilin A.N., Bakhmet E.I. // *Acta Naturae.* 2024. V. 16. № 4. P. 12–22. doi: 10.32607/actanaturae.27510.
19. Kriger D., Novitskaya K., Vasileva G., Lomert E., Aksenov N.D., Barlev N.A., Tentler D. // *Biol. Direct.* 2022. V. 17. № 1. P. 1–13. doi: 10.1186/s13062-022-00354-6.
20. Kulichkova V.A., Artamonova T.O., Zaykova J.J., Ermolaeva J.B., Khodorkovskii M.A., Barlev N.A., Tomilin A.N., Tsimokha A.S. // *Mol. Biotechnol.* 2015. V. 57. № 1. P. 36–44. doi: 10.1007/s12033-014-9799-0.
21. Chen X., Mao Y., Guo Y., Xiao D., Lin Z., Huang Y., Liu Y.C., Zhang X., Wang Y. // *J. Transl. Med.* 2023. V. 21. № 1. P. 1–16. doi: 10.1186/s12967-023-04071-0.
22. Cui Z., Hwang S.M., Gomes A.V. // *Mol. Cell. Biol.* 2014. V. 34. № 1. P. 96–109. doi: 10.1128/MCB.00622-13.
23. Hensley S.E., Zanker D., Dolan B.P., David A., Hickman H.D., Embry A.C., Skon C.N., Grebe K.M., Griffin T.A., Chen W., et al. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. № 8. P. 4115–4122. doi: 10.4049/jimmunol.0903003.
24. Sibille C., Gould K.G., Willard-Gallo K., Thomson S., Rivett A.J., Powis S., Butcher G.W., De Baetselier P. // *Curr. Biol.* 1995. V. 5. № 8. P. 923–930. doi: 10.1016/s0960-9822(95)00182-5.
25. van Kaer L., Ashton-Rickardt P.G., Eichelberger M., Gaczynska M., Nagashima K., Rock K.L., Goldberg A.L., Doherty P.C., Tonegawa S. // *Immunity.* 1994. V. 1. № 7. P. 533–541. doi: 10.1016/1074-7613(94)90043-4.
26. Chen W., Norbury C.C., Cho Y., Yewdell J.W., Bennink J.R. // *J. Exp. Med.* 2001. V. 193. № 11. P. 1319–1326. doi: 10.1084/jem.193.11.1319.
27. Kim M., Serwa R.A., Samluk L., Suppanz I., Kodron A., Stepkowski T.M., Elancheliyan P., Tsegaye B., Oeljeklaus S., Wasilewski M., et al. // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. № 1. P. 1–23. doi: 10.1038/s41467-023-39642-8.
28. Guo Y., Wang S., Li L., Zhang H., Chen X., Huang Z., Liu Y. // *Mol. Neurobiol.* 2024. V. 61. № 1. P. 28–41. doi: 10.1007/s12035-023-03564-9.
29. Choi J.H., Jo H.S., Lim S., Kim H.T., Lee K.W., Moon K.H., Ha T., Kwak S.S., Kim Y., Lee E.J., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 1–16. doi: 10.1038/s41467-018-04774-9.
30. Brown M.G., Driscoll J., Monaco J.J. // *Nature.* 1991. V. 353. № 6342. P. 355–357. doi: 10.1038/353355a0.
31. Bedzhov I., Zernicka-Goetz M. // *Cell.* 2014. V. 156. № 5. P. 1032–1044. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.023.
32. Shahbazi M.N., Scialdone A., Skorupska N., Weberling A., Recher G., Zhu M., Jedrusik A., Devito L.G., Noli L., Macaulay I.C., et al. // *Nature.* 2017. V. 552. № 7684. P. 239–243. doi: 10.1038/nature24675.
33. Gordeev M.N., Bakhmet E.I., Tomilin A.N. // *Rus. J. Devel. Biol.* 2021. V. 52. № 6. P. 429–440. doi: 10.31857/s0475145021060057.
34. Kim I.S., Wu J., Rahme G.J., Battaglia S., Dixit A., Gaskell E., Chen H., Pinello L., Bernstein B.E. // *Cell Rep.* 2020. V. 33. № 1. P. 1–15. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108222.
35. Mohammed H., Hernando-Herraez I., Savino A., Scialdone A., Macaulay I., Mulas C., Chandra T., Voet T., Dean W., Nichols J., et al. // *Cell. Rep.* 2017. V. 20. № 5. P. 1215–1228. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.009.
36. Kojima Y., Tam O.H., Tam P.P. // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2014. V. 34. № 1. P. 65–75. doi: 10.1016/j.semdb.2014.06.010.
37. Snow M.H.L. // *Development.* 1977. V. 42. № 1. P. 293–303. doi: 10.1242/dev.42.1.293.
38. Heink S., Ludwig D., Kloetzel P.M., Kruger E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 26. P. 9241–9246. doi: 10.1073/pnas.0501711102.

УДК 577.32

Адресные нанолипосомы для доставки бор-фенилаланина к HER2-положительным клеткам

Г. М. Прошкина^{1*}, Е. И. Шрамова^{1,2}, А. Б. Миркасымов¹, И. Н. Завестовская^{2,3,4}, С. М. Деев^{1,2,3,4,5}¹Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, 119991 Россия³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123098 Россия⁴Московский инженерно-физический институт, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, 115409 Россия⁵Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, 430005 Россия

* E-mail: gmb@ibch.ru

Поступила в редакцию 17.06.2025

Принята к печати 17.07.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27722

РЕФЕРАТ Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) – это интенсивно развивающаяся область лучевой терапии онкологических заболеваний, основанная на накоплении в опухолевых клетках радиочувствительного изотопа ^{10}B с последующим облучением опухоли тепловыми нейтронами. Широкое использование БНЗТ в клинической практике сдерживается низким накоплением препаратов, содержащих ^{10}B , в опухоли или их высокой токсичностью для организма. Данная работа посвящена получению опухоль-специфичных препаратов липосом, загруженных 4-L-борфенилаланином (4-L- ^{10}BPA), для использования в БНЗТ. По данным спектрофотометрии и масс-спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой, включение 4-L- ^{10}BPA в липосомы составило ~ 120 000 молекул на липосому. Специфичность липосом к рецептору второго типа эпидермального фактора роста человека (HER2) определялась наличием на внешней поверхности липосом белка на основе анкириновых повторов DARPIn_9-29, высоко-специфичного к HER2. Установлено, что DARPIn-модифицированные липосомы связываются с HER2-сверхэкспрессирующими клетками и эффективно интернализуются в цитоплазму клеток. Способность липосом, функционализированных DARPIn, специфически доставлять большие количества 4-L- ^{10}BPA в раковые клетки, возможно, откроет новые перспективы для БНЗТ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бор-нейтронозахватная терапия, HER2-специфическая терапия, липосомы, 4-L- ^{10}BPA .
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БНЗТ – бор-нейтронозахватная терапия; HER2 (human epidermal growth factor receptor II) – рецептор второго типа эпидермального фактора роста человека; 4-L- ^{10}BPA – 4-L-борфенилаланин с изотопом ^{10}B .

ВВЕДЕНИЕ

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) – метод терапии злокачественных опухолей, при котором радиочувствительный изотоп ^{10}B , предварительно накопленный в опухоли, подвергается нейтронному облучению. При поглощении нейтронов ^{10}B происходит ядерная реакция с большим выделением энергии, что вызывает гибель клетки: $^{10}\text{B} + ^1_0\text{n} \rightarrow ^4_2\text{He}(\alpha) + ^7_3\text{Li} + 2.4 \text{ МэВ}$ [1]. Теоретически, в результате данной реакции должны погибать только клетки, содержащие ^{10}B , поскольку α -частицы и ядра лития характеризуются быстрым торможением и малым пробегом в тканях организма (5–9 мкм), что приблизительно равно диаметру клетки. Таким образом, цитотоксический эффект

должен проявляться в непосредственной близости к месту реакции [2]. Сейчас БНЗТ находится в стадии интенсивного развития – ведутся разработки как по созданию компактных ускорителей пучка нейтронов, так и по созданию ^{10}B -содержащих препаратов, обладающих биосовместимостью и стабильностью *in vivo* [3].

В настоящее время из препаратов, одобренных для клинического применения в БНЗТ, доступно только одно соединение – производное фенилаланина с атомом ^{10}B , 4-бор-L-фенилаланин (4-BPA). Так, в Японии 4-L- ^{10}BPA зарегистрирован с 2020 года в качестве средства для лечения локально рецидивирующего рака головы и шеи под торговым названием Borofalan (Steboronine®) [4].

Проблемы, приводящие к ограниченному использованию 4-L-¹⁰BPA, связаны с низкой степенью накопления вещества в раковых клетках и его низкой растворимостью в воде.

Доставка 4-L-¹⁰BPA в опухолевые клетки осуществляется по механизму активного транспорта через переносчики L-аминокислот, главным образом через LAT-1 [5, 6], и не зависит от pH и концентрации ионов Na⁺. LAT-1, представляющий собой гетеродимерный трансмембранный белок, осуществляет транспорт в клетку нейтральных аминокислот с разветвленными боковыми цепями (валин, лейцин, изолейцин), а также ароматических аминокислот (триптофан, тирозин) [7–9]. Сверхэкспрессия данного транспортера характерна для многих видов опухолей [10] и может рассматриваться как мишень для адресной доставки 4-L-¹⁰BPA. Однако проблема накопления 4-L-¹⁰BPA в раковой клетке связана с тем, что L-аминотранспортеры работают по принципу антипорта: при уменьшении внеклеточной концентрации L-¹⁰BPA происходит эффлюкс внутриклеточного L-¹⁰BPA с заменой на другой внеклеточный субстрат, например, тирозин [11]. Этот механизм препятствует достижению внутриопухолевых концентраций бора (20–50 мкг ¹⁰B/г опухоли, ~ 10⁹ атомов ¹⁰B /клетка), необходимых для эффективной БНЗТ [12].

Также клиническое применение 4-L-¹⁰BPA сильно осложняется низкой растворимостью (0.6 г/л) данного вещества в растворах с нейтральным значением pH. Для увеличения растворимости 4-L-¹⁰BPA Mori Y. с соотр. предложили использовать комплекс 4-L-¹⁰BPA с моносахаридами [13]. На сегодняшний день стандартным методом клинического применения 4-L-¹⁰BPA для БНЗТ является внутривенное введение комплекса 4-L-¹⁰BPA с D-фруктозой или сорбитолом. Однако стоит отметить, что этот способ не является идеальным: так, пациенту с массой тела 60 кг системно вводят 1 л раствора, содержащего 30 г 4-L-¹⁰BPA и 31.5 г D-сорбитола. Столь высокая нагрузка приводит к побочным эффектам в виде гипогликемии, развития печеночной и почечной недостаточности у лиц с наследственной непереносимостью фруктозы (как следствие метаболизма сорбитола), а также к возникновению гематурии, развивающейся на фоне кристаллизации 4-L-¹⁰BPA в моче [4, 14, 15].

Таким образом, разработка новых формуляций борсодержащих веществ, позволяющих повысить эффективность накопления лекарств в опухоли и уменьшить побочные эффекты, является приоритетом фундаментальных медицинских исследований в рамках развития БНЗТ.

Липосомы, в силу отсутствия собственной токсичности, способности инкапсулировать большое ко-

личество лекарственного препарата как в водную, так и в гидрофобную фазу, а также в силу возможности модификации внешней поверхности лигандами, специфичными к опухоли-ассоциированным антигенам, для активного таргетинга, рассматриваются как эффективные средства доставки лекарств [16].

Ранее нами была разработана система получения нанолипосом (~ 100 нм), внешняя поверхность которых модифицирована адресным модулем, специфичным к рецептору эпидермального фактора роста человека второго типа (HER2), а внутренняя водная среда содержит большое количество (до 10 000 молекул на липосому) белковых токсинов [17–19] или пептидо-нуклеиновых кислот [20]. В данной работе этот подход использован для получения HER2-специфичных липосом, загруженных 4-L-¹⁰BPA.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение DARPIn-модифицированных липосом, загруженных 4-L-¹⁰BPA

Навески 4-L-¹⁰BPA (Katchem, Чехия) 10 и 15 мг (каждая в трех повторях) растворяли в 300 мкл воды Milli-Q и смешивали с раствором D-фруктозы (Sigma, США) в молярном соотношении 1:1. Далее постепенно (в течение 10–15 мин) добавляли по каплям 1 М NaOH до полного растворения 4-L-¹⁰BPA, pH раствора при этом был равен 10–10.5. Затем с помощью концентрированной 1 М HCl постепенно доводили pH до 8.0. К полученному раствору добавляли смесь фосфолипидов, приготовленную из гранул L-α-фосфатидилхолина (40%), фосфатидилэтаноламина (16%) и фосфатидилинозитола (11%) (Avanti Polar Lipids), до конечной концентрации 4 г/л, подвергали 5-кратной процедуре быстрого замораживания-оттаивания и продавливали с помощью экструдера через фильтр с диаметром пор 100 нм. Чтобы избавиться от невключенного в липосомы комплекса BPA–D-фруктоза, смесь липосом пропускали по колонке NAP-5, уравновешенной буфером 100 мМ NaPi pH 8.0. Далее для введения SH-групп липосомы модифицировали 2-иминотиолоном (Merck, ФРГ), после чего конъюгировали SH-содержащие липосомы с DARPIn_9-29, модифицированным гетерофункциональным билинкером sulfo-EMSC (Thermo Fisher Scientific, США), как описано в [17].

Гидродинамический размер и ζ-потенциал адресных и безадресных борсодержащих липосом определяли с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Перед измерением образцы, находящиеся в растворе 150 мМ NaCl, 20 мМ NaPi pH 7.5, разбавляли водой в 25 раз. Значения ζ-потенциала рассчитывали с использованием приближения Смолуховского.

Для использования в методах конфокальной микроскопии и проточной цитометрии DARP-Lip(BPA) конъюгировали с гидроксисукцинимидным эфиром AF-488 (Lumiprobe, Россия) по протоколу производителя.

Количественное определение содержания бора в липосомах

Загрузку 4-L-¹⁰BPA в адресные липосомы определяли с помощью масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой ICP-MS (NexION 2000, PerkinElmer). Для этого 50 мкл образца липосом растворяли в 300 мкл царской водки, выдерживали в течение 1 ч при 70°C, добавляли 1200 мкл воды Milli-Q и анализировали с помощью ICP-MS. Концентрацию липосом определяли спектрофотометрически как описано в [17], записывая спектр поглощения в кварцевой кювете на спектрофотометре Ultrospec 7000 (GE) в диапазоне 210–800 нм.

Клеточные культуры

В работе использовали клеточные линии карциномы яичников (SKOV-3) и шейки матки (Hela) человека. Клетки культивировали при 37°C во влажной атмосфере в 5% среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 2 мМ L-глутамина («ПанЭко»), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и антибиотик (10 ЕД/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина, «ПанЭко»).

Проточная цитометрия

Для оценки способности связывания DARP-Lip(BPA) с рецептором HER2 200 000 клеток SKOV-3 и Hela инкубировали в полной ростовой среде в течение 10 мин при 37°C с различными концентрациями (350 или 150 нМ) DARP-Lip(BPA)-AF488 (концентрация указана по красителю; концентрация DARPin-модифицированных липосом составляла 1 и 0.5 нМ соответственно). После окончания инкубации клетки трижды промывали PBS и анализировали на приборе NovoCyte 3000.

Для возбуждения флуоресценции AF488 использовали лазер с длиной волны 488 нм, флуоресценцию детектировали в канале 530 ± 30 нм (канал FITC).

Конфокальная микроскопия

Изучение связывания адресного модуля в составе DARP-Lip(BPA) с рецептором HER2 на поверхности клеток SKOV-3, для которых характерна сверхэкспрессия данного рецептора, проводили с использованием конфокальной микроскопии. Около 3500 клеток линии SKOV-3 высевали в лунки 96-луночного планшета со стеклянным дном (Eppendorf) и культивировали в течение ночи. На следую-

щий день к клеткам добавляли 250 нМ конъюгата DARP-Lip(BPA)-AF488 (концентрация указана по красителю), инкубировали в течение 20 или 120 мин. Ядра окрашивали 10 нМ Hoechst 33342 (10 мин при 37°C). Клетки трижды промывали PBS, добавляли среду FluoroBright (Gibco) и анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 980 (Carl Zeiss, ФРГ), используя масляный иммерсионный объектив 63× Plan-Apochromat. Флуоресценцию Hoechst 33342 возбуждали лазером с длиной волны 405 нм, детектировали при 410–520 нм, AF488 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и детектировали при 497–562 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика HER2-специфичных липосом, загруженных 4-L-¹⁰BPA

Низкая растворимость 4-L-¹⁰BPA в воде, низкое накопление в опухолевой ткани и быстрое выведение из кровотока являются основными проблемами при использовании 4-L-¹⁰BPA в БНЗТ. Для решения этих задач разрабатываются различные носители для 4-L-¹⁰BPA, которые позволили бы повысить совместимость данного вещества с водными средами, увеличить накопление в целевой ткани и пролонгировать циркуляцию в кровотоке [21, 22]. Липосомы диаметром 100–200 нм являются наиболее часто используемыми средствами доставки лекарств, поскольку, проникнув через фенестрированный эндотелий стенок кровеносных сосудов опухоли, способны накапливаться в подлежащей опухолевой ткани [23].

В качестве мишени для нацеливания липосом на раковые клетки был выбран опухоль-ассоциированный антиген HER2, повышенная экспрессия которого характерна для многих опухолей эпителиального происхождения человека [24]. В современной медицинской практике онкомаркер HER2 является терапевтической мишенью для моноклональных антител (Пертузумаб, Трастузумаб) и ингибиторов киназ (Лапатаиниб) при HER2-положительных опухолях молочной железы [24].

В качестве векторной молекулы, направляющей нанолипосомы к заданному опухоль-ассоциированному антигену, мы использовали скаффолдный белок на основе анкириновых повторов DARP_{in}_9-29 (Designed Ankyrin Repeat Protein). DARP_{in}_9-29 представляет собой миметик антитела, способный к высокоспецифичному взаимодействию с субдоменом I рецептора HER2 ($K_D = 3.8$ нМ) [25].

Загрузку 4-L-¹⁰BPA в липосомы осуществляли в составе комплекса с D-фруктозой в молярном соотношении 1:1 (рис. 1А). Для проверки воспроизводимости методики загрузки 4-L-¹⁰BPA в липосомы

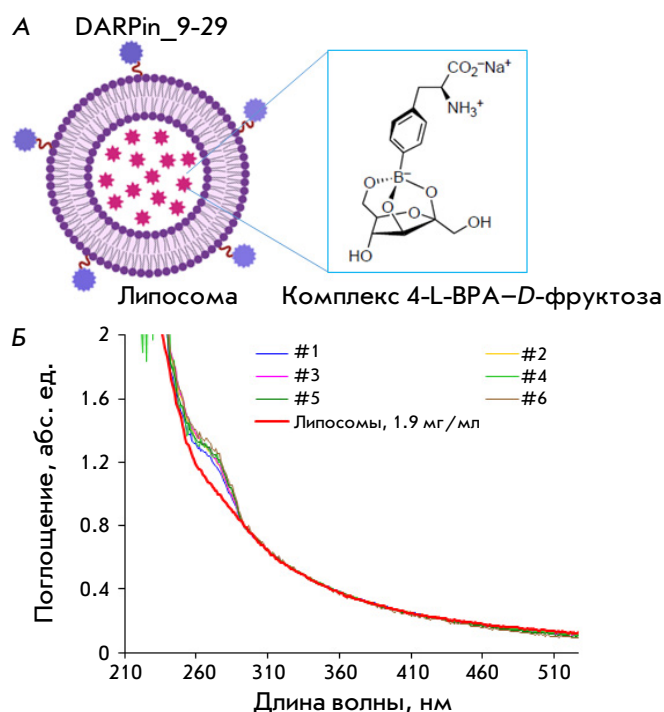


Рис. 1. DARPin-модифицированные липосомы, содержащие комплекс 4-L-¹⁰BPA–D-фруктоза. А – схематическое изображение DARP-Lip(BPA). Внутренняя среда липосом загружена комплексом 4-L-¹⁰BPA–D-фруктоза. Внешняя поверхность модифицирована HER2-специфичным скаффолдным белком DARPin_9-29. Б – спектры поглощения DARPin-модифицированных образцов #1–6, содержащих 4-L-¹⁰BPA, и спектр поглощения пустых липосом с концентрацией 1.9 мг/мл (красная кривая)

получали шесть образцов липосом с 4-L-¹⁰BPA, начиная со стадии навески 4-L-¹⁰BPA.

Спектры поглощения образцов #1–6 DARPin-модифицированных липосом, загруженных 4-L-¹⁰BPA, имеют характерный пик при 270 нм, обусловленный поглощением включенного ¹⁰BPA. В спектре поглощения пустых липосом, полученных из суспензии фосфолипидов с концентрацией 1.9 мг/мл (красная кривая на рис. 1Б), пик при 270 нм отсутствует. В остальном спектры пустых и загруженных липосом совпадают. Ранее мы установили, что молярная концентрация суспензии немодифицированных липосом с концентрацией 1 мг/мл равна 1.1 нМ [17]. Для DARPin_9-29 характерно слабое поглощение на 280 нм, так как молекула белка бедна ароматическими кислотными остатками (пять остатков фенилаланина и нет остатков триптофана). Поэтому наличие DARPin на поверхности липосом не вносит изменений в липосомный спектр поглощения. Таким образом, молярная концентрация липосом в образцах #1–6 равна 2.09 нМ.

Количественное содержание бора в липосомах определяли с помощью ICP-MS. Концентрация бора

в образцах липосом не зависела от исходной навески (что, возможно, указывает на максимально возможную заполненность водной фазы комплексом BPA–D-фруктоза в липосоме) и составила в среднем 258 ± 44 мкМ, что соответствует $(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$ молекул 4-L-¹⁰BPA на липосому.

Размер и ζ-потенциал 4L-¹⁰BPA-содержащих липосом, модифицированных и немодифицированных DARPin_9-29, измеряли методами динамического и электрофоретического светорассеяния. Конъюгация липосом с DARPin_9-29 приводит к увеличению их гидродинамического диаметра от 125.9 ± 37.2 до 151.80 ± 52.79 нм (рис. 2А) и изменению ζ-потенциала с -59.1 ± 10.1 на -50.0 ± 6.96 мВ (рис. 2Б). Отрицательный ζ-потенциал липосом свидетельствует о стабильности образца и отсутствии склонности к агрегации.

Анализ специфичности взаимодействия DARP-Lip(BPA) с рецептором HER2 *in vitro*

Способность адресного модуля DARPin_9-29, находящегося на поверхности 4L-¹⁰BPA-содержащих липосом, взаимодействовать с рецептором HER2 на поверхности клеток изучали двумя независимыми методами – проточной цитометрией и конфокальной микроскопией (рис. 3). Поскольку DARP-Lip(BPA) не обладают собственной флуоресценцией, липосомы перед использованием в вышеупомянутых оптических методах анализа конъюгировали с флуоресцентным красителем AF-488-NH. В эксперименте использовали две линии опухолевых клеток человека: линию карциномы яичников SKOV-3, для которой характерен повышенный уровень рецептора HER2 на поверхности клеток (10^6 рецепторов на клетку), и линию карциномы шейки матки Hela, которая характеризуется нормальным (для всех тканей эпителиального происхождения) уровнем HER2 (10^4 рецепторов на клетку). Клетки SKOV-3 и Hela инкубировали с DARP-Lip(BPA)/AF488 в двух концентрациях – 150 и 350 нМ, как описано в «Экспериментальной части». Данные проточной цитометрии свидетельствуют о том, что взаимодействие DARP-Lip(BPA) с клетками является HER2-специфичным. Так, в случае HER2-сверхэкспрессирующих клеток SKOV-3 увеличение концентрации DARP-Lip(BPA)/AF488 в клеточной суспензии приводит к увеличению сдвига интенсивности флуоресценции относительно контроля (зеленая кривая): в ~13.6 раза для концентрации DARP-Lip(BPA)/AF488, равной 150 нМ (синяя кривая), и в ~36.9 раза для концентрации DARP-Lip(BPA)/AF488, равной 350 нМ (красная кривая) (рис. 3А, левая верхняя диаграмма). При этом интенсивность флуоресценции клеток Hela практически не зави-

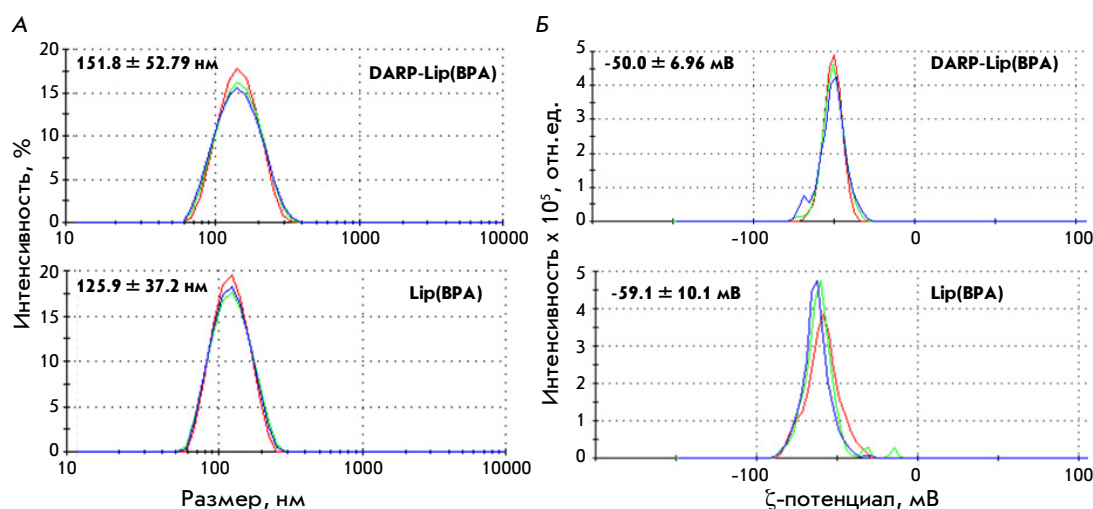


Рис. 2. Характеристика гидродинамического диаметра и ζ -потенциала ^{10}BPA -содержащих липосом, модифицированных и немодифицированных DARPin_9-29. А – гидродинамический размер DARP-Lip(BPA) и Lip(BPA). Б – ζ -потенциал DARP-Lip(BPA) и Lip(BPA)

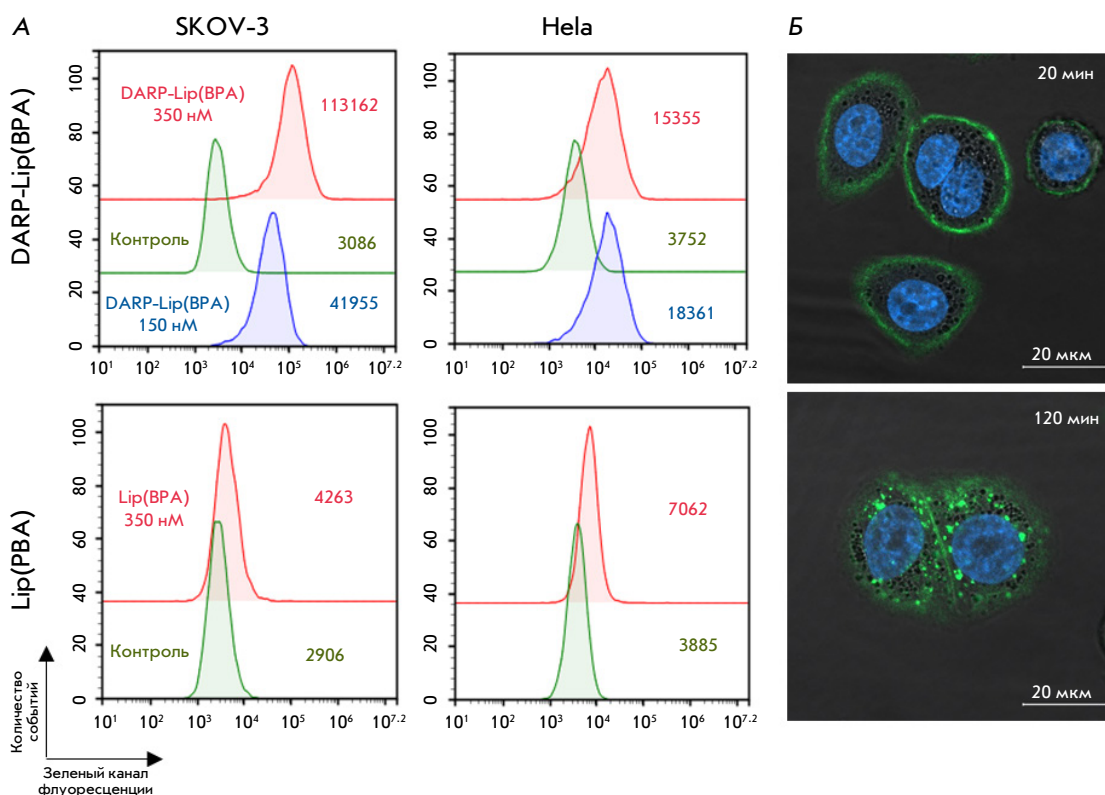


Рис. 3. Взаимодействие DARP-Lip(BPA) с рецептором HER2 *in vitro*. А – оценка специфичности взаимодействия DARP-Lip(BPA) (верхние диаграммы) и Lip(BPA) (нижние диаграммы) с HER2-положительными клетками SKOV-3 и клетками Hela с нормальным уровнем экспрессии HER2 методом проточной цитометрии. На диаграммах указана средняя интенсивность флуоресценции в зеленом канале для клеток, не обработанных DARP-Lip(BPA) (зеленая кривая), и клеток, обработанных DARP-Lip(BPA) в концентрации 150 нМ (синяя кривая) и 350 нМ (красная кривая). Б – изучение взаимодействия DARP-Lip(BPA) с клетками SKOV-3 методом конфокальной микроскопии. На фото указано время инкубации клеток с DARP-Lip(BPA) до съемки. Ядра окрашены Hoechst 33342

сит от концентрации DARP-Lip(BPA)/AF488 в среде, отличаясь от контроля (зеленая линия) в 4 и 5 раз для 150 нМ (синяя кривая) и 350 нМ (красная кривая) DARP-Lip(BPA)/AF488 соответственно

(рис. 3А, правая верхняя диаграмма). Это объясняется отсутствием свободных HER2-рецепторов на поверхности клеток Hela, доступных для взаимодействия с DARP-Lip(BPA). Безадресные липосо-

мы, загруженные 4-L-¹⁰BPA, не приводят к сдвигу интенсивности флуоресценции как в случае клеток SKOV-3, так и в случае Hela, что говорит о DARPIn-опосредованном взаимодействии липосом с клетками (рис. 3А, нижний ряд диаграмм).

Специфичность связывания DARP-Lip(BPA) с рецептором HER2 на поверхности раковых клеток подтвердили также с помощью конфокальной микроскопии. Так, после 20-минутной инкубации клеток SKOV-3 с DARP-Lip(BPA)/AF-488 наблюдалось характерное окрашивание клеточной мембраны (рис. 3Б, верхнее фото). При дальнейшей инкубации клеток с DARP-Lip(BPA) происходит интернализация липосом в течение 120 мин, о чем свидетельствуют зеленые пиксели в цитоплазме (рис. 3Б, нижнее фото).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для эффективной БНЗТ необходимо, чтобы в раковой клетке накопилось ~ 10⁹ атомов ¹⁰B [12].

Применимость 4-L-¹⁰BPA в БНЗТ ограничена его низкой растворимостью в воде и низким накоплением в клетке. В данном исследовании предложен способ получения наноразмерных HER2-специфичных липосом, внутренняя среда которых содержит большие количества (~120 000 молекул/липосома) 4-L-¹⁰BPA. Исследования *in vitro* показали, что полученные липосомы эффективно взаимодействуют с HER2-рецептором на поверхности раковых клеток и эффективно интернализуются. Полагаем, что способность липосом, функционализированных DARPIn, специфически доставлять большие количества 4-L-¹⁰BPA в раковые клетки позволит преодолеть проблему низкого накопления 4-L-¹⁰BPA и, возможно, откроет новые перспективы для БНЗТ. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда (№ 24-62-00018
«Перспективные комбинированные технологии
нейтрон-захватной терапии»).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nakamura H. // Methods Enzymol. 2009. V. 465. P. 179–208. doi: 10.1016/S0076-6879(09)65010-2
- Barth R.F., Vicente M.G., Harling O.K., Kiger W.S., 3rd, Riley K.J., Binns P.J., Wagner F.M., Suzuki M., Aihara T., Kato I., et al. // Radiat. Oncol. 2012. V. 7. P. 146. doi: 10.1186/1748-717X-7-146
- Dymova M.A., Taskaev S.Y., Richter V.A., Kuligina E.V. // Cancer Commun. (London). 2020. V. 40. № 9. P. 406–421. doi: 10.1002/cac2.12089
- Kanno H., Nagata H., Ishiguro A., Tsuzuranuki S., Nakano S., Nonaka T., Kiyohara K., Kimura T., Sugawara A., Okazaki Y.? et al. // Oncologist. 2021. V. 26. № 7. P. e1250–e1255. doi: 10.1002/onco.13805
- Wongthai P., Hagiwara K., Miyoshi Y., Wiriyaesermkul P., Wei L., Ohgaki R., Kato I., Hamase K., Nagamori S., Kanai Y. // Cancer Sci. 2015. V. 106. № 3. P. 279–286. doi: 10.1111/cas.12602
- Detta A., Cruickshank G.S. // Cancer Res. 2009. V. 69. № 5. P. 2126–2132. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2345
- Mastroberardino L., Spindler B., Pfeiffer R., Skelly P.J., Loffing J., Shoemaker C.B., Verrey F. // Nature. 1998. V. 395. № 6699. P. 288–291. doi: 10.1038/26246
- Prasad P.D., Wang H., Huang W., Kekuda R., Rajan D.P., Leibach F.H., Ganapathy V. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 255. № 2. P. 283–288. doi: 10.1006/bbrc.1999.0206
- Kanai Y., Segawa H., Miyamoto K., Uchino H., Takeda E., Endou H. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 37. P. 23629–23632. doi: 10.1074/jbc.273.37.23629
- Yanagida O., Kanai Y., Chairoungdua A., Kim D.K., Segawa H., Nii T., Cha S.H., Matsuo H., Fukushima J., Fukasawa Y., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1514. № 2. P. 291–302. doi: 10.1016/S0005-2736(01)00384-4
- Nomoto T., Inoue Y., Yao Y., Suzuki M., Kanamori K., Takemoto H., Matsui M., Tomoda K., Nishiyama N. // Sci. Adv. 2020. V. 6. № 4. P. eaaz1722. doi: 10.1126/sciadv.aaz1722
- Barth R.F., Coderre J.A., Vicente M.G., Blue T.E. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. № 11. P. 3987–4002. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0035
- Mori Y., Suzuki A., Yoshino K., Kakihana H. // Pigment Cell Res. 1989. V. 2. № 4. P. 273–277. doi: 10.1111/j.1600-0749.1989.tb00203.x
- Laakso J., Ruokonen I., Lapatto R., Kallio M. // Radiat. Res. 2003. V. 160. № 5. P. 606–609. doi: 10.1667/rr3067
- Henriksson R., Capala J., Michanek A., Lindahl S.A., Salford L.G., Franzen L., Blomquist E., Westlin J.E., Bergenheim A.T., Swedish Brain Tumour Study G. // Radiother. Oncol. 2008. V. 88. № 2. P. 183–191. doi: 10.1016/j.radonc.2006.04.015
- Liu P., Chen G., Zhang J. // Molecules. 2022. V. 27. № 4. P. 1372. doi: 10.3390/molecules27041372
- Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalishman Y., Kotlyar A. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2018. V. 130. P. 296–305. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.06.026
- Shramova E., Proshkina G., Shipunova V., Ryabova A., Kamyshevsky R., Konevega A., Schulga A., Kononova E., Tegin G., Deyev S. // Cancers (Basel). 2020. V. 12. № 10. P. 3014. doi: 10.3390/cancers12103014
- Shipunova V.O., Shramova E.I., Schulga A.A., Shilova M.V., Deyev S.M., Proshkina G.M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 1156–1161. doi: 10.1134/S1068162020060308
- Proshkina G., Shramova E., Ryabova A., Katrivas L., Giannini C., Malpici D., Levi-Kalishman Y., Deyev S., Kotlyar A. // Cancers (Basel). 2022. V. 14. № 19. P. 4806. doi: 10.3390/cancers14194806
- Dai L., Liu J., Yang T., Yu X., Lu Y., Pan L., Zhou S., Shu D., Liu Y., Mao W., et al. // Nat. Commun. 2025. V. 16. № 1. P. 1329. doi: 10.1038/s41467-025-56507-4
- Li J., Sun Q., Lu C., Xiao H., Guo Z., Duan D., Zhang Z., Liu T., Liu Z. // Nat. Commun. 2022. V. 13. № 1. P. 2143. doi: 10.1038/s41467-022-29780-w
- Maruyama K., Ishida O., Takizawa T., Moribe K. // Adv. Drug Deliv. Rev. 1999. V. 40. № 1–2. P. 89–102. doi: 10.1016/S0169-409X(99)00042-3
- Iqbal N., Iqbal N. // Mol. Biol. Int. 2014. V. 2014. P. 852748. doi: 10.1155/2014/852748
- Steiner D., Forrer P., Pluckthun A. // J. Mol. Biol. 2008. V. 382. № 5. P. 1211–1227. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.085

УДК 577.29

Статус метилирования LINE-1 у пациентов с рассеянным склерозом ассоциирован с изменениями фолатного обмена

Е. А. Цымбалова¹, Е. А. Чернявская¹, Г. Н. Бисага², А. Ю. Полушин³, Е. И. Лопатина³, И. Н. Абдурасулова¹, В. И. Людино^{1*}

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 197022 Россия

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, 197341 Россия

³ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, 197022 Россия

*E-mail: vliudyno@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2024

Принята к печати 21.04.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27579

РЕФЕРАТ Нарушение эпигенетической регуляции и формирование aberrантных паттернов метилирования ДНК – важный компонент патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Изменения метилирования, обнаруживаемые у пациентов с рассеянным склерозом (РС), могут лежать в основе нарушения экспрессии генов, связанных с контролем воспалительных реакций, образованием миелина и поддержанием стабильной структуры миелиновой оболочки. Потенциальная обратимость эпигенетических изменений определяет целесообразность изучения их механизмов. В представленной работе оценено метилирование ретротранспозонов семейства LINE-1 в периферических клетках крови пациентов с РС и здоровых лиц контрольной группы. У здоровых испытуемых отмечено снижение уровня метилирования LINE-1 с возрастом. У пациентов с РС выявлена положительная корреляционная связь уровня метилирования LINE-1 с длительностью РС. Показано, что при прогрессирующем течении РС уровень метилирования LINE-1 достоверно выше, чем при ремиттирующем типе РС. Установлено, что обнаруживаемые при РС изменения метилирования LINE-1 коррелируют с изменением сывороточных уровней гомоцистеина и витамина B9, а также зависят от генотипа по полиморфизму C677T гена *MTHFR*. Полученные данные показывают вклад полиморфизма C677T в реализацию эпигенетических нарушений при развитии РС и указывают на то, что гиперметилирование может быть опосредовано нарушениями фолатного обмена при РС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метилирование, LINE-1, рассеянный склероз, гомоцистеин, метаболизм фолатов, полиморфизм C677T.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РС – рассеянный склероз; РР РС – ремиттирующий РС; ПП РС – первично-прогрессирующий РС; ВП РС – вторично-прогрессирующий РС; КИС – клинически изолированный синдром; LINE-1 – Long Interspersed Nuclear Element-1, длинные диспергированные ядерные элементы семейства L1; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; SAM – S-аденозилметионин; SAH – S-аденозилгомоцистеин; MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктаза; MTR – метионинсинтаза; MTRR – метионинсинтаза-редуктаза; Hcy – гомоцистеин; Hcy/B9 – отношение уровня гомоцистеина к уровню витамина B9; ПМНК – периферические мононуклеарные клетки крови; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; EDSS – Expanded Disability Status Scale, расширенная шкала оценки инвалидизации; MSSS – Multiple Sclerosis Severity Score, шкала оценки скорости прогрессирования рассеянного склероза; MS-HRM-анализ – Methyl-sensitive High-Resolution Melting Assay, метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением; ПЦР – полимеразная цепная реакция; AUC – Area Under Curve, площадь под кривой.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое демиелинизирующее заболевание аутоиммунной природы, сопровождающееся прогрессированием неврологической симптоматики и инвалидизацией пациентов. Генетическая предрасположенность и внешние факторы, выполняющие роль триггера в запуске патологического процесса, составляют основу этиологии РС [1, 2]. Развитие возможностей для изучения модификаций генома привело к пониманию более сложной картины патогенеза РС, включающей также эпигенетические влияния, в том числе изменения метилирования ДНК. Нарушения экспрессии генов в результате гипо- либо гиперметилирования регуляторных областей генома могут способствовать изменению восприимчивости к внешним факторам и повышению риска развития заболевания [3].

При полногеномном анализе у пациентов с РС обнаруживаются значительные отличия профилей метилирования ДНК в сравнении с контрольной группой [4–6]. Прогрессирующее течение РС характеризуется тем, что дифференциально метилированные сайты в большинстве случаев оказываются гиперметилированными [7]. Выявляемые изменения метилирования ДНК затрагивают механизмы регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), контроля иммуновоспалительных реакций, механизмы образования зрелых миелинизирующих олигодендроцитов и поддержания стабильности миелиновой оболочки [6, 8, 9]. При анализе глобального уровня метилирования генома на основе оценки метилирования ретротранспозонов LINE-1 в клетках крови установлена взаимосвязь гиперметилирования LINE-1 с повышением риска клинической активности заболевания [10]. У пациентов, получавших IFN- β , высокий уровень метилирования LINE-1 коррелировал с неэффективностью проводимой иммуномодулирующей терапии [11]. Гиперметилированные фрагменты LINE-1 обнаружены в свободно циркулирующей (внеклеточной) ДНК пациентов с РС [12]. В аналитическом обзоре, обобщающем результаты изучения метилирования ДНК при РС, отмечено, что уровень метилирования LINE-1 может быть перспективным маркером для диагностики и прогнозирования при РС, так как показана связь этого показателя как с выраженностью неврологического дефицита, так и с наличием ответа на терапию [13].

Известно, что поддержание адекватного уровня метилирования тесно связано с метаболизмом одноуглеродных фрагментов [14]. При функционировании двух сопряженных циклов – фолатного и цикла гомоцистеин–метионин – образуется универсальный донор метильной группы S-аденозилметионин

(SAM) и ингибитор ДНК-метилтрансфераз S-аденозилгомоцистеин (SAH). Баланс этих промежуточных продуктов одноуглеродного метаболизма может быть нарушен при недостатке метионина в рационе питания, а также при дефиците витаминов группы B, выполняющих функцию кофакторов в реакциях реметилирования гомоцистеина. Изменение активности ключевых ферментов фолатного цикла – метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), метионинсинтазы (MTR) и метионинсинтазы-редуктазы (MTRR), обусловленное наличием полиморфизмов в генах, кодирующих эти ферменты, также может приводить к изменению уровня общегеномного метилирования вследствие замедленной конверсии гомоцистеина в метионин, избыточного накопления гомоцистеина в сыворотке крови и изменения соотношения SAM/SAH [15].

Целью представленного исследования была характеристика уровня метилирования LINE-1 в периферических клетках крови у пациентов с рассеянным склерозом, определение лабораторных показателей, характеризующих состояние фолатного обмена – уровня гомоцистеина, цианокобаламина (витамина B12) и фолиевой кислоты (витамина B9) в сыворотке крови, определение генотипов по основным полиморфизмам генов фолатного цикла и анализ взаимосвязей между метилированием LINE-1 и метаболизмом фолатов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения исследования была сформирована выборка, в которую вошли 27 пациентов – 23 с диагнозом РС, подтвержденным согласно международным критериям МакДональда 2005, 2010 и 2017 [16, 17], и четыре пациента с диагнозом клинически изолированный синдром (КИС), вероятный РС. У 11 пациентов длительность заболевания не превышала 1 год, у 16 пациентов длительность РС составила от 1 до 23 лет. Все пациенты находились на амбулаторном наблюдении в клинике ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» и клинике Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова. Контрольную группу составили 20 человек без неврологической патологии. Характеристики исследованных групп представлены в *табл. 1*. Степень неврологического дефицита определяли в соответствии с расширенной шкалой оценки инвалидизации (EDSS). Для определения скорости прогрессирования заболевания на основе данных о возрасте, длительности заболевания и степени инвалидизации рассчитывали балл по шкале Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) [18]. От всех пациентов и здоровых добровольцев получали добровольное инфор-

Таблица 1. Характеристика пациентов и здоровых испытуемых, принимавших участие в исследовании

Характеристика	Контроль (n = 20)	РС (n = 27)
Возраст, г.	31.0 [24.5; 39.3]	33.0 [27.5; 42.5]
Пол (Ж : М)	16 : 4	18 : 9
EDSS, балл	-	3.0 [2.0; 3.9]*
MSSS, балл	-	3.0 [2.1; 4.1]*
Диагноз и тип течения РС (КИС/РР РС/ВП РС/ПП РС)	-	4/18/3/2
Длительность РС, г.	-	6.5 [2.8; 14.0]*

Примечание. Данные для возраста, EDSS и MSSS представлены в виде: медиана [1-й квартиль; 3-й квартиль]. *Медиану и межквартильные интервалы значений EDSS, MSSS и длительности заболевания определяли у пациентов с длительностью заболевания 1 год и более.

мированное письменное согласие на участие в исследовании.

Первичная подготовка образцов для оценки уровня метилирования

Периферические мононуклеарные клетки крови (ПМНК) получали методом градиентного центрифугирования с фиколлом из образцов венозной крови, отобранной в вакуумные пробирки с антикоагулянтом (EDTA). Из полученной суспензии ПМНК выделяли ДНК колоночным методом с использованием комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот («Биолабмикс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Качество выделенной ДНК контролировали, измеряя концентрацию и отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) на спектрофотометре NanoDrop LITE (Thermo Fisher Scientific, США). Для бисульфитной конверсии использовали набор реагентов BisQuick («Евроген», Россия), в реакцию брали не менее 100 нг ДНК.

Уровень метилирования LINE-1

Уровень метилирования LINE-1 определяли с использованием метил-чувствительного анализа кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM-анализ, Methyl-sensitive High-Resolution Melting Assay). ПЦР проводили с использованием протокола амплификации и олигонуклеотидных праймеров согласно [19]. Амплификацию, детекцию флуоресцентного сигнала и последующий анализ кривых плавления проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТ-прайм («ДНК-Технология», Россия). ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, с использованием готовой реакци-

онной смеси, содержащей интеркалирующий краситель SYBER Green («Евроген»), 20 пмоль каждого праймера и 10 нг модифицированной бисульфитом матрицы ДНК. Все реакции проводили в двух повторях.

Для построения калибровочных кривых готовили образцы с заданным процентом метилирования – от 0 до 100%. Полностью метилированную ДНК получали с использованием CpG-метилазы M.SSI («СибЭнзим», Россия) из геномной ДНК клеточной линии человека L68 («СибЭнзим»). В качестве полностью неметилированной ДНК использовали стандарт неметилированной ДНК человека (CpGenome Human Non-Methylated DNA Standard Set, Sigma-Aldrich, Швеция). Образцы 100% метилированной и неметилированной контрольной ДНК подвергали бисульфитной конверсии (одновременно с исследуемыми образцами), далее амплифицировали целевой фрагмент с использованием конвертированных стандартных образцов в качестве матрицы и выравнивали стандарты по концентрации таким образом, чтобы при детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени разница значений порогового цикла Ct не превышала двух. Подготовленные таким образом полностью метилированный и неметилированный стандартные образцы смешивали в соответствующих соотношениях для получения калибраторов с уровнем метилирования 25, 50, 75%. В последующем при каждой постановке проводили амплификацию всех калибровочных образцов. Различия профилей плавления и разница температур для пиков плавления метилированной и неметилированной ДНК указывают на амплификацию продуктов, отличающихся соотношением цитозина и тимина (рис. 1А).

Для возможности количественной оценки уровня метилирования данные измерений флуоресценции от каждой точки по градиенту температуры для калибраторов и исследуемых образцов импортировали в Excel в виде текстового файла. Данные нормировали и для каждой нормализованной кривой плавления строили график различий относительно кривой плавления, выбранной в качестве базовой линии и соответствующей графику для 100% метилированного стандартного образца. Для постобработки данных MS-HRM вычисляли величину площади под кривой (AUC, Area Under Curve), являющейся производной кривой плавления HRM. После нормализации на графике различий каждая кривая отображалась в том виде, в котором она появляется при вычитании значения AUC для базовой линии. Примеры графиков различия для образцов с разным уровнем метилирования представлены на рис. 1Б. Уровень метилирования образцов вы-

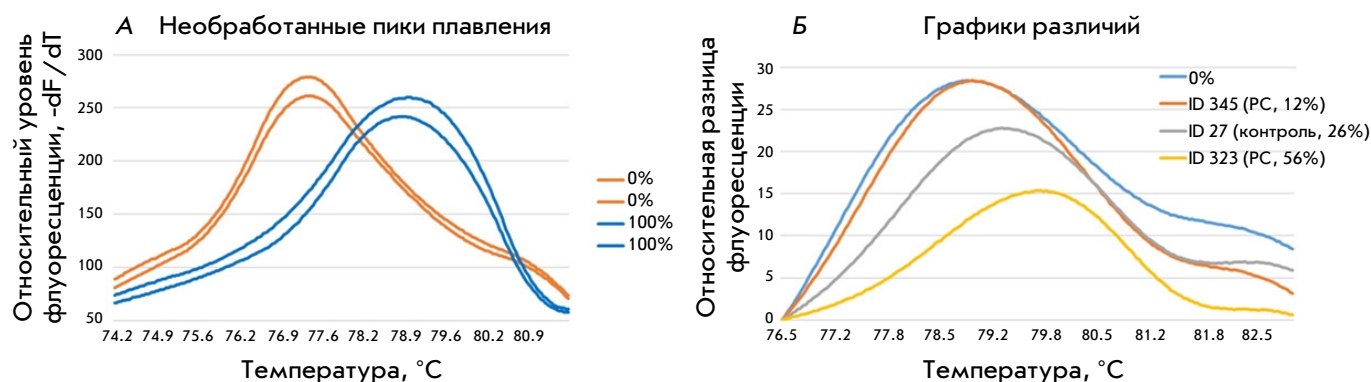


Рис. 1. Метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) для оценки уровня метилирования LINE-1. А – необработанные кривые плавления и пики плавления полностью метилированного (100%) и полностью неметилированного (0%) стандартных образцов; Б – кривые плавления для стандартного образца (0%) и трех исследуемых образцов с высоким (56%), низким (12%) и средним (26%) уровнями метилирования, преобразованные в графики различий

числяли, сравнивая показатели AUC с калибровочной кривой для стандартных образцов с известным уровнем метилирования, при проведении вычислений основывались на рекомендациях [20].

Анализ показателей фолатного обмена

Забор крови у пациентов и здоровых доноров осуществляли в утренние часы, натощак, соблюдая все правила преаналитического этапа. Определение сыровоточных уровней гомоцистеина, фолиевой кислоты (витамина B9) и цианокобаламина (витамина B12) проводили непосредственно после забора крови, образцы не хранили. Все исследования проводили на базе клинико-диагностической лаборатории. Содержание фолиевой кислоты измеряли на иммуноферментном автоматическом анализаторе Alisei Q.S. (Next Level S.R.L, Италия); метод хемилюминесцентного иммуноанализа применяли для определения содержания цианокобаламина (на анализаторе Alinity i (Abbott Laboratories, США)) и гомоцистеина (с использованием автоматизированной модульной платформы Roche Cobas 6000 с иммунохимическим модулем e601 (Roche Diagnostics, Швейцария)).

Генотипирование по полиморфизмам C677T и A1298C гена MTHFR, A2756G гена MTR и A66G гена MTRR

Генотипирование проводили методом ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченных аллель-специфических зондов («ДНК-Синтез», Россия). Последовательности праймеров и зондов приведены в [21]. Геномную ДНК выделяли из цельной крови по стандартной методике с применением набора реагентов «ДНК-сорб Б» («АмплиСенс», Россия).

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета программ Statistica (v. 10). Выбор статистических критериев основывался на соответствии или несоответствии данных закону нормального распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метилирование LINE-1 у пациентов с РС и лиц контрольной группы

Сравнение уровня общегеномного метилирования проводили для двух групп – контрольной и группы пациентов с РС, а также оценивали влияние типа течения заболевания на уровень метилирования LINE-1, сравнивая показатели у пациентов с ремиттирующим течением РС (PP РС) и прогрессирующими типами заболевания (вторично-прогрессирующим – ВП РС и первично-прогрессирующим – ПП РС). При сравнении контрольной группы и группы пациентов с РС без учета продолжительности и типа течения заболевания достоверных различий не выявлено (критерий Краскела–Уоллиса, $H = 2.002$; $p = 0.966$) (рис. 2А). Однако пациенты с прогрессирующими типами течения РС имели достоверно более высокий уровень метилирования по сравнению с пациентами с ремиттирующим течением (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0.023$) (рис. 2Б). У пациентов с прогрессирующими типами течения балл EDSS, характеризующий степень неврологического дефицита по расширенной шкале инвалидизации Курцке, также был достоверно выше, чем у пациентов с ремиттирующим типом РС – медианы и межквартильные интервалы для групп 4.0 [3.5; 5.0] балла и 2.0 [1.5; 3.0] балла соответственно (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0.012$) (рис. 2В).

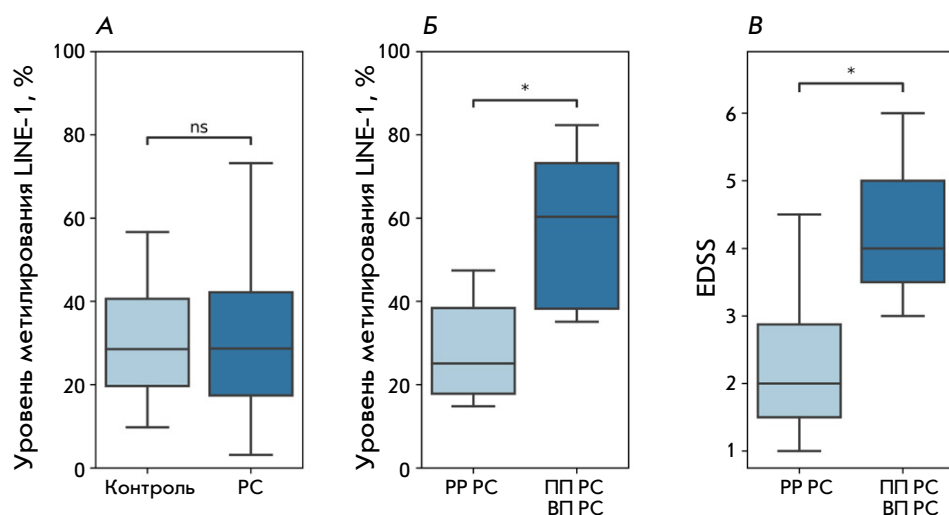


Рис. 2. Уровень метилирования LINE-1 в периферических мононуклеарных клетках крови. А – сравнение показателей в контрольной группе и в группе пациентов с РС; Б – сравнение показателей у пациентов с ремиттирующим типом течения – РР РС и прогрессирующими формами РС – ПП РС и ВП РС; В – степень неврологического дефицита у пациентов с ремиттирующим и прогрессирующим течением РС. * – достоверные различия между группами, $p < 0.05$, ns – нет достоверных различий

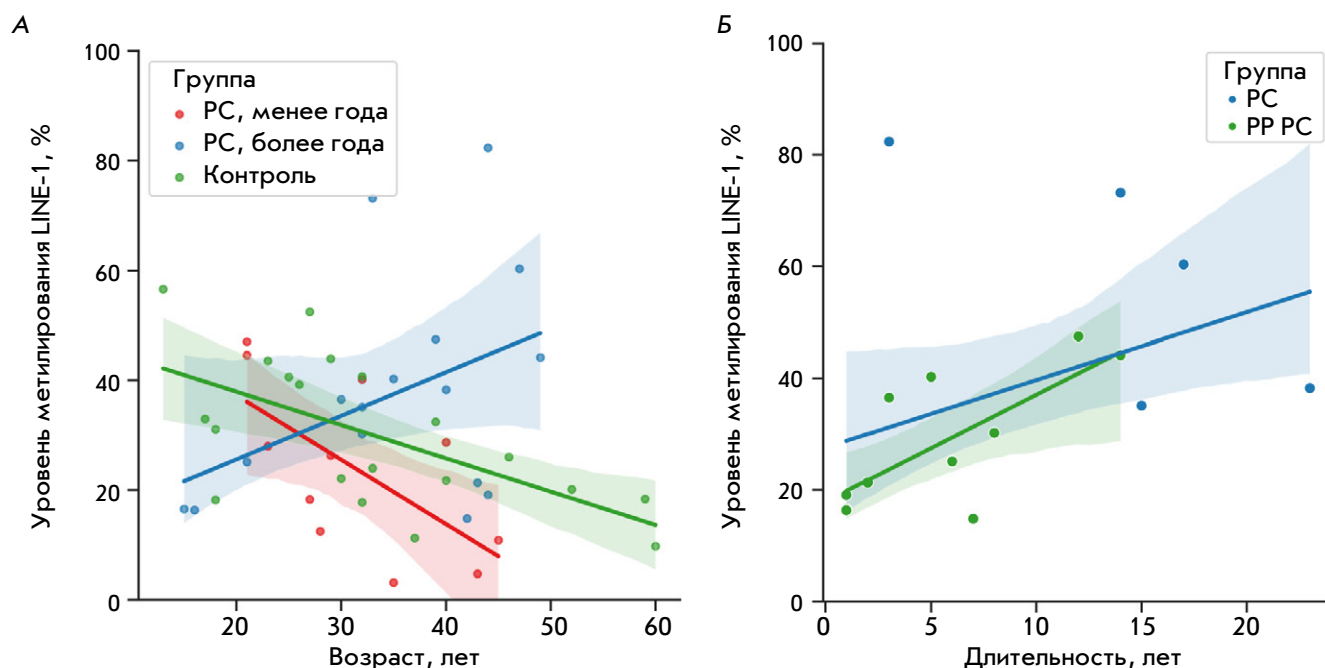


Рис. 3. Данные корреляционного анализа для выявления изменений уровня метилирования LINE-1. А – данные всех пациентов с РС и лиц контрольной группы; Б – синяя линия отображает корреляционную связь между уровнем метилирования LINE-1 и длительностью заболевания для всей группы пациентов; зеленая линия – результаты анализа пациентов с ремиттирующим течением (PP РС) и длительностью более 1 года

Влияние возраста и длительности заболевания на уровень метилирования LINE-1

Исследуемые группы не различались по возрасту, медиана и межквартильный интервал в группе контроль составили 31.0 [24.5; 39.3] года, в группе РС – 33.0 [27.5; 42.5] года. У лиц контрольной группы выявлена достоверная отрицательная корреляционная зависимость между уровнем метилирования LINE-1 и возрастом ($r = -0.61$; $p = 0.004$) (рис. 3А). У пациентов с РС достоверная взаимосвязь между этими показателями была сохранена на том же уровне

($r = -0.65$; $p = 0.032$) только при длительности заболевания менее 1 года, при большей длительности РС эта корреляционная зависимость отсутствовала, что указывает на нарушение механизмов контроля метилирования при РС. Напротив, с увеличением длительности заболевания отмечалось повышение уровня метилирования, что подтверждается данными корреляционного анализа – наличием положительной связи между длительностью РС и уровнем метилирования ($r = 0.47$; $p = 0.014$) (рис. 3Б). Если анализ проводился отдельно в группе пациентов

Таблица 2. Содержание гомоцистеина (Нсу), фолиевой кислоты (витамина В9), витамина В12 и отношение Нсу/В9 у пациентов с РС и лиц контрольной группы

Показатель, ед. изм.	Контроль (n = 20)	РС все пациенты (n = 27)	РС Длительность заболевания		Референтный интервал
			< года (n = 11)	≥ года (n = 16)	
Гомоцистеин, мкмоль/л	11.1 [8.5; 14.5]	11.7 [8.0; 14.8]	9.9 [6.35; 11.7]	13.5 [10.0; 15.5]	Мужчины: 5.46–16.20 Женщины: 4.44–13.56
В9, нмоль/л	14.95 [12.0; 18.5]	12.6 [8.0; 27.0]	26.1 [15.1; 31.7]	8.36 #* [6.1; 11.1]	7.0–46.4
В12, пг/мл	277 [211; 392]	363 [264; 551]	300 [233; 500]	375 [277; 553]	197.0–771.0
Нсу/В9	0.693 [0.455; 1.244]	0.981 [0.251; 1.7]	0.271 [0.207; 0.719]	1.724 # [1.129; 2.144]	

Примечание. Данные представлены в виде: медиана [1-й квартиль; 3-й квартиль].

#Достоверные отличия между группами пациентов с РС с разной длительностью заболевания (критерий Краскела–Уоллиса для групп «контроль», «РС, < года», «РС, ≥ года» с последующим попарным сравнением.

*Достоверные отличия от группы контроля (U-критерий Манна–Уитни).

с ремиттирующим течением РС и не включал пациентов с продолжительностью заболевания менее 1 года, то эта закономерность сохранялась и приобретала характер сильной положительной связи ($r = 0.72$; $p = 0.013$) (рис. 3Б). Отдельно для пациентов с прогрессирующими формами РС такой анализ не мог быть проведен в связи с малым числом наблюдений ($n = 5$). Таким образом, наиболее низкие значения уровня метилирования отмечены у пациентов с длительностью РС менее 1 года (пациенты в стадии дебюта заболевания), по мере прогрессирования заболевания уровень метилирования повышался, у пациентов с первично-прогрессирующим и вторично-прогрессирующим течением РС уровень метилирования был наиболее высоким. Интересно, что увеличение уровня метилирования при увеличении продолжительности заболевания у пациентов с РР РС не было связано с нарастанием инвалидизации по шкале EDSS (корреляция между длительностью РС и величиной балла EDSS у пациентов отсутствовала – $r = -0.27$; $p = 0.452$).

Уровень метилирования LINE-1 и метаболизм фолатов

Для выявления механизмов, обуславливающих нарушения регуляции метилирования при РС, измеряли уровни гомоцистеина и витаминов группы В и рассчитывали соотношения гомоцистеина и фолиевой кислоты (Нсу/В9), а также гомоцистеина и цианокобаламина (Нсу/В12) в сравниваемых группах. В табл. 2 представлены значения всех исследованных показателей. Также проведено генотипирование всех включенных в исследование испытуемых по полиморфизмам генов фолатного цикла – C677T и A1298C гена *MTHFR*, A2756G гена *MTR* и A66G гена *MTRR*.

Ранее мы выявили специфические для стадии дебюта РС изменения параметров, характеризующих состояние фолатного обмена (в частности, снижение уровня гомоцистеина при дебюте РС во взрослом возрасте) [21], поэтому у всех пациентов с РС, а также отдельно у пациентов с длительностью заболевания менее и более 1 года проанализировали показатели, характеризующие метаболизм фолатов. С использованием такого подхода установили, что в группе пациентов с длительностью РС менее 1 года преобладали низкие и средние значения уровня гомоцистеина, в то время как при продолжительном течении – высокие и средние значения (рис. 4). За низкий и высокий уровни принимали содержание гомоцистеина относительно нижнего квартиля (≤ 8.45 мкмоль/л) и верхнего квартиля (≥ 14.45 мкмоль/л) в контрольной группе.

У пациентов с разной длительностью РС также выявлены достоверные различия для соотношения Нсу/В9 – у пациентов в начальном периоде заболевания медиана отношения Нсу/В9 составила 0.271, при продолжительном течении заболевания – 1.724 ($p = 0.007$), в контрольной группе этот показатель имел промежуточное значение – 0.693 (рис. 5А). В снижение этого показателя в начальном периоде заболевания (группа пациентов с длительностью РС менее 1 года) основной вклад вносило снижение уровня гомоцистеина при нормальных значениях уровня фолиевой кислоты, содержание которой у всех пациентов этой группы находилось в пределах референтных значений (7.0–46.4 нмоль/л). При продолжительном течении РС содержание В9 достоверно снижалось относительно уровня в группе контроля (U-критерий Манна–Уитни, $p = 0.024$), у 10 пациентов из 16 концентрация витамина В9 была ниже или близка к нижней границе рефе-

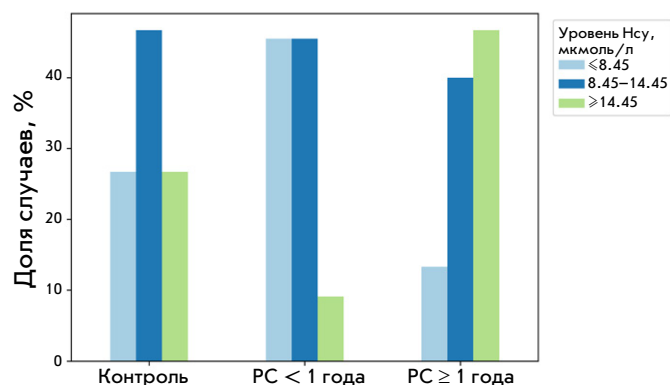


Рис. 4. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови лиц контрольной группы и пациентов с РС. Диапазоны концентраций соответствуют квартилям, определенным для группы контроля. Данные для каждого диапазона представлены в процентах от общего числа испытуемых, включенных в каждую группу

рентного интервала. Содержание гомоцистеина при длительно протекающем РС, напротив, имело тенденцию к повышению, у троих пациентов отмечалась гипергомоцистеинемия (концентрация гомоцистеина более 13.56 мкмоль/л у женщин и более 16.20 мкмоль/л у мужчин). Таким образом, высокие значения Hcy/B9 при продолжительном течении РС были обусловлены как повышением уровня гомоцистеина, так и снижением уровня витамина B9.

Кроме того, у пациентов с РС, но не в контрольной группе выявлена достоверная положительная связь между уровнем метилирования и содержанием гомоцистеина ($r = 0.45$; $p = 0.020$), а также меж-

ду уровнем метилирования и отношением Hcy/B9 ($r = 0.52$; $p = 0.006$) (рис. 5Б,В). С использованием регрессионного анализа установлено, что отношение Hcy/B9 может быть предиктором уровня метилирования ($p = 0.010$).

Проведение регрессионного анализа не выявило достоверного вклада ни одного из исследованных полиморфных вариантов генов фолатного цикла в изменения уровня метилирования LINE-1. Однако показано достоверное снижение уровня витамина B9 по сравнению с группой контроля только у пациентов с генотипом CC по полиморфизму C677T гена *MTHFR*, но не у носителей минорного T-аллеля (рис. 6А) (анализ проводился в группе пациентов с длительностью РС более 1 года). У пациентов – носителей генотипа CC – также наблюдалась тенденция к увеличению содержания гомоцистеина (рис. 6Б) и достоверное увеличение соотношения Hcy/B9 (рис. 6В).

Наблюдаемые закономерности указывают на возможное влияние генотипа по полиморфизму C677T гена *MTHFR* на опосредованные изменениями фолатного обмена нарушения контроля метилирования у пациентов с РС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 используется в качестве суррогатного маркера полногеномного метилирования, поскольку на долю этих повторяющихся генетических элементов приходится до 70% метилированных CpG-сайтов генома [22, 23]. Изменения метилирования

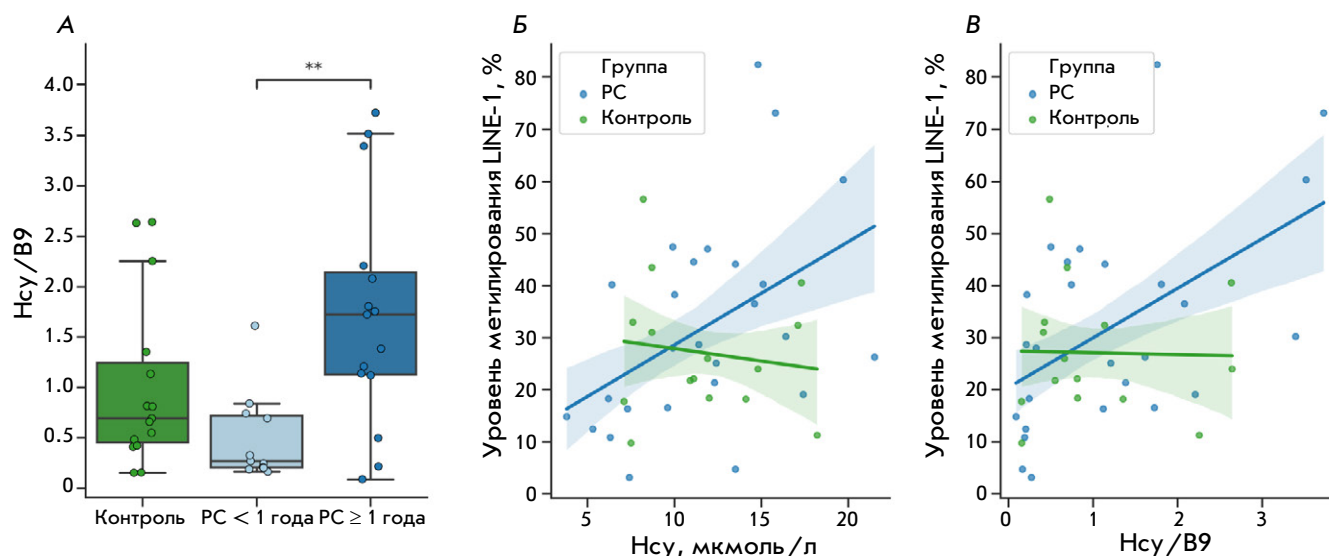


Рис. 5. Изменение отношения сывороточных концентраций гомоцистеина и фолиевой кислоты (Hcy/B9) у пациентов с РС (А), и взаимосвязь изменений уровня гомоцистеина (Б) и отношения Hcy/B9 (В) с уровнем метилирования LINE-1 в периферических мононуклеарных клетках крови. ** – достоверные различия между группами, $p < 0.05$ (критерий Краскела–Уоллиса с последующими попарными сравнениями)

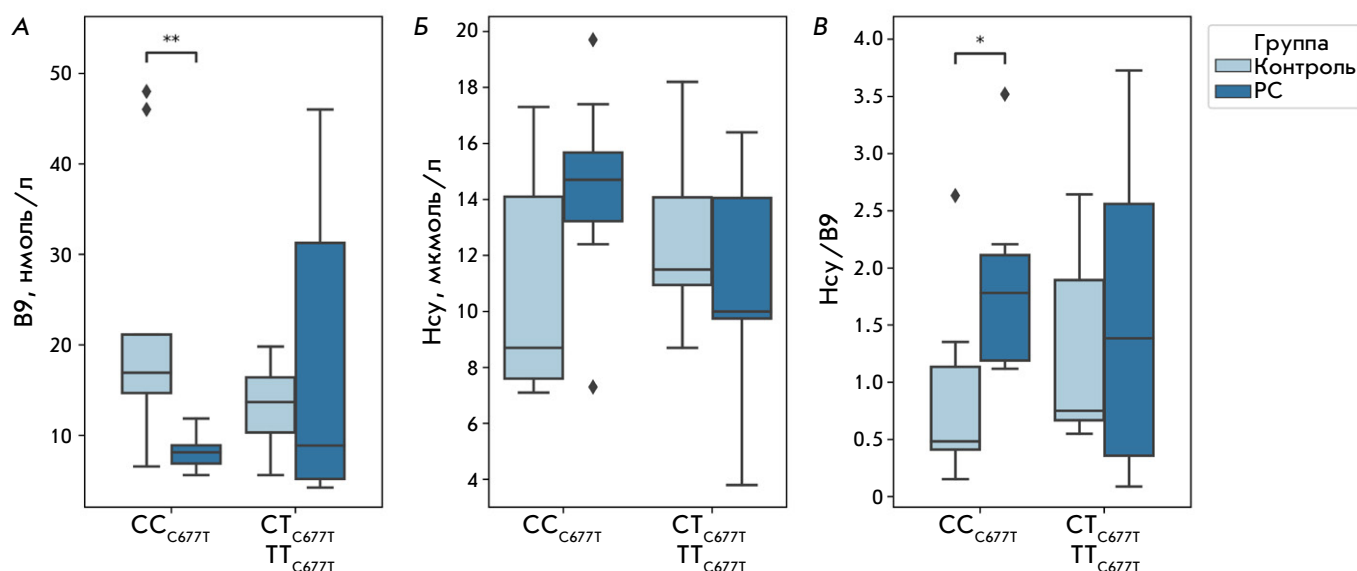


Рис. 6. Концентрация витамина B9 (А), гомоцистеина (Б) и отношение Hcy/B9 (В) у лиц контрольной группы и пациентов с РС в зависимости от генотипа по полиморфизму C677T гена *MTHFR*. ♦ – значения, отклоняющиеся от медианы на величину, превышающую 1.5 межквартильных размаха. * – достоверные различия между группами, $p < 0.05$, ** – достоверные различия между группами, $p < 0.01$.

LINE-1 представляют и самостоятельный интерес, так как эпигенетическая инактивация ретротранспозонов может способствовать нестабильности генома, структурным хромосомным перестройкам и малигнизации [24, 25]. Активация ретротранспозона LINE-1 в пожилом возрасте вызывает индукцию синтеза интерферонов и способствует стимуляции воспалительных реакций [26].

В представленном исследовании выявлены достоверные различия между уровнем метилирования ретротранспозона LINE-1 в ПМНК у пациентов с ремиттирующим и прогрессирующим течением, при этом более высокие значения метилирования обнаруживаются при прогрессирующем течении РС. Кроме того, показано повышение уровня метилирования LINE-1 у пациентов с РС при увеличении длительности заболевания. В контрольной группе, напротив, уровень метилирования снижается с увеличением возраста. То есть при РС наблюдается перестройка корреляционных взаимосвязей, в частности, у пациентов разрушается присущая здоровым индивидам отрицательная корреляционная зависимость между возрастом и уровнем общегеномного метилирования.

Обнаруживаемые у пациентов с РС изменения концентраций гомоцистеина, фолиевой кислоты и их соотношения, а также взаимосвязь этих изменений с уровнем общегеномного метилирования указывают на то, что гиперметилирование при РС может быть опосредовано нарушениями фолатного обмена. Одноуглеродный

метаболизм – многокомпонентный, многостадийный метаболический процесс. S-аденозинметионин (SAM) и S-аденозингомоцистеин (SAH) – промежуточные продукты цикла гомоцистеин–метионин – являются регуляторами активности ДНК-метилтрансфераз, оказывая стимулирующее (SAM) и ингибирующее (SAH) действие [27, 28]. Изменение баланса этих метаболитов может быть вызвано множеством факторов, среди которых недостаточное или избыточное количество метионина в рационе питания, дефицит кофакторов ферментов фолатного обмена, наличие полиморфизмов генов, участвующих в реметилировании гомоцистеина. В нормальных физиологических условиях гомоцистеин подвергается быстрой конверсии, в связи с чем его образование является биохимически выгодной реакцией. Однако при накоплении гомоцистеина равновесие смещается в сторону преимущественного образования SAH, который благодаря структурному сходству с молекулой SAM является мощным ингибитором метилтрансферазной активности [29, 30]. ДНК-метилтрансфераза DNMT1, необходимая для поддержания паттернов метилирования в процессе клеточного деления, особенно чувствительна к ингибирующему действию SAH. Таким образом, повышение концентрации гомоцистеина в крови должно сопровождаться гипометилированием, что и было продемонстрировано в ряде работ [31–34]. У пациентов с РС, однако, возрастание уровня гомоцистеина сопровождалось увеличением уровня метилирования, что позволяет предположить нару-

шение реализуемого по принципу обратной связи механизма регуляции активности DNMT. Проверка этого предположения требует проведения дополнительных исследований.

С другой стороны, стоит отметить, что только у четырех из 27 пациентов содержание гомоцистеина превышало верхний порог референтного интервала, максимальное значение у одного из этих пациентов составило 21.5 мкмоль/л, что соответствует умеренному уровню гипергомоцистеинемии. Возможно, что такое повышение концентрации гомоцистеина не является достаточным для сдвига равновесия в сторону образования SAH и, соответственно, подавления активности метилтрансфераз.

Наблюдаемые у пациентов с РС изменения, возможно, обусловлены нарушением регуляции активности MTHFR, фермента, преобразующего 5,10-метилентетрагидрофолат в 5-метилтетрагидрофолат, образование достаточного количества которого необходимо для синтеза SAM и обеспечения доступности метильных групп. SAM является аллостерическим ингибитором MTHFR [35], при нарушении этого механизма 5-метилтетрагидрофолат образуется непрерывно, способствуя усиленному реметилированию гомоцистеина, биосинтезу метионина независимо от его концентрации и образованию SAM [36]. Полученные нами данные могут указывать на реализацию такого механизма. Так, при длительном течении РС наблюдалось увеличение доли пациентов с высоким (относительно среднего в контрольной группе) содержанием гомоцистеина в сыворотке крови; чаще обнаруживались признаки дефицита фолиевой кислоты, при этом закономерно возрастало отношение Нсу/В9. При анализе этих показателей с учетом генотипа по полиморфизму С677Т гена *MTHFR* оказалось, что эти изменения были в большей степени присущи носителям генотипа СС. Изменения фолатного обмена при этом коррелировали с изменениями уровня метилирования. То есть, логично предположить вклад С-аллеля по этому полиморфному варианту в реализацию эпигенетических нарушений при развитии РС. С этой гипотезой хорошо согласуется тот факт, что наличие миссенс-мутации гена *MTHFR* в позиции 677 приводит к снижению активности фермента [37]. Катализируя реакцию превращения тетрагидрофолата в его активную форму – 5-метилтетрагидрофолат, MTHFR обеспечивает субстрат для другой ферментативной реакции – реметилирования гомоцистеина в метионин, осуществляемого MTR. Присутствие Т-аллеля по полиморфизму С677Т в гене *MTHFR* снижает активность фермента до 70% (при гетерозиготном) и до 30% (при гомозиготном варианте). Таким образом, значительное снижение уровня витамина В9 у носителей

«активного» варианта гена (генотип СС) может быть связано с его активным расходом в реакции конверсии гомоцистеина в метионин, поддержанием уровня метионина, образования SAM и сохранения на высоком уровне потенциала метилирования. Это предположение согласуется с ранее опубликованными данными о том, что носительство генотипа ТТ по полиморфизму С677Т связано с более низким глобальным метилированием в лимфоцитарной ДНК [38]. Кроме того, влияние гипергомоцистеинемии на уровень метилирования в периферических мононуклеарных клетках зависит от генотипа по полиморфизму С677Т гена *MTHFR* и фолатного статуса – снижение уровня метилцитозина отмечалось у носителей генотипа ТТ при низком содержании фолатов в крови [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании впервые показана связь между уровнем метилирования LINE-1 при рассеянном склерозе и состоянием фолатного обмена. В целом, полученные результаты хорошо согласуются с представлениями о влиянии метаболических процессов на основной эпигенетический феномен – метилирование ДНК. Нарушения метаболизма одноуглеродных фрагментов могут возникать в результате несбалансированного поступления витаминов и нутриентов либо обуславливаться наличием полиморфных вариантов генов, осуществляющих превращения в циклах фолиевой кислоты и цикле реметилирования гомоцистеина. Снижение доступности метильных доноров и нарушение контроля метилтрансферазной активности, являющиеся результатом нарушения функционирования фолатного обмена, – основа формирования aberrантных паттернов метилирования и долговременных изменений экспрессии генов. Важно отметить, что эпигенетические изменения являются регулируемыми и обратимыми. Дополнительные исследования должны быть направлены на создание алгоритмов коррекции метаболических нарушений и поддержание адекватного уровня метилирования. ●

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00312).

Соблюдение этических норм. Выполнение исследования одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 3/23 от 20.09.2023). До проведения исследования всеми испытуемыми, данные которых использованы в публикации, было подписано добровольное информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oksenberg J.R. // *Expert. Rev. Neurother.* 2013. V. 13. № 12. Suppl. P. 11–19.
2. Jakimovski D., Bittner S., Zivadinov R., Morrow S.A., Benedict R.H., Zipp F., Weinstock-Guttman B. Multiple sclerosis. // *Lancet.* 2024. V. 403. № 10422. P. 183–202. doi: 10.1016/S0140-6736(23)01473-3.
3. Manna I., De Benedittis S., Porro D. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 16. P. 8921. doi: 10.3390/ijms25168921.
4. Kulakova O.G., Kabilov M.R., Danilova L.V., Popova E.V., Baturina O.A., Tsareva E.Y., Baulina N.M., Kiselev I.S., Boyko A.N., Favorov A.V., et al. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 3. P. 103–110.
5. Castro K., Casaccia P. // *Mult. Scler.* 2018. V. 24. № 1. P. 69–74. doi: 10.1177/1352458517737389.
6. Kiselev I.S., Kulakova O.G., Boyko A.N., Favorova O.O. // *Acta Naturae.* 2021. V. 13. № 2. P. 45–57. doi: 10.32607/actanaturae.11043.
7. Киселев И.С., Кулакова О.Г., Данилова Л.В., Батурина О.А., Кабилов М.Р., Попова Е.В., Бойко А.Н., Фаворова О.О. // *Молекулярная биология.* 2022. Т. 56. № 3. С. 468–475. doi: 10.31857/S0026898422030089.
8. Sokratous M., Dardiotis E., Tsouris Z., Bellou E., Michalopoulos A., Siokas V., Arseniou S., Stamati T., Tsvigoulis G., Bogdanos D., et al. // *Auto Immun. Highlights.* 2016. V. 7. № 1. P. 12. doi: 10.1007/s13317-016-0084-z.
9. Hojati Z. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 958. P. 65–90. doi: 10.1007/978-3-319-47861-6_6.
10. Neven K.Y., Piola M., Angelici L., Cortini F., Fenoglio C., Galimberti D., Pesatori A.C., Scarpini E., Bollati V. // *BMC Genet.* 2016. V. 17. № 1. P. 84. doi: 10.1186/s12863-016-0395-0.
11. Pinto-Medel M.J., Oliver-Martos B., Urbaneja-Romero P., Hurtado-Guerrero I., Ortega-Pinazo J., Serrano-Castro P., Fernández Ó., Leyva L. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 8727. doi: 10.1038/s41598-017-09301-2.
12. Dunaeva M., Derksen M., Pruijn G.J.M. // *Mol. Neurobiol.* 2018. V. 55. № 6. P. 4681–4688. doi: 10.1007/s12035-017-0679-z.
13. Киселев И.С., Кулакова О.Г., Бойко А.Н., Фаворова О.О. // *Acta Naturae.* 2021. Т. 13. № 2 (49). С. 45–57. doi: 10.32607/actanaturae.11043.
14. Choi S.W., Friso S. // *Nutr. Res. Pract.* 2023. V. 17. № 4. P. 597–615. doi: 10.4162/nrp.2023.17.4.597.
15. Weiner A.S., Boyarskikh U.A., Voronina E.N., Mishukova O.V., Filipenko M.L. // *Gene.* 2014. V. 533. № 1. P. 168–172. doi: 10.1016/j.gene.2013.09.098.
16. Polman C.H., Reingold S.C., Edan G., Filippi M., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D., Metz L.M., McFarland H.F., O'Connor P.W., et al. // *Ann. Neurol.* 2005. V. 58. № 6. P. 840–846. doi: 10.1002/ana.20703.
17. Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F., Carroll W. M., Coetzee T., Comi G., Correale J., Fazekas F., Filippi M., Freedman M.S., et al. // *Lancet Neurol.* 2018. V. 17. № 2. P. 162–173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
18. Roxburgh R.H., Seaman S.R., Masterman T., Hensiek A.E., Sawcer S.J., Vukusic S., Achiti I., Confavreux C., Coustans M., le Page E., et al. // *Neurology.* 2005. V. 64. № 7. P. 1144–1151. doi: 10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8.
19. Tse M.Y., Ashbury J.E., Zwingerman N., King W.D., Taylor S.A., Pang S.C. // *BMC ResNotes.* 2011. V. 4. P. 565. doi: 10.1186/1756-0500-4-565.
20. Samsø Mathiasen S., Bińkowski J., Kjeldsen T., Wojdacz T.K., Hansen L.L. // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 9. P. e0273058. doi: 10.1371/journal.pone.0273058.
21. Lioudyno V.I., Tsymbalova E.A., Chernyavskaya E.A., Scripchenko E.Y., Bisaga G.N., Dmitriev A.V., Abdurasulova I.N. // *Biochemistry (Moscow).* 2024. V. 89. № 3. P. 562–573. doi: 10.1134/S0006297924030143.
22. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Gervas P.A., Cherdyntseva N.V., Mamedov I.Z., Azhikina T.L. // *Cells.* 2020. V. 9. № 9. P. 2017. doi: 10.3390/cells9092017.
23. Alves V.R.G., Micali D., Ota V.K., Bugiga A.V.G., Muniz Carvalho C., Belangero S.I. // *Complex Psychiatry.* 2023. V. 9. № 1–4. P. 119–129. doi: 10.1159/000530641.
24. Jones P.A., Baylin S.B. // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. № 6. P. 415–428. doi: 10.1038/nrg816.
25. Wilson A.S., Power B.E., Molloy P.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1775. № 1. P. 138–162. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.08.007.
26. De Cecco M., Ito T., Petrashen A.P., Elias A.E., Skvir N.J., Criscione S.W., Caligiana A., Broccoli G., Adney E.M., Boeke J.D., Le O., et al. // *Nature.* 2019. V. 566. № 7742. P. 73–78. doi: 10.1038/s41586-018-0784-9. Erratum in: *Nature.* 2019. V. 572. № 7767. P. E5. doi: 10.1038/s41586-019-1350-9.
27. Lu S.C. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000. V. 32. № 4. P. 391–395. doi: 10.1016/s1357-2725(99)00139-9.
28. Zhang J., Zheng Y.G. // *ACS Chem. Biol.* 2016. V. 11. № 3. P. 583–597. doi: 10.1021/acscchembio.5b00812.
29. Perla-Kaján J., Jakubowski H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 13. P. 3140. doi: 10.3390/ijms20133140.
30. Caracausi M., Ramacieri G., Catapano F., Cicilloni M., Lajin B., Pelleri M.C., Piovesan A., Vitale L., Locatelli C., Pirazoli G.L., et al. // *Biofactors.* 2024. V. 50. № 4. P. 709–724. doi: 10.1002/biof.2044.
31. Yi P., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Hine R.J., James S.J. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 38. P. 29318–29323. doi: 10.1074/jbc.M002725200.
32. Castro R., Rivera I., Struys E.A., Jansen E.E., Ravasco P., Camilo M.E., Blom H.J., Jakobs C., Tavares de Almeida I. // *Clin. Chem.* 2003. V. 49. № 8. P. 1292–1296. doi: 10.1373/49.8.1292.
33. Fux R., Kloor D., Hermes M., Röck T., Proksch B., Grenz A., Delabar U., Bücheler R., Igel S., Mörike K., et al. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005. V. 289. № 4. P. F786–F792. doi: 10.1152/ajprenal.00465.2004.
34. Loscalzo J., Handy D.E. // *Pulm Circ.* 2014. V. 4. № 2. P. 169–174. doi: 10.1086/675979.
35. Bhatia M., Thakur J., Suyal S., Oniel R., Chakraborty R., Pradhan S., Sharma M., Sengupta S., Laxman S., Masakapali S.K., Bachhawat A.K. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 47. P. 16037–16057. doi: 10.1074/jbc.RA120.015129.
36. Petrova B., Maynard A.G., Wang P., Kanarek N. // *J. Biol. Chem.* 2023. V. 299. № 12. P. 105457. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105457.
37. Liew S.C., Gupta E.D. // *Eur. J. Med. Genet.* 2015. V. 58. № 1. P. 1–10. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.10.004.
38. Figuiredo J.C., Grau M.V., Wallace K., Levine A.J., Shen L., Hamdan R., Chen X., Bresalier R.S., McKeown-Eyssen G., Haile R.W., et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009. V. 18. № 4. P. 1041–1049. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0926.
39. Friso S., Choi S.W., Girelli D., Mason J.B., Dolnikowski G.G., Bagley P.J., Olivieri O., Jacques P.F., Rosenberg I.H., Corrocher R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 8. P. 5606–5611. doi: 10.1073/pnas.062066299.

УДК 578.821

Гуморальный и клеточный иммунный ответ на введение добровольцам вакцины ОртопоксВак

С. Н. Щелкунов*, Е. Ю. Прудникова, А. А. Шестакова, С. Н. Якубицкий, С. А. Пьянков, А. Е. Нестеров, С. В. Усова, М. П. Богрянцева, Е. А. Нечаева, Т. В. Трегубчак, А. П. Агафонов
Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, 630559
Россия

*E-mail: snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.03.2025

Принята к печати 13.05.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27654

РЕФЕРАТ Первая в мире противооспенная вакцина четвертого поколения ОртопоксВак, получившая государственную регистрацию в 2022 году, в процессе клинических исследований, проходивших в течение 6 месяцев, проявила себя как безопасная слабо реактогенная по сравнению с живой оспенной вакциной первого поколения, но сохранившая на том же уровне иммуногенные свойства. В представленной работе анализировали уровни специфического гуморального и Т-клеточного иммунных ответов на внутрикожное введение добровольцам вакцины ОртопоксВак однократно в дозе 10^7 ООЕ или двукратно в дозе 10^6 ООЕ через 1,5, 3 и 5 лет после вакцинации. Т-хелперный ответ на иммунизацию добровольцев вакциной ОртопоксВак однократно в дозе 10^7 ООЕ сохранялся на относительно высоком уровне в течение трех лет, а затем значительно снижался. При иммунизации добровольцев этой же вакциной, но двукратно в дозе 10^6 ООЕ, резкое снижение уровня Т-хелперов детектировали после 1,5 лет. После 1,5 лет от момента иммунизации вакциной ОртопоксВак у части пациентов происходило снижение титров вируснейтрализующих антител (ВНА). При этом при иммунизации ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ достоверных различий между группами во временных точках 1,5, 3 и 5 лет не наблюдали, а в группах, вакцинированных двукратно в дозе 10^6 ООЕ, уровень титров ВНА после 1,5 лет достоверно снижался. На основании полученных результатов можно заключить, что вакцина ОртопоксВак при внутрикожном однократном введении в дозе 10^7 ООЕ обеспечивает выраженный специфический гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ в течение, по крайней мере, трех лет.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА натуральная оспа, оспа обезьян, вирус осповакцины, вакцинация, антитела, Т-клетки.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БОЕ – бляшкообразующая единица; ВНА – вируснейтрализующие антитела; ВОВ – вирус осповакцины; ВОЖ – вакцина оспенная живая; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; КИ – клинические исследования; ООЕ – оспообразующая единица; GMT – среднегеометрический титр; РВМС – моноклеарные клетки периферической крови.

ВВЕДЕНИЕ

Натуральная оспа – одно из наиболее опасных и смертоносных, высококонтагиозных инфекционных заболеваний человека, а также единственное заболевание человека, которое под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) было ликвидировано в результате глобальной кампании по противооспенной вакцинации и противозидемическому надзору. Это достижение остается одним из величайших триумфов медицинской науки [1].

Большая часть противооспенных вакцин первого поколения, применявшихся для массовой вакцинации в рамках программы ликвидации оспы,

была приготовлена из вируса осповакцины (ВОВ), выращенного на коже живых животных, главным образом телят, и в меньшей степени овец, буйволов и кроликов. Один из существенных недостатков этих вакцин – большое число тяжелых поствакцинальных осложнений, особенно среди людей с иммунодефицитом, атопическим дерматитом и у пожилых людей, ранее не вакцинированных против оспы [1, 2].

Примерно у 20–30% привитых вакциной против оспы первого поколения развивается одна или несколько побочных реакций, которые различаются по распространенности и тяжести. Более распро-

страненные побочные реакции включают субфебрильную температуру, головную боль, лимфаденопатию, фолликулит и недомогание, в то время как значительно меньшее число вакцинированных испытывают более серьезные заболевания, включая экзему, генерализованную или прогрессирующую вакцинию, энцефалит и миоперикардит. Серьезные побочные заболевания возникают только у нескольких сотен пациентов на миллион вакцинированных, а смертельный исход может быть у одного-двух пациентов на миллион [1, 3]. Учитывая тяжелые поствакцинальные осложнения при использовании классической живой вакцины и подтверждение ликвидации натуральной оспы в 1980 г., ВОЗ настоятельно рекомендовала всем странам вакцинацию против данной инфекции в дальнейшем не проводить [1, 2].

Следует отметить, что в природных резервуарах находятся близкородственные вирусу натуральной оспы зоонозные ортопоксвирусы, такие как вирус оспы обезьян, вирус оспы коров и другие, способные инфицировать людей [4]. Прекращение противооспенной вакцинации привело к тому, что за прошедшие годы большая часть человечества (прежде всего, в возрасте до 45 лет) не имеет иммунитета против любых ортопоксвирусных инфекций. Многочисленные вспышки зоонозных ортопоксвирусных инфекций среди людей стали регистрироваться в последние годы в разных географических регионах [2, 4]. Особую озабоченность вызывает инфицирование людей вирусом оспы обезьян, которое привело к эпидемии данного ортопоксвирусного заболевания, распространившейся в 2022-2023 годах на все континенты и поразившей население более ста стран [5]. В настоящее время сложная ситуация с распространением оспы обезьян среди людей сохраняется прежде всего в Африке [6]. Это заставляет с новой силой вернуться к рассмотрению вопроса о возможном возврате оспы или подобного опасного заболевания в результате естественной эволюции агентов зоонозных ортопоксвирусных инфекций [7, 8].

Чтобы предотвратить развитие локальных вспышек инфекции в распространенные эпидемии и уменьшить риск возникновения в результате естественной эволюции высокопатогенного для человека ортопоксвируса, усилия исследователей должны быть направлены на создание безопасных живых вакцин новых поколений на основе ВОВ. Все это обуславливает научный и практический интерес и необходимость нового подхода к вакцинопрофилактике инфекций, вызванных ортопоксвирусами.

С развитием методов генетической инженерии стало возможным создавать модифицированные

варианты ВОВ с помощью направленного введения целевых последовательностей в вирусный геном, удаления или нарушения конкретных генов вирулентности самого вируса [9, 10], не затрагивая гены, обеспечивающие функции размножения вируса в культуре клеток. Выключение генов вирулентности способно существенно снизить патогенные свойства ВОВ. Одним из наиболее перспективных направлений таких работ является создание методами генетической инженерии высокоаттенуированных вариантов ВОВ, обладающих иммуногенностью и протективностью, сравнимой с уровнями данных показателей у классической противооспенной вакцины первого поколения, но при этом характеризующихся существенно меньшей патогенностью.

Вариантом такой вакцины является полученная нами вакцина четвертого поколения ОртопоксВак – живая вакцина против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций на основе штамма VACΔ6 с шестью нарушенными генами (C3L, N1L, J2R, A35R, A56R и B8R), выращенного в перевиваемой культуре клеток 4647 [2, 11].

Проведение работ по исследованию длительности поствакцинального иммунного ответа у лиц, иммунизированных вакциной ОртопоксВак, в сравнении с ранее используемой в России «Вакциной оспенной живой» [12] имеет важное значение, так как это позволит определить необходимость и сроки ревакцинации при иммунизации людей вакциной четвертого поколения.

Целью данной работы было выполнение пострегистрационного исследования напряженности и длительности противооспенного гуморального и Т-клеточного иммунитета у лиц, принимавших участие в проведении I и II/III фаз клинических исследований вакцины ОртопоксВак (Вакцина для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций на основе вируса осповакцины живая культуральная).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Общий дизайн исследования

Проведено открытое сравнительное рандомизированное исследование в параллельных группах, в котором приняли участие 76 мужчин и женщин в возрасте от 25 до 40 лет, соответствующих критериям включения и не имеющих критериев невключения, ранее принимавших участие в клинических исследованиях (КИ) вакцины ОртопоксВак I фазы (КИ VACΔ6-01/18) и II/III фаз (КИ VACΔ6-01/20) (рис. 1).

Группа 1 представлена 15 здоровыми добровольцами (7 мужчин и 8 женщин), принимавшими участие в клиническом исследовании VACΔ6-01/20



Рис. 1. Схема распределения добровольцев по группам

и вакцинированными однократно внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ.

Группа 2 представлена 15 здоровыми добровольцами (6 мужчин и 9 женщин), принимавшими участие в клиническом исследовании VASΔ6-01/20 и вакцинированными двукратно с интервалом 28 дней внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^6 ООЕ.

Группа 3 (положительный контроль, ПК) представлена 7 здоровыми добровольцами (4 мужчины и 3 женщины), работавшими с вирусами рода ортопоксвирусов и привитыми двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной ОспаВир и через 7 дней Вакциной оспенной живой (ВОЖ) на основе штамма Л-ИВП ВОВ («Микроген», Россия) как описано [13] (ОспаВир + ВОЖ, 2020 г.).

Группа 4 (отрицательный контроль, ОК) представлена 10 здоровыми добровольцами (6 мужчин и 4 женщины), не вакцинированными ранее противооспенными вакцинами, не имевшими контакта с пациентами, вакцинированными противооспенными вакцинами, и не работавшими с вирусами рода ортопоксвирусов.

Группа 5 представлена 9 здоровыми добровольцами (3 мужчин и 6 женщин), принимавшими участие в клиническом исследовании VASΔ6-01/18 и вакцинированными однократно внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ.

Группа 6 представлена 10 здоровыми добровольцами (7 мужчин и 3 женщины), принимавшими участие в клиническом исследовании VASΔ6-01/18 и вакцинированными двукратно с интервалом 28

дней внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^6 ООЕ.

Группа 7 (ПК) представлена 10 здоровыми добровольцами (5 мужчин и 5 женщин), принимавшими участие в клиническом исследовании VASΔ6-01/18 и вакцинированными двухэтапным методом ОспаВир + ВОЖ.

До выполнения всех процедур данного исследования от каждого пациента было получено письменное информированное согласие на включение в исследование.

Вирусы, культура клеток

В работе использовали штаммы Л-ИВП [9] и VASΔ6 ВОВ [11], а также перевиваемую линию клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1 из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Забор образцов крови у добровольцев

Забор крови проводили из локтевой вены в условиях стационара и прививочного кабинета с соблюдением правил асептики и антисептики. За один забор отбирали 30–35 мл крови, использовали вакуумные пробирки (вакутейнеры). Работа проведена на клинической базе Федерального государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Медико-санитарная часть № 163 Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУЗ МСЧ-163 ФМБА России).

Исследование получило одобрение Этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

(выписка из протокола № 10 заседания Этического комитета от 14.02.2024 г.).

Для оценки гуморального иммунитета из образцов крови получали сыворотку путем осаждения форменных элементов с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 1000 *g* и 4°C. Полученные сыворотки выдерживали при температуре 56°C в течение 30 мин и хранили при температуре минус 20°C.

Иммуноферментный анализ сывороток крови

Титр специфических антител определяли в ИФА с использованием медицинского изделия «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител класса G к антигенам поксвирусов "Вектор ИФА Покс-IgG" по ТУ 21.10.60-096-05664012-2022» как описано [14].

Определение титра вируснейтрализующих антител в сыворотках крови

Для определения титра вируснейтрализующих антител (ВНА) проводили реакцию подавления бляшкообразования ВОВ штамм Л-ИВП на культуре клеток CV-1. Для анализа готовили четыре последовательных разведения образцов сывороток крови добровольцев с шагом два, начиная с 1:10 – 1:10, 1:20, 1:40 и 1:80, при уточнении титров ВНА для образцов с нейтрализующей активностью сывороток, выходящей за пределы 1:80, дополнительно использовали двукратные разведения 1:160–1:1280. К полученным разведениям сывороток добавляли равный объем разведения ВОВ с титром около 400 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл (около 40 БОЕ/лунка). Полученные смеси инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Все разведения сывороток и вируса выполняли с использованием поддерживающей питательной среды: питательная среда ДМЕМ/F-12 (1:1) с 2% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (ФСР), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Далее 200 мкл смеси разведения сыворотки с ВОВ наносили на 90–100% монослой культуры клеток CV-1, выращенный в 24-луночном культуральном планшете, используя по три лунки на каждое разведение сыворотки. Проводили сорбцию вируса в течение 1 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, после чего добавляли поддерживающую питательную среду (1 мл/лунка) и инкубировали в течение еще 48 ч при 37°C и 5% CO₂. По окончании периода инкубации культуральную среду удаляли, а клетки фиксировали и окрашивали в течение 15 мин, добавляя раствор 0.2% кристаллического фиолетового в водном растворе 9.6% этанола с 2% формальдегидом (около 0.2 мл/лунка),

после чего краску удаляли, а культуральный планшет высушивали при комнатной температуре.

Подсчитывали количество бляшек (очаги разрушенного монослоя клеток округлой формы в виде белых пятен на синем фоне) в монослое культуры клеток CV-1 и определяли разведения сывороток, подавляющие образование 50% БОЕ по сравнению с количеством БОЕ в лунках с неиммунной сывороткой (группа отрицательного контроля). Расчеты проводили по методу Спирмена–Кербера, результаты выражали в виде 50% бляшкоподавляющего нейтрализующего титра.

Выделение мононуклеаров периферической крови (РВМС)

Венозную кровь добровольцев отбирали в пробирки с гепарином (10 ЕД/мл). РВМС выделяли в градиенте плотности фиколла (1.077 г/мл). Полученную суспензию клеток трижды отмывали средой ДМЕМ/F12, содержащей 5% ФСР, клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 350 *g* и температуре (10 ± 2)°C. Осадок клеток ресуспендировали в среде ДМЕМ/F12, содержащей 15% ФСР. Далее готовили суспензию клеток с концентрацией 10 млн кл./мл и вносили по 100 мкл суспензии в лунки 96-луночного плоскодонного культурального планшета (1 × 10⁶ кл./лунка).

Внутриклеточное окрашивание клеток на цитокины

Клеточно-опосредованный иммунный ответ оценивали с помощью внутриклеточного окрашивания на цитокины после стимуляции РВМС антигеном. Каждый образец оценивали с помощью нестимулированных клеток (клетки без стимуляции, фоновый контроль), клеток, стимулированных вирусом, содержащим материалом (очищенный вирус осповакцины штамм VACΔ6 – 4.0 мкг общего белка), и положительного контроля, клетки после стимуляции форбол-12-миристан-13-ацетатом 50 нг/мл (Sigma-Aldrich, США) и ионофором 0.5 мкг/мл (Calcium Ionophore A23187, Sigma-Aldrich). Клетки инкубировали при температуре 37°C в атмосфере 5.0% CO₂ в течение 8 ч, далее в каждую лунку добавляли GolgiPlug (BD Biosciences, США) согласно рекомендациям производителя и дополнительно инкубировали при 37°C в атмосфере 5.0% CO₂ в течение ночи. После стимуляции клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 2% КРС. Далее клетки окрашивали в течение 40 мин при 4°C красителем Fixable Viability Stain 780 и моноклональными антителами CD3 (клон SK7, BV786), CD4 (клон RPA-T4, PerCP-Cy 5.5), CD8 (клон RPA-T8, Alexa Fluor 700), CD45RA (клон

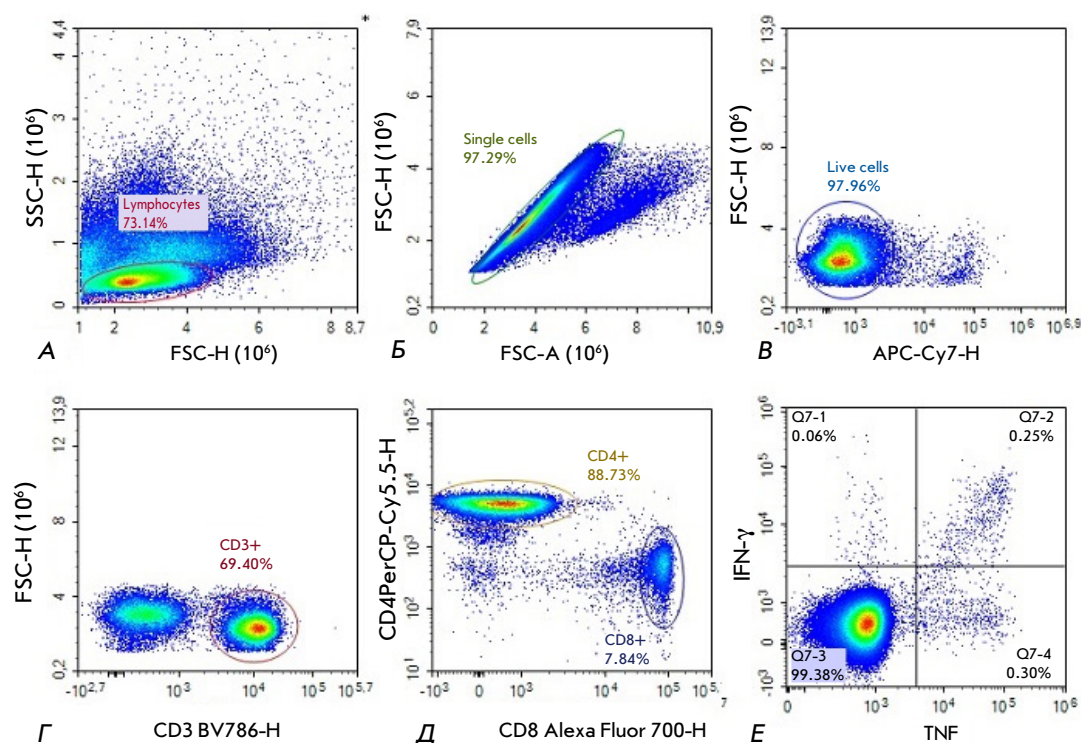


Рис. 2. Тактика гейтирования для идентификации основных популяций Т-клеток (см. пояснения в тексте)

HI100, BV510), CCR7 (CD197) (клон 3D12, PE-Cy7) (BD Biosciences). Затем клетки трижды промывали 2% фосфатно-солевым буферным раствором и инкубировали в течение 20 мин со 100 мкл раствора для фиксации и пермеабилзации клеток (Fixation/Permeabilization solution, BD Biosciences). По окончании инкубации трижды промывали 1× промывочным буфером (BD Perm/Wash™ Buffer, BD Biosciences) и в течение 40 мин окрашивали моноклональными антителами к интерлейкину-2 (IL-2, клон MQ1 17H12, APC), фактору некроза опухоли (TNF, клон MAb11, PE), интерферону-γ (IFN-γ, клон B27, BV421, BD Biosciences). Клетки трижды промывали 1× промывочным буфером и фиксировали в 300 мкл 1× буфера (BD CellFix, BD Biosciences). Фиксированные клетки анализировали на проточном цитометре ACEA NOVOCite Quanteon 4025 (Agilent Technologies, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения NovoExpress версия 1.5.0.

При выполнении цитометрического анализа использовали следующий порядок гейтирования (рис. 2). В координатах прямого и бокового светорассеяния выделяли лимфоцитарную фракцию (рис. 2А), далее отделяли синглеты (одиночные клетки): по оси абсцисс – интегральный сигнал прямого светорассеяния, по оси ординат – пиковый сигнал прямого светорассеяния (рис. 2Б). Из одиночных клеток выделяли живые клетки, негатив-

ные по APC-Cy7 (рис. 2В). По уровню экспрессии CD3 гейтировали Т-клетки, позитивные по BV786 (рис. 2Г). Дифференциацию цитотоксических Т-лимфоцитов (фенотип CD3+CD8+) от Т-хелперов (фенотип CD3+CD4+) проводили согласно гистограмме на рис. 2Д. На графике рис. 2Е указаны Т-хелперы, позитивные по цитокинам TNF и IFN-γ.

Статистический анализ данных

Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для трех и более групп. Сравнение между двумя группами проводили при помощи F-критерия. Различия в полученных результатах считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение в ИФА антител, специфичных к ВОВ

Надежным критерием эффективности вакцинации является использование в качестве сравнительного эталона титров антител в образцах контрольных групп: в группе образцов отрицательного контроля (ОК), полученных от добровольцев, не вакцинированных оспенными вакцинами, не имевших контакта с пациентами, вакцинированными оспенными вакцинами, и не работавших с вирусами рода ортопоксвирусов; в группе образцов положительного

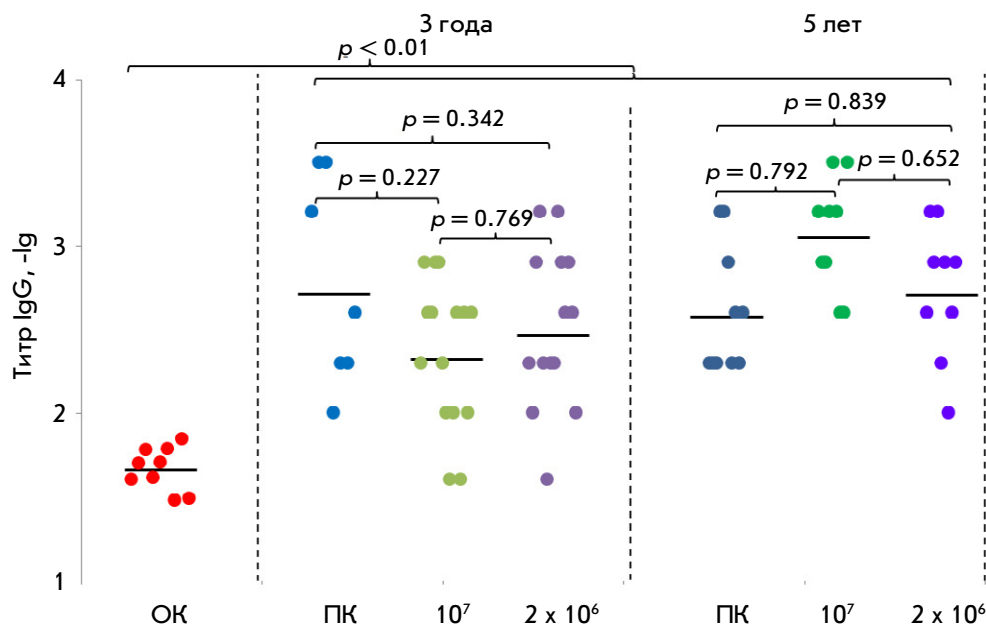


Рис. 3. Логарифмы титров ИФА специфических IgG к антигенам ВОВ в сыворотках крови добровольцев, участвующих в клинических испытаниях вакцины ОртопоксВак. ОК – группа сравнения (отрицательный контроль) – добровольцы, не вакцинированные оспенными вакцинами, не имевшие контакта с пациентами, вакцинированными оспенными вакцинами, и не работавшие с вирусами рода ортопоксвирусов; ПК – группа положительного контроля – группа добровольцев, привитых двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной ОспаВир и через 7 дней Вакциной оспенной живой на основе штамма Л-ИВП ВОВ (Микроген); 10⁷ – группа добровольцев, привитых однократно внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10⁷ ООЕ/0.2 мл; 2 × 10⁶ – группа добровольцев, привитых двукратно с интервалом 28 дней внутрикожно в дозе 10⁶ ООЕ/0.2 мл. Значимость различий между группами определяли по F-критерию. Каждая точка соответствует одному добровольцу. Горизонтальные линии – значения GMT каждой группы

контроля (ПК), полученных от добровольцев, вакцинированных препаратом первого поколения, через 3 года и 5 лет после вакцинации.

В опытных группах КИ II/III фаз через 3 года после вакцинации число добровольцев с титрами ИФА $\geq 1:100$ составило 86.7% при однократной вакцинации ОртопоксВак в дозе 10⁷ ООЕ и 92.8% – при двукратной вакцинации в дозе 10⁶ ООЕ. Через 5 лет в группах добровольцев КИ I фазы образцов сывороток с титрами ниже 1:100 не выявлено.

Установлено, что величина среднегеометрического титра (GMT) выявляемых методом ИФА специфических IgG составила 46 в группе ОК с диапазоном погрешности от 36 до 58 для 95% доверительного интервала.

Аналогичные величины в остальных контрольных и экспериментальных группах значительно отличались и имели намного большие диапазоны погрешности. Так, через 3 года от момента вакцинации значения GMT составили 212 (от 121 до 372), 292 (от 155 до 555) и 518 (от 137 до 1952) в группах 10⁷, 2 × 10⁶ и ПК соответственно. Через 5 лет после вакцинации величины GMT составили в таких же группах соот-

ветственно 1131 (от 619 до 2065), 510 (от 251 до 1038) и 379 (от 204 до 704). Логарифмическая интерпретация полученных данных приведена на рис. 3.

Достоверные отличия выявлены только в группе ОК по отношению к другим трем группам через 3 года и через 5 лет после вакцинации (рис. 3). В остальных парах групп отличия недостоверны.

Определение титров вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации ВОВ

Важную роль в формировании протективного иммунитета против оспы и других ортопоксвирусных инфекций играют вируснейтрализующие антитела [15, 16]. Определяемая величина титров ВНА может зависеть от пары вирус–культура клеток и особенностей используемой методики. Поэтому надежным критерием эффективности вакцинации по данному показателю является использование вакцины первого поколения в качестве контрольной, эффективность которой против натуральной оспы была показана ранее.

Выполненные нами исследования показали (рис. 4), что через 1.5 года после иммунизации

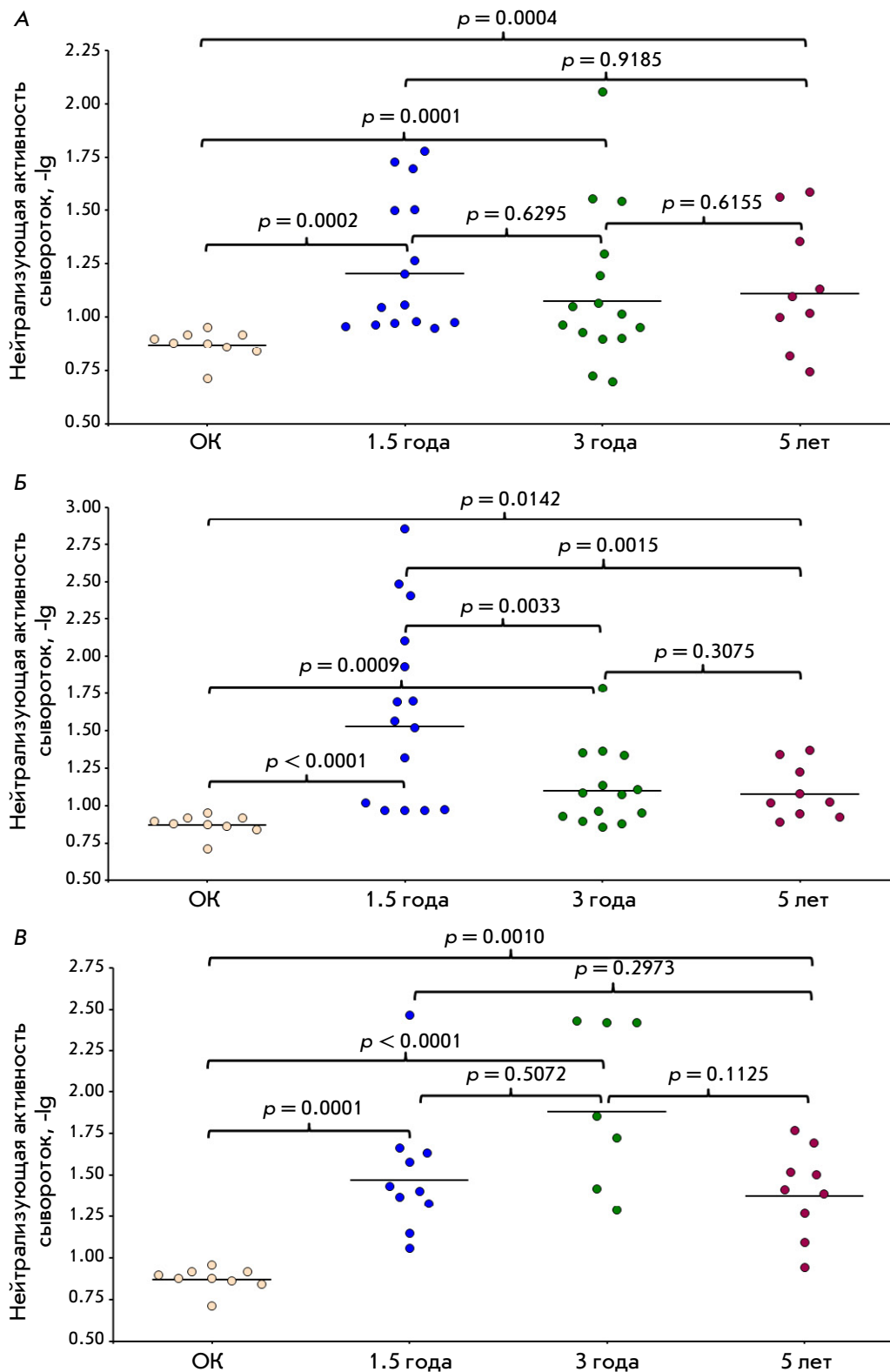


Рис. 4. Нейтрализующая активность сывороток крови добровольцев, вакцинированных в рамках I и II/III фаз клинических исследований вакцины ОртопоксВак. Титры вируснейтрализующих антител определены с помощью реакции подавления бляшкообразования БОВ (штамм Л-ИВП) на культуре клеток CV-1. Данные представлены в виде -lg; каждая точка соответствует одному добровольцу; горизонтальные линии – уровни GMT антител в группах; значимость различий между группами определяли по F-критерию. Представлены данные по титрам ВНА через 1,5, 3 и 5 лет для: А – группа добровольцев, привитых однократно внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ/0,2 мл; Б – группа добровольцев, привитых двукратно с интервалом 28 дней внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^6 ООЕ/0,2 мл; В – группа положительного контроля (добровольцы, привитые двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной ОспаВир и через 7 дней Вакциной оспенной живой); ОК – группа сравнения (отрицательный контроль) – добровольцы, не вакцинированные оспенными вакцинами, не имевшие контакта с пациентами, вакцинированными оспенными вакцинами, и не работавшие с вирусами рода ортопоксвирусов

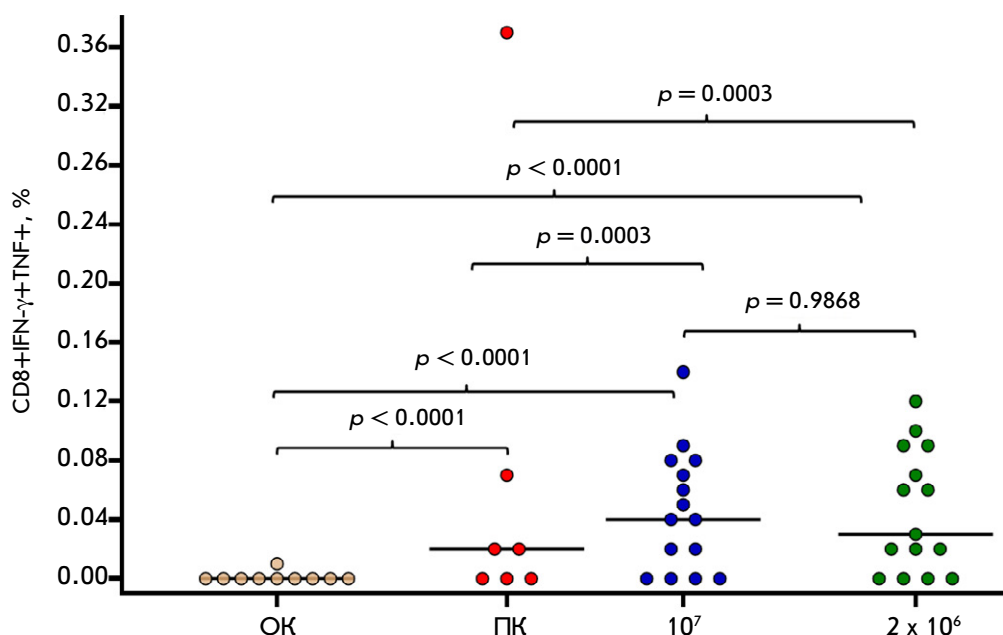


Рис. 5. Процентное содержание ВОВ-специфических CD8+ Т-клеток, продуцирующих IFN- γ и TNF, в образцах РВМС от добровольцев, вакцинированных противооспенной вакциной в рамках клинических исследований, через 1.5 года после вакцинации. ОК – группа сравнения (отрицательный контроль) – добровольцы, не вакцинированные оспенными вакцинами, не имевшие контакта с пациентами, вакцинированными оспенными вакцинами, и не работавшие с вирусами рода ортопоксвирусов; ПК – группа положительного контроля, состоящая из добровольцев, привитых двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной ОспаВир и через 7 дней Вакциной оспенной живой на основе штамма Л-ИВП ВОВ (Микроген); 10^7 – группа добровольцев, привитых однократно внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ/0.2 мл; 2×10^6 – группа добровольцев, привитых двукратно с интервалом 28 дней внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^6 ООЕ/0.2 мл. Значимость различий между группами определяли по F-критерию. Каждая точка соответствует одному добровольцу

как вакциной ОртопоксВак, так и ВОЖ во всех группах вакцинированных добровольцев уровень ВНА был достоверно выше, чем у добровольцев группы ОК, тогда как достоверных различий в величинах титров ВНА между сравниваемыми группами привитых добровольцев не выявлено.

При анализе сывороток крови пациентов группы ОК с использованием реакции торможения бляшкообразования величина GMT ВНА составляла 1:7.

В опытных группах КИ II/III фаз через 1.5 года после вакцинации число добровольцев с титрами ВНА $\geq 1:10$ составило 60.0% при однократной вакцинации ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ и 73.3% – при двукратной вакцинации в дозе 10^6 ООЕ. У всех добровольцев, привитых ВОЖ, титр ВНА был выше 1:10.

В этих же группах число добровольцев с титрами ВНА от 1:10 и более через 3 года составило 53,3% при однократной иммунизации вакциной ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ и 57,1% – при двукратной вакцинации в дозе 10^6 ООЕ, что указывает на постепенное снижение титра ВНА с течением времени

после вакцинации. У всех изученных добровольцев, привитых ВОЖ, титр ВНА превышал 1:10.

Число добровольцев, участвовавших в КИ I фазы, с титрами ВНА $\geq 1:10$ через 5 лет составило 77.8% при однократной вакцинации ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ и 67.7% – при двукратной вакцинации в дозе 10^6 ООЕ. Число добровольцев, вакцинированных двухэтапным методом вакциной первого поколения, с титрами ВНА от 1:10 и более через 5 лет составило 88.9% (рис. 4).

Через 3 года и 5 лет после иммунизации в группах лиц, двукратно вакцинированных ОртопоксВак в дозе 10^6 ООЕ, наблюдали достоверное снижение уровней ВНА по сравнению с уровнем, определенным через 1.5 года после вакцинации (рис. 4Б). В группах добровольцев, привитых ОртопоксВак однократно в дозе 10^7 ООЕ, наблюдали некоторое снижение титров ВНА через 3 года и 5 лет, но без достоверных отличий от титров ВНА через 1.5 года после вакцинации (рис. 4А).

Не выявлено достоверных различий в титрах ВНА между группами пациентов, привитых двух-

этапным методом Вакциной оспенной инактивированной, а затем ВОЖ, через 1.5, 3 года и 5 лет (рис. 4В).

Оценка Т-клеточного противооспенного иммунитета

Клеточно-опосредованный иммунный ответ определяли, используя протокол внутриклеточного окрашивания цитокинов, который выявляет специфические Т-клетки благодаря их способности продуцировать цитокины, включая IFN- γ , TNF и IL-2, после костимуляции моноклеарных клеток периферической крови (РВМС) штаммом VAC Δ 6 BOB *ex vivo* (см. раздел «Экспериментальная часть»).

Через 1.5 года после вакцинации в образцах РВМС цитометрически выявили присутствие специфических для BOB клеток – как Т-хелперов (CD4+), так и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+). После 20-часовой стимуляции РВМС штаммом VAC Δ 6 BOB наблюдали увеличение количества CD4+IFN- γ + и CD8+IFN- γ + Т-клеток. При этом до 80–90% антигенспецифических клеток приходилось на клетки с тройной (CD4+IFN- γ +TNF+IL-2+) или двойной (CD8+IFN- γ +TNF+) экспрессией цитокинов.

У большинства добровольцев групп, вакцинированных ОртопоксВак (как однократно в дозе 10^7 ООЕ, так и двукратно в дозе 10^6 ООЕ), выявляли специфические к BOB CD8+ Т-клетки. При этом до 90% клеток популяции CD8+IFN- γ +TNF+ были отрицательными по маркеру CD57, что свидетельствует о том, что эти Т-клетки не достигли состояния терминальной дифференцировки/истощения. В обеих группах добровольцев, иммунизированных ОртопоксВак, уровень клеток CD8+IFN- γ +TNF+ достоверно превосходил аналогичные показатели для группы положительного контроля – добровольцев, иммунизированных противооспенной вакциной первого поколения (рис. 5).

Через 1.5 года уровень Т-хелперов CD4+IFN- γ +TNF+IL-2+ в обеих группах добровольцев, привитых ОртопоксВак, не имел достоверных отличий от группы, иммунизированной Вакциной оспенной живой первого поколения (рис. 6).

Дополнительно анализировали экспрессию маркеров памяти CCR7 (CD197) и CD45RA в специфических к BOB CD4+ и CD8+ Т-клетках. В популяции BOB-специфических CD4+ Т-клеток доля эффекторных клеток памяти T_{EM} (CCR7-CD45RA-) составляла в основном 80–90%, клеток центральной памяти T_{CM} (CCR7+CD45RA-) – 5–10%, терминально дифференцированных эффекторных клеток памяти T_{EMRA} (CCR7-CD45RA+) – 2–5% и до 1% популяции представлена наивными Т-клетками (CCR7+CD45RA+) (табл. 1).

В популяции BOB-специфических CD8+ Т-клеток доля T_{EM} (CCR7-CD45RA-) составляла около 20%, а T_{EMRA} (CCR7-CD45RA+) – до 80%.

Через 3 года и 5 лет после иммунизации как ВОЖ, так и вакциной ОртопоксВак в препаратах РВМС добровольцев после костимуляции BOB уровень специфических CD8+ Т-клеток был ниже предела обнаружения в используемом методе.

У пациентов, иммунизированных ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ, через 3 года продукция Т-хелперов CD4+IFN- γ +TNF+IL-2+ сохранялась на прежнем уровне, но через 5 лет значительно снизилась (рис. 6А). У добровольцев, привитых двукратно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^6 ООЕ, уже к третьему году после вакцинации уровень BOB-специфических Т-хелперов существенно снизился и сохранялся на низком уровне до 5 лет (рис. 6Б).

Через 3 года после иммунизации во всех группах добровольцев в популяции BOB-специфических CD4+ Т-клеток доля эффекторных клеток памяти T_{EM} (CCR7-CD45RA-) в основном составляла 80–90%, клеток центральной памяти T_{CM} (CCR7+CD45RA-) – 5–10%, T_{EMRA} (CCR7-CD45RA+) – 2–10% и до 1% – наивных Т-клеток (CCR7+CD45RA+) (табл. 2). Такое распределение клеток по маркерам памяти CCR7 (CD197) и CD45RA характерно как для добровольцев, иммунизированных вакциной четвертого поколения ОртопоксВак, так и для добровольцев, вакцинированных двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной и затем ВОЖ первого поколения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сложность получения новой безопасной оспенной вакцины заключается в необходимости снижения вирулентности вакцинного штамма BOB при одновременной индукции достаточного и длительного уровня гуморального и клеточного иммунного ответа. Критерии оценки уровня иммунитета, развившегося у человека в ответ на противооспенную вакцинацию и обеспечивающего полную защиту от ортопоксвирусных инфекций, до сих пор не установлены. Имеются лишь единичные разрозненные работы, в которых сделана попытка выявить такие критерии.

Исторически первым критерием оценки иммунного ответа на инфекцию ВНО или вакцинацию BOB было определение уровня ВНА в сыворотках крови пациентов. Маск и соавт. [17] показали, что люди с титром ВНА к BOB <1:32 более чувствительны к инфицированию при контакте с больными (20% контактных пациентов заболели) по сравнению с теми, у кого титр ВНА был $\geq$ 1:32 (заболел 1% контактных пациентов). Показано также, что во вре-

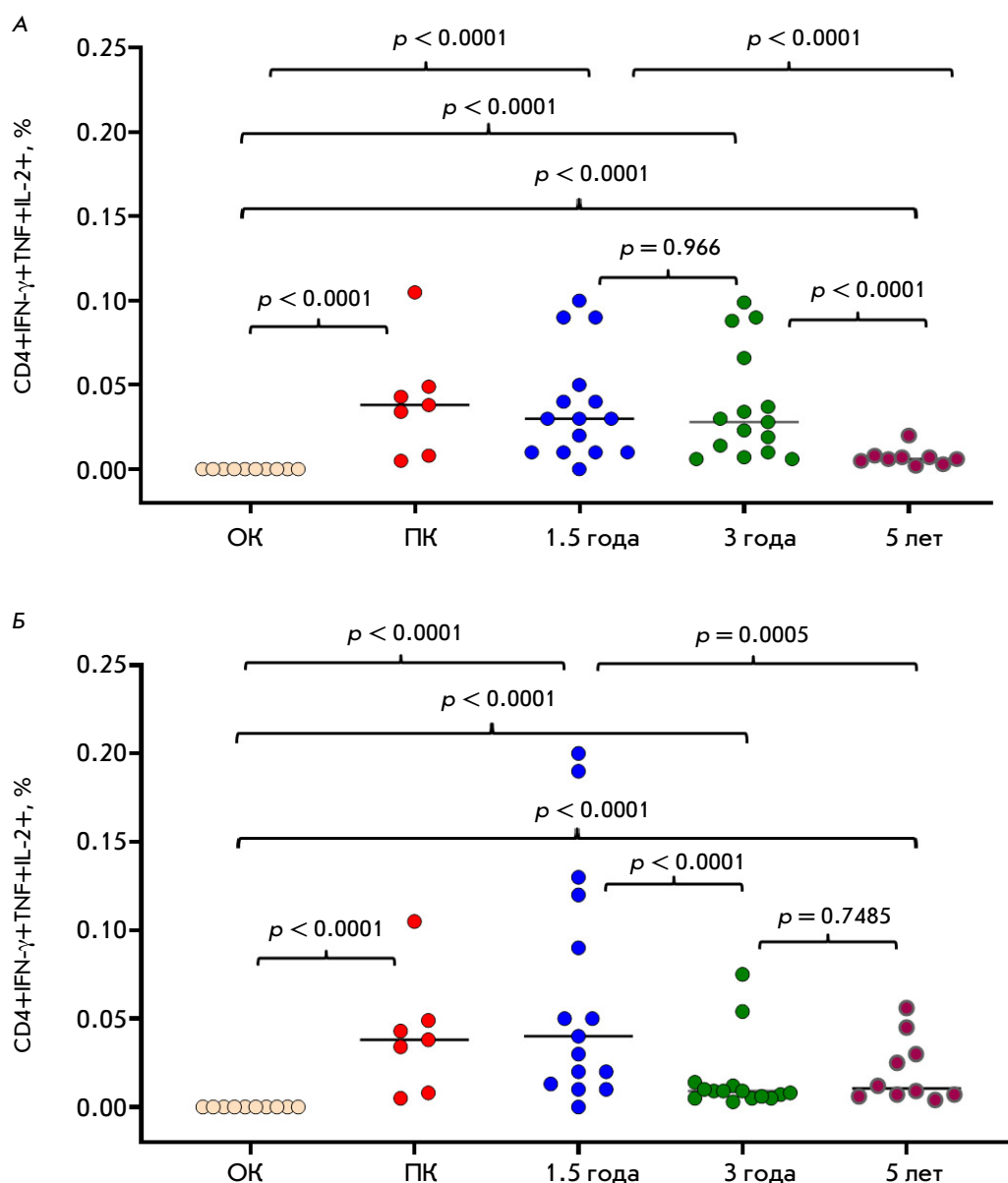


Рис. 6. Процентное содержание ВОВ-специфичных CD4+ Т-клеток, продуцирующих IFN- γ , TNF и IL-2, в образцах РВМС от добровольцев, вакцинированных противооспенной вакциной в рамках клинических исследований. А – группы добровольцев, привитых однократно внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ/0.2 мл; Б – группы добровольцев, привитых двукратно с интервалом 28 дней внутрикожно вакциной ОртопоксВак в дозе 10^6 ООЕ/0.2 мл. ОК – группа сравнения (отрицательный контроль) – добровольцы, не вакцинированные оспенными вакцинами, не имевшие контакта с пациентами, вакцинированными оспенными вакцинами, и не работавшие с вирусами рода ортопоксвирусов; ПК – группа положительного контроля – группа добровольцев, привитых двухэтапным методом Вакциной оспенной инактивированной ОспаВир и через 7 дней Вакциной оспенной живой на основе штамма Л-ИВП ВОВ (Микроген). Значимость различий между группами определяли по F-критерию. Каждая точка соответствует одному добровольцу

мя эпидемии оспой заболели 14% контактных, ранее не вакцинированных пациентов с титром ВНА к ВОВ $<1:20$, в то время как пациенты с титром ВНА $\geq 1:20$ оспой не заразились [18]. При этом следует отметить, что все вакцинированные ранее па-

циенты, в том числе с титром ВНА $<1:10$, не заражались оспой при контакте с больными. Защитный эффект инъекционного препарата противооспенного иммуноглобулина (vaccinia immune globulin) позволил сделать вывод о том, что даже низкий уровень

Таблица 1. Распределение специфичных к вирусу осповакцины полифункциональных CD4+ Т-клеток по экспрессии маркеров CCR7 (CD197) и CD45RA через 1.5 года после вакцинации противооспенными вакцинами

Группы	№ сыворотки крови	T _{CM} – клетки центральной памяти CCR7+CD45RA-	Наивные Т-клетки CCR7+CD45RA+	T _{EM} – клетки эффекторной памяти CCR7-CD45RA-	T _{EMRA} CCR7-CD45RA+
Группа «ОртопоксВак, 10 ⁷ однократно»	0-4-12	6.8±3.6	нд*	89.4±4.1	3.8±0.6
	0-4-17	7.5±0.5	1.7±0.8	28.0±1.0	62.8±1.8
	0-4-8	14.7±6.4	нд	85.3±6.4	нд
	0-4-15	8.2±0.3	нд	87.0±0.3	4.7±0.6
	0-4-3	5.3±0.2	0.6±0.8	85.2±3.1	8.9±4.1
	0-4-16	7.2±0.1	нд	92.5±0.7	нд
	0-4-10	5.9±2.6	нд	90.0±3.3	4.2±5.9
	0-4-11	6.0±2.9	нд	92.1±2.9	2.0±0.1
	0-4-13	9.1±0.5	нд	88.7±0.1	2.2±0.3
	0-4-14	4.2±5.9	нд	92.0±0.5	3.8±0.4
	0-4-1	6.1±2.1	0.5±0.7	88.1±0.3	5.3±1.1
	0-4-2	7.8±4.6	нд	89.9±1.4	2.3±3.2
	0-4-5	4.4±1.2	нд	91.2±4.1	4.4±2.9
	0-4-9	13.8±3.2	нд	84.2±3.2	2.0±0.1
	0-4-6	4.9±1.0	нд	93.1±2.0	2.1±2.9
Группа «ОртопоксВак, 10 ⁶ двукратно»	0-5-3	5.6±0.9	нд	88.8±1.8	5.6±0.9
	0-5-16	4.9±0.9	нд	85.3±2.2	9.8±1.1
	0-5-4	14.0±2.2	нд	84.9±3.7	1.1±0.1
	0-5-5	8.2±2.5	1.4±2.0	80.8±17.3	8.6±1.6
	0-5-6	3.8±1.4	нд	95.7±4.7	нд
	0-5-8	5.3±0.8	2.9±4.2	81.1±6.5	10.6±1.1
	0-5-9	8.8±2.3	0.3±0.4	87.3±2.1	3.6±2.1
	0-5-11	6.1±3.4	0.6±0.3	90.1±2.0	3.2±0.3
	0-5-12	7.6±6.4	нд	90.9±8.6	1.5±1.1
	0-5-17	12.7±0.8	1.3±1.9	84.8±2.3	1.1±0.1
	0-5-18	10.4±2.0	3.3±0.1	75.8±0.8	10.5±1.1
	0-5-1	6.8±0.8	нд	86.2±3.5	7.0±2.7
	0-5-2	7.3±0.4	1.0±0.1	91.2±0.4	0.5±0.7
	0-5-10	6.3±0.1	0.8±0.4	92.4±0.3	0.5±1.1
	0-5-7	9.5±2.1	0.4±2.1	86.0±1.5	2.0±2.8
Группа «положительный контроль»	0-2-34	6.3±1.3	5.3±0.9	77.1±3.2	11.4±1.2
	0-2-32	1.9±0.8	нд	93.1±1.1	5.1±2.3
	0-2-2	12.2±0.2	1.2±0.1	72.5±2.8	14.1±2.1
	0-2-3	9.0±2.7	2.2±0.1	59.6±1.6	29.3±3.3
	0-2-30	7.3±2.8	нд	90.9±5.4	1.9±0.6
	0-2-36	4.2±1.2	1.7±0.2	79.6±4.4	14.6±3.1

*Примечание: нд – не детектировали (ниже уровня чувствительности метода).

ВНА может обеспечивать достаточную степень защиты против оспы [19].

Протективный иммунитет к оспе обеспечивается не только ВНА, важную роль в защите от данной инфекции играет также клеточный иммунный ответ [15, 19–21]. Однако в период проведения мероприятий по ликвидации оспы методы анализа клеточно-

опосредованного иммунного ответа еще не были достаточно развиты, поэтому критерии протективного уровня Т-клеточного ответа на противооспенную вакцинацию до сих пор не определены [16, 22].

Т-клетки участвуют в ранней идентификации и подавлении вирусных инфекций, а также поддерживают выработку антител В-клетками. Эта

Таблица 2. Распределение специфичных к вирусу осповакцины полифункциональных CD4+ Т-клеток по экспрессии маркеров CCR7 (CD197) и CD45RA через 3 года после вакцинации противооспенными вакцинами

Группы	№ сыворотки крови	T _{CM} – клетки центральной памяти CCR7+CD45RA-	Наивные Т-клетки CCR7+CD45RA+	T _{EM} – клетки эффекторной памяти CCR7-CD45RA-	T _{EMRA} CCR7-CD45RA+
Группа «ОртопоксВак. 10 ⁷ однократно»	155	6.6±2.2	0.5±0.1	87.2±0.9	5.8±0.7
	158	5.8±3.0	нд*	91.6±6.7	2.6±0.6
	164	12.9±4.1	нд	87.1±4.1	нд
	166	7.5±1.0	нд	82.8±4.7	6.7±1.7
	199	7.0±0.2	0.6±0.2	86.9±0.1	5.6±0.1
	206	11.3±5.2	нд	86.8±6.1	1.9±0.9
	209	10.2±0.5	нд	86.4±1.5	1.3±1.8
	216	10.9±2.7	0.7±0.1	85.4±2.4	3.1±0.4
	222	10.8±2.2	нд	86.1±0.8	3.1±3.0
	223	14.2±1.9	1.7±0.6	82.3±4.0	1.8±2.5
	229	7.7±0.1	нд	54.6±0.5	36.7±0.4
	246	8.8±2.9	нд	87.9±7.5	3.3±1.6
	249	7.6±1.5	1.1±0.3	85.7±0.9	5.6±2.1
	246	11.0±1.0	0.8±1.1	85.6±5.4	2.7±0.5
	259	8.0±0.6	нд	89.7±1.4	2.3±0.7
Группа «ОртопоксВак. 10 ⁶ двукратно»	059	9.2±3.1	2.2±1.1	82.6±3.8	6.0±0.2
	089	3.5±4.9	нд	88.8±3.6	7.8±2.5
	095	6.1±1.2	2.6±0.7	89.6±0.1	1.7±0.3
	098	7.1±0.1	нд	92.4±9.4	0.1±0.1
	108	3.8±1.7	0.6±0.3	85.8±2.1	9.8±2.1
	106	8.0±0.2	нд	88.2±2.5	3.8±1.2
	105	6.0±1.3	1.1±0.4	90.6±1.2	2.3±0.1
	104	7.1±1.2	0.6±0.2	88.4±1.2	3.9±0.2
	103	9.0±2.8	нд	81.2±1.7	9.8±2.9
	178	4.1±3.2	0.9±0.3	87.6±4.9	7.4±2.4
	177	9.6±1.3	нд	90.8±9.3	2.6±0.1
	109	6.7±0.1	нд	86.4±1.8	6.8±1.8
	255	6.5±0.7	нд	90.5±0.7	3.0±0.1
	256	7.3±0.4	нд	91.8±0.4	2.0±0.1
	257	6.0±1.4	нд	93.9±7.1	2.5±1.3
Группа «положительный контроль»	BLV	7.1±1.6	0.5±0.7	90.5±3.9	1.9±0.5
	DGV	5.9±0.8	0.7±0.1	75.7±0.6	17.7±1.3
	RAS	5.0±0.1	0.4±0.5	79.3±2.9	15.3±2.4
	GTA	13.0±2.6	0.3±0.4	83.6±3.4	3.2±0.8
	FEN	7.7±2.9	нд	68.3±9.5	24.0±1.4
	NIN	9.8±1.6	2.9±1.2	87.2±1.4	нд
	LMP	7.9±1.7	3.7±0.1	67.1±1.6	21.3±3.4

*Примечание: нд – не детектировали (ниже уровня чувствительности метода).

центральная роль Т-клеток делает их важной мишенью для оценки иммунного ответа на инфекцию или вакцинацию.

Вакцина против оспы индуцирует устойчивые клеточно-опосредованные иммунные ответы со стороны CD4+ и CD8+ Т-клеток, популяции которых

достигают максимума через две–четыре недели после иммунизации, а затем сокращаются, сохраняя стабильные Т-клетки памяти [23, 24]. Следует отметить, что популяция CD8+ Т-клеток памяти снижается быстрее, чем популяция CD4+ Т-клеток памяти [25]. Потребность в CD4+ Т-клетках для за-

щиты очевидна, поскольку антитела, специфичные к ВОВ, не формируются у животных, лишенных CD4+ Т-клеток [26, 27]. Также CD4+ Т-клетки необходимы для оптимальной функции цитотоксических Т-лимфоцитов и формирования иммунологической памяти [28].

Основной трудностью доказательства эффективности новых противооспенных вакцин является невозможность напрямую продемонстрировать, что вновь созданные вакцины индуцируют защитный (протективный) иммунитет против оспы у людей. Так как натуральная оспа была ликвидирована, невозможно протестировать эффективность новых вакцин в отношении естественного заболевания. Вместо этого новые вакцины в клинических испытаниях должны тестироваться по доступным параметрам и сравниваться с ранее используемыми в период ликвидации оспы противооспенными вакцинами первого поколения [16, 23].

11 ноября 2022 года Министерство здравоохранения Российской Федерации зарегистрировало первую в мире противооспенную аттенуированную вакцину четвертого поколения ОртопоксВак (Вакцина для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций на основе вируса осповакцины живая культуральная). Эта вакцина получена с использованием штамма Л-ИВП ВОВ, применяемого в России в качестве противооспенной вакцины первого поколения (Вакцина оспенная живая) [2, 11], в геноме которого методами генетической инженерии направленно инактивированы гены, кодирующие гамма-интерферонсвязывающий белок (B8R), комплементсвязывающий белок (C3L), Bcl-2-подобный ингибитор апоптоза (N1L), гематоглиутинин (A56R), тимидинкиназу (J2R) и ген A35R, белковый продукт которого ингибирует представление антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II, иммунное праймирование Т-лимфоцитов и последующий синтез хемокинов и цитокинов. Созданный штамм ВОВ получил название VACΔ6 [11]. При проведении комплекса доклинических испытаний [29], а затем КИ фаз I и II/III было показано, что вакцина ОртопоксВак является слабо реактогенным и безопасным препаратом, иммунологическая активность которого сопоставима с активностью используемой в России противооспенной вакцины первого поколения.

Значения GMT ВНА в сыворотках крови добровольцев на 60, 90 и 180 сутки после двукратной иммунизации вакциной ОртопоксВак в дозе 10^6 ООЕ составили 79.4, 75.9 и 69.2. После однократного введения ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ данные показатели были 138.0, 31.7 и 31.6 соответственно. Значения GMT ВНА в сыворотках крови добро-

вольцев, привитых двухэтапным методом вакциной первого поколения, составляли в те же временные периоды 104.7, 52.5 и 63.1.

Как видим, постепенное снижение титров ВНА наблюдалось в течение 6 месяцев во всех изученных группах вакцинированных добровольцев.

Следует отметить, что ОртопоксВак имеет более высокую иммуногенность по сравнению с получившей широкое распространение в последние годы противооспенной вакциной третьего поколения MVA [30]. Эта аттенуированная вакцина является реплицирующейся в организме человека и поэтому для достижения удовлетворительного иммунного ответа вводится двукратно в высокой дозе. В клиническом исследовании было показано, что в сыворотках крови двух групп добровольцев после двукратной иммунизации препаратами жидкой или лиофильно высушенной форм MVA на 14 сут после второй инъекции значения GMT ВНА составили 45.2 и 77.6 соответственно, а на 180 сут снизились до 10.2 и 11.7 соответственно [31].

Согласно действующим в России методическим указаниям «Проведение вакцинопрофилактики натуральной оспы. МУ 3.3.1.2044-06» очередную ревакцинацию вакциной первого поколения людей из групп риска, кроме непосредственно работающих с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян, проводят через 5 лет. Работавших с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян ревакцинируют через 3 года.

Учитывая измененную генетическую программу штамма ВОВ VACΔ6 по сравнению с исходным штаммом Л-ИВП, важное значение имело изучение длительности и напряженности поствакцинального иммунного ответа у лиц, иммунизированных вакциной ОртопоксВак. В процессе выполненных ранее КИ развитие гуморального иммунного ответа оценивали лишь в течение 6 месяцев после вакцинации, продукцию ВОВ-специфичных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов при этом не измеряли. Нами оценены уровни гуморального и Т-клеточного ответа на внутрикожное введение ОртопоксВак через 1.5 и 3 года у добровольцев II/III фаз КИ и через 5 лет у добровольцев I фазы КИ в сравнении с лицами, привитыми оспенной вакциной первого поколения.

Для оценки гуморального иммунного ответа использовали общепринятые методики: определение титра специфических антител в ИФА и в реакции нейтрализации ВОВ на культуре клеток.

Оценка титров ВОВ-специфичных антител в ИФА (рис. 3) выявила значительные индивидуальные различия между добровольцами в каждой из сравниваемых групп, что соответствует опубликованным данным и может быть обусловлено поли-

морфизмом генов, связанных с функционированием иммунной системы пациентов [13, 32, 33]. Важно отметить, что выраженный ВОВ-специфичный гуморальный ответ регистрировался и через 3 года и через 5 лет после иммунизации как вакциной первого поколения, так и созданной вакциной четвертого поколения ОртопоксВак. При этом достоверных различий между сравниваемыми группами не выявлено.

После 1.5 лет от момента иммунизации вакциной ОртопоксВак у части пациентов происходило снижение титров ВНА (рис. 4А,Б). При этом следует отметить, что при иммунизации ОртопоксВак в дозе 10^7 ООЕ достоверных различий между группами во временных точках 1.5, 3 года и 5 лет не наблюдали (рис. 4А), а в группах, вакцинированных двукратно в дозе 10^6 ООЕ, уровень титров ВНА после 1.5 лет достоверно снижался (рис. 4Б).

Различия в проценте добровольцев с титром ВНА $>1:10$ в точках 3 года и 5 лет после вакцинации обусловлены тем, что в эти группы входят разные добровольцы, принявшие участие в КИ II/III фаз и I фазы соответственно.

Цитометрические исследования препаратов РВМС вакцинированных добровольцев через 1.5 года после иммунизации показали наличие специфичных к ВОВ Т-клеток как Т-хелперов (CD4+), так и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+). При этом клеточно-опосредованный иммунный ответ Т-хелперов был более выражен, чем цитотоксических Т-лимфоцитов. Уровни CD8+ клеток в обеих группах добровольцев, иммунизированных ОртопоксВак, достоверно превышали показатели в группе положительного контроля (рис. 5), что, по-видимому, обусловлено различиями в генетических программах рекомбинантного VACΔ6 и исходного штамма Л-ИВП ВОВ.

Вакцина ОртопоксВак через 1.5 года после вакцинации индуцировала эффективный Т-хелперный клеточный иммунный ответ к ортопоксвирусам независимо от дозы и схемы применения (рис. 6).

При изучении внутриклеточных цитокинов после костимуляции аттенуированным штаммом VACΔ6 ВОВ препаратов РВМС добровольцев, привитых

как вакциной первого поколения, так и вакциной четвертого поколения, через 3 года выявили специфичные к вирусу Т-клеточные иммунные ответы только со стороны Т-хелперов. Специфичные к ВОВ цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+) детектировали только у одного добровольца после двукратного применения ОртопоксВак в дозе 10^6 ООЕ.

Специфичные к ВОВ Т-хелперы детектировали как через 3 года, так и через 5 лет после вакцинации ОртопоксВак, однако интенсивность клеточно-опосредованного иммунного ответа варьировала в зависимости от дозы и схемы применения. Т-хелперный ответ на иммунизацию добровольцев вакциной ОртопоксВак однократно в дозе 10^7 ООЕ сохранялся на относительно высоком уровне в течение 3 лет, а затем значительно снижался. При иммунизации пациентов этой же вакциной, но двукратно в дозе 10^6 ООЕ резкое снижение уровня Т-хелперов детектировали после 1.5 лет (рис. 6). Специфичные Т-клетки в основном имели фенотип эффекторных клеток памяти (табл. 1, 2), что указывает на активное взаимодействие с антигеном.

Процент добровольцев с клеточно-опосредованным иммунным ответом к ВОВ после применения противооспенной вакцины четвертого поколения ОртопоксВак составил 100% как через 3 года, так и через 5 лет независимо от использованной дозы и схемы применения.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что вакцина ОртопоксВак при ее внутрикожном однократном введении в дозе 10^7 ООЕ обеспечивает выраженный специфичный гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ в течение не менее 3 лет. Для выбора схемы ревакцинации вакциной ОртопоксВак с целью достижения более продолжительного протективного иммунитета против ортопоксвирусных инфекций необходимы дополнительные клинические исследования. ●

Работа выполнена в рамках государственного задания ГЗ-1/24 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (номер государственного учета НИР Рег. № 124030100120-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.
2. Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. // Viruses. 2023. V. 15. P. 103. <https://doi.org/10.3390/v15010103>
3. Simon W.L., Salk H.M., Ovsyannikova I.G., Kennedy R.B., Poland G.A. // Immunotherapy. 2014. V. 6(10). P. 1097–1112. <https://doi.org/10.2217/imt.14.72>
4. Shchelkunov S.N. // PLoS Pathog. 2013. V. 9. e1003756. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756>
5. Zhu M., Ji J., Shi D., Lu X., Wang B., Wu N., Wu J., Yao H., Li L. // Front. Med. 2022. V. 16. P. 507–517. <https://doi.org/10.1007/s11684-022-0952-z>
6. Kumar S., Guruparan D., Karuppanan K., Kumar K.J.S. // Pathogens. 2024. V. 14. P. 1. <https://doi.org/10.3390/pathogens14010001>
7. Shchelkunov S.N. // Vaccine. 2011. V. 29 (Suppl. 4). P. D49–

- D53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.037>
8. Olson V.A., Shchelkunov S.N. // *Viruses*. 2017. V. 9. P. e242. <https://doi.org/10.3390/v9090242>
9. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. P. 113–121.
10. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A., Shulgina I.S., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Kiselev D.N., Karpenko L.I., Shchelkunova G.A., Sergeev A.A. // *Acta Naturae*. 2024. V. 16. P. 82–89. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27384>
11. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 466. P. 35–38. <https://doi.org/10.1134/S1607672916010105>
12. Perekrest V.V., Movsesyants A.A., Mukhacheva A.V., Shevtsov V.A., Shvedov D.V., Borisevich I.V. // *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. 2013. № 2. P. 4–13.
13. Ермилова О.С., Гинько З.И., Белявская В.А., Кузубов В.И., Сергеев А.А., Горбатовская Д.О., Азаев М.Ш., Агафонов А.П., Воевода М.И., Сергеев А.Н. // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015. № 1. С. 75–78. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-1-75-78>
14. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. // *Viruses*. 2020. V. 12(8). P. 795. <https://doi.org/10.3390/v12080795>
15. Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // *Acta Naturae*. 2020. V. 12(1). P. 33–41. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10935>
16. Moss B. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 239. P. 8–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x>
17. Mack T.M., Noble J.Jr., Thomas D.B. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1972. V. 21(2). P. 214–218. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1972.21.214>
18. Sarkar J., Mitra A., Mukherjee M. // *Bull. World Health Organ.* 1975. V. 52(3). P. 307–311.
19. Hammarlund E., Lewis M.W., Hansen S.G., Strelow L.I., Nelson J.A., Sexton G.J., Hanifin J.M., Slifka M.K. // *Nat. Med.* 2003. V. 9. P. 1131–1137. <https://doi.org/10.1038/nm917>
20. Hammarlund E., Lewis M.W., Hanifin J.M., Mori M., Koudelka C.W., Slifka M.K. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 12754–12760. <https://doi.org/10.1128/JVI.01763-10>
21. Kunasekaran M.P., Chen X., Costantino V., Chughtai A.A., MacIntyre C.R. // *Mil. Med.* 2019. V. 184. P. e668. <https://doi.org/10.1093/milmed/usz181>
22. Francis A. Ennis, John Cruz, Walter E. Demkowicz, Jr., Alan L. Rothman, David J. McClain // *J. Infect. Dis.* 2002. V. 185. P. 1657–1659. <https://doi.org/10.1086/340517>
23. Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. // *Antiviral Res.* 2009. V. 84. P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.06.006>
24. Amanna I.J., Slifka M.K., Crotty S. // *Immunol. Rev.* 2006. V. 211. P. 320–337. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00392.x>
25. Amara R.R., Nigam P., Sharma S., Liu J., Bostik V. // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 3811–3816. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.8.3811-3816.2004>
26. Xu R., Johnson A.J., Liggitt D., Bevan M.J. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. P. 6265–6271. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6265>
27. Edghill-Smith Y., Bray M., Whitehouse C.A., Miller D., Mucker E., Manischewitz J., King L.R., Robert-Guroff M., Hryniewicz A., Venzon D., et al. // *J. Infect. Dis.* 2005. V. 191. P. 372–381. <https://doi.org/10.1086/427265>
28. Sun J.C., Bevan M.J. // *Science*. 2003. V. 300. P. 339–342. <https://doi.org/10.1126/science.1083317>
29. Щелкунов С.Н., Якубицкий С.Н., Нестеров А.Е., Колосова И.В., Сергеев А.А., Зайковская А.В., Кабанов А.С., Нечаева Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В. и др. // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022. Т. 21(6). С. 34–47. <https://doi.org/10.31631/2073-346-2022-21-6-34-47>
30. Volz A., Sutter G. // *Adv. Virus Res.* 2017. V. 97. P. 187–243. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.07.001>
31. Frey S.E., Wald A., Edupuganti S., Jackson L.A., Stapleton J.T., El Sahly H., El-Kamary S.S., Edwards K., Keyserling H., Winokur P., et al. // *Vaccine*. 2015. V. 33. P. 5225–5234. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.075>
32. Benhnia M.R., McCausland M.M., Su H., Singh K., Hoffmann J., Davies D.H., Felgner P.L., Head S., Sette A., Garboczi D.N., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 3751–3768. <https://doi.org/10.1128/jvi.02244-07>
33. Moutafts M., Tscharke D.C., Vaughan K., Koelle D.M., Stern L., Calvo-Calle M., Ennis F., Terajima M., Sutter G., Crotty S., et al. // *Future Microbiol.* 2010. V. 5. P. 221–239. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.110>

УДК 577.164.187.9

Тест-система для изучения транспорта биотина при инактивации гена *SLC5A6*

А. Ю. Руденко^{1,2*}, П. А. Зотова^{1,3}, О. А. Аверина¹, А. В. Приймак^{1,2}, М. П. Рубцова^{3,4},
С. С. Марьясина^{1,2,3,5}, Р. М. Ожиганов^{1,6}, О. А. Донцова^{1,3,4,7}, П. В. Сергиев^{1,3,7}

¹Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва, 119192 Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119192 Россия

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

⁵Институт фармации и биотехнологии РУДН, Москва, 117198 Россия

⁶Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Высший химический колледж Российской академии наук, Москва, 125190 Россия

⁷Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколтех, Москва, 121205 Россия

*E-mail: RudenkoAY@my.msu.ru

Поступила в редакцию 27.02.2025

Принята к печати 21.05.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27645

РЕФЕРАТ Представлена тест-система для изучения транспорта биотина при инактивации гена *SLC5A6*, кодирующего натрий-зависимый поливитаминовый транспортер *SLC5A6*. Цель работы состоит в разработке метода оценки эффективности проникновения биотина через клеточную мембрану при инактивации гена *SLC5A6*, а также в изучении возможности *SLC5A6*-независимой доставки производных биотина в клетки. Тест-система основана на использовании модифицированных клеточных линий HEK293, сверхэкспрессирующих биотинлигазу BirA*. Одна линия содержит функциональный ген *SLC5A6*, в другой линии этот ген инактивирован для имитации нарушения транспорта биотина. С использованием разработанной тест-системы изучен транспорт через клеточную мембрану биотина, а также двух его производных: конъюгата биотина с *n*-аминофенилаланином (Bio-1) и метилового эфира биотина (Bio-2). Установлено, что биотин и его метиловый эфир (Bio-2) способны проникать в клетки независимо от транспортера *SLC5A6*, что указывает на существование альтернативных путей транспорта. Производное биотина с *n*-аминофенилаланином (Bio-1) проникает в клетки только через hSMVT. Разработанная тест-система является новым инструментом для изучения путей поступления витаминов в клетки и разработки терапевтических стратегий для пациентов с мутацией гена *SLC5A6*, а также генов других транспортеров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биотин, *SLC5A6*, hSMVT, транспорт биотина, клеточная мембрана, тест-система, производные биотина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Strep-HRP – стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена; *SLC5A6* или SMVT – натрий-зависимый поливитаминовый транспортер; BirA* – мутантная биотинлигаза *E. coli* (BirA R118G); PBS – фосфатно-солевой буфер; GFP – зеленый флуоресцентный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Ген *SLC5A6*, расположенный в локусе 2p23.3 хромосомы 2 человека, кодирует мембранный натрий-зависимый поливитаминовый транспортер

(Sodium-dependent MultiVitamin Transporter, SMVT). У человека белок hSMVT состоит из 635 аминокислотных остатков и играет ключевую роль в переносе водорастворимых соединений: биотина,

пантотеновой кислоты и альфа-липоевой кислоты [1]. Белок SMVT высококонсервативен у различных видов и широко представлен в организме. Наиболее активно он экспрессируется в кишечном эпителии и эндотелиальных клетках капилляров мозга [2, 3], а также участвует в переносе биотина и пантотеновой кислоты через гематоэнцефалический барьер [4]. Функционирование SMVT критически важно для нормального роста и развития млекопитающих, в том числе человека, поскольку биотин и пантотеновая кислота клетками млекопитающих не синтезируются, а поступают в организм только через кишечник [5, 6]. Биотин, служащий кофактором пяти карбоксилаз, принимает участие в различных метаболических процессах, включая синтез жирных кислот, глюконеогенез и катаболизм аминокислот [7]. Также биотин влияет на регуляцию экспрессии генов, пролиферацию и выживание клеток [8, 9]. Пантотеновая кислота является ключевым компонентом биосинтеза кофактора А и синтеза жирных кислот, которые, в свою очередь, необходимы для энергетического обмена и синтеза гормонов [10].

Исследования на мышах *in vivo* показали, что при инактивации гена *Slc5a6* в клетках кишечника наблюдаются задержка роста, снижение плотности костной ткани и уменьшение длины костей, а также изменения в тонком кишечнике (укорочение ворсинок, дисплазия) и слепой кишке (хроническое воспаление, дисплазия) [6]. Терапия повышенными дозами биотина и пантотеновой кислоты предотвращает задержку роста и воспаление кишечника [11].

Биаллельные мутации гена *SLC5A6* идентифицированы у детей с задержкой роста и развития, судорогами, а также с нарушениями со стороны желудочно-кишечного тракта, кожи и периферической нервной системы, а также с иммунодефицитом, вызванным нарушением функции Т- и В-клеток [12–18]. Эти дети умирали в младенчестве, при этом целенаправленное лечение носителей мутаций в гене *SLC5A6* витаминами приводило к клиническому улучшению их состояния [13–15, 18].

Так, полное секвенирование экзона 15-месячного мальчика с задержкой развития, микроцефалией, выраженным иммунодефицитом и тяжелым гастроэзофагеальным рефлюксом выявило у него мутацию в гене *SLC5A6*. В возрасте 19 месяцев ребенку была назначена витаминная терапия высокими дозами биотина (10 мг/день, затем 30 мг/день), пантотеновой кислоты (250 мг/день, затем 500 мг/день) и липоевой кислоты (150 мг/день, затем 300 мг/день), в возрасте 24 месяца доза витаминов была увеличена. После 14 месяцев терапии у ребенка нормализовались уровни иммуноглобулинов и не наблюдалось нарушений со

стороны костной системы. Аналогичное клиническое улучшение отметили и у других детей, получавших высокие дозы биотина [19, 20].

Как показал анализ опубликованных данных, в работах, связанных с применением витаминов, не оценивается эффективность их всасывания, распределения и метаболизма. Существует очень ограниченный набор методов оценки эффективности проникновения витаминов через мембрану. В большинстве случаев для этого используется биотин, меченный изотопами трития или углерода-14 [21]. Этот подход обеспечивает высокую чувствительность обнаружения и количественную оценку распределения биотина, однако для работы с радиоактивными материалами требуется специальное оборудование. Кроме того, этот метод не позволяет оценить проникновение через мембрану производных биотина, которые, как правило, не несут радиоактивной метки. Для количественной оценки биотина используется также масс-спектрометрический анализ, но для этого метода также требуется сложное аналитическое оборудование и проведение трудоемких процедур.

Цель данной работы состояла в разработке метода оценки эффективности проникновения биотина через клеточную мембрану при инактивации гена *SLC5A6*. Также оценили принципиальную возможность *SLC5A6*-независимой доставки производных биотина в клетки, что может открыть новые перспективы для лечения пациентов с мутациями в гене *SLC5A6*.

Нами разработана тест-система, которая позволяет оценить эффективность проникновения биотина через клеточную мембрану при инактивации гена *SLC5A6*. Эта система основана на блоттинге клеточных белков, несущих биотин, с помощью конъюгата стрептавидина и пероксидазы хрена. При этом для искусственного повышения уровня биотинилирования используется мутантная форма биотинлигазы BirA со сниженной специфичностью.

Тест-система состоит из модифицированных клеточных линий HEK293, сверхэкспрессирующих биотинлигазу BirA*. Одна из линий содержит функциональный ген *SLC5A6*, в другой линии этот ген инактивирован. Инактивация гена *SLC5A6* используется для имитации состояния, когда транспорт биотина через hSMVT нарушен. Эктопическая экспрессия биотинлигазы вызывает неспецифическое биотинилирование белков в клетке, которое можно обнаружить с помощью вестерн-блоттинга. Сравнение уровня биотинилирования белков в этих клеточных линиях после инкубации с биотином или его производными позволяет детектировать транспорт биотина через клеточную мембрану.

С использованием разработанной системы изучили механизм транспорта через клеточную мембрану биотина и двух его производных: конъюгата биотина с *n*-аминофенилаланином (Bio-1) и метилового эфира биотина (Bio-2).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез олигонуклеотидов

Все олигонуклеотиды (праймеры) синтезированы ООО «Люмипроуб РУС» (Россия).

Культивирование клеток

Клетки HEK293 дикого типа (WT), а также модифицированные (BirA*, Δ SLC5A6 и BirA*_ Δ SLC5A6) культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% (v/v) эмбриональной телячьей сыворотки (FBS HI, Gibco), 1% (v/v) *L*-аланин-*L*-глутамин (2 mM, GlutaMAX, Gibco), 1% (v/v) смеси антибиотиков (100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, Gibco) при температуре 37°C и 5% CO₂. Клетки выращивали в культуральных флаконах для адгезивных клеток (25 см²). При достижении 90–100% конфлюентности клетки пересеивали в соотношении 1 : 10, промывали раствором PBS, затем отделяли с помощью раствора трипсин-EDTA (1×, Gibco) в PBS и ресуспендировали нужное количество клеток в свежей среде. Для экспериментов клетки культивировали в 24-луночных планшетах.

Внедрение гена BirA*

Для получения клеток с повышенным уровнем биотинилирования белков в клетки вводили мутантную биотинлигазу *E. coli* BirA^{R118G} (обозначена BirA*). С целью отбора клеток, ген BirA* вводили совместно с геном *eGFP*, кодирующим зеленый флуоресцентный белок медузы, оптимизированный под клетки млекопитающих. Для встраивания генов BirA* и *eGFP* использовали плазмиду pSBbi-GN_BirA*, сконструированную нами ранее [22] на основе вектора pSBbi-GN (Addgene #60517) [23].

Плазмидой pSBbi-GN_BirA* совместно с плазмидой pCMV(CAT)T7-SBX100 [24], кодирующей транспозазу, трансфицировали клетки HEK293 дикого типа (WT) с помощью Lipofectamine 3000 согласно инструкции производителя. Через 24 ч клетки, продуцирующие белки BirA* и *eGFP*, отбирали с помощью сортера FACS Aria III BD, регистрируя сигнал при длинах волн 488/530 нм. Отобранные клетки высевали в 96-луночные планшеты (200 мкл среды на лунку), после чего отдельные клоны культивировали в 24-луночных планшетах. Полученные моноклональные клетки стабильно экспрессировали BirA* и GFP.

Инактивация гена SLC5A6

Ген SLC5A6 в клеточных линиях WT и BirA* инактивировали с использованием системы CRISPR-Cas9. Последовательности гидовой РНК (sgRNA) для внесения разреза выбирали с помощью инструмента проектирования sgRNA Benchling CRISPR (<https://benchling.com>). Подобрали гидовую РНК к экзону 8 гена SLC5A6 (5'-GCGGTACCTCAGTTCCCGCA-3').

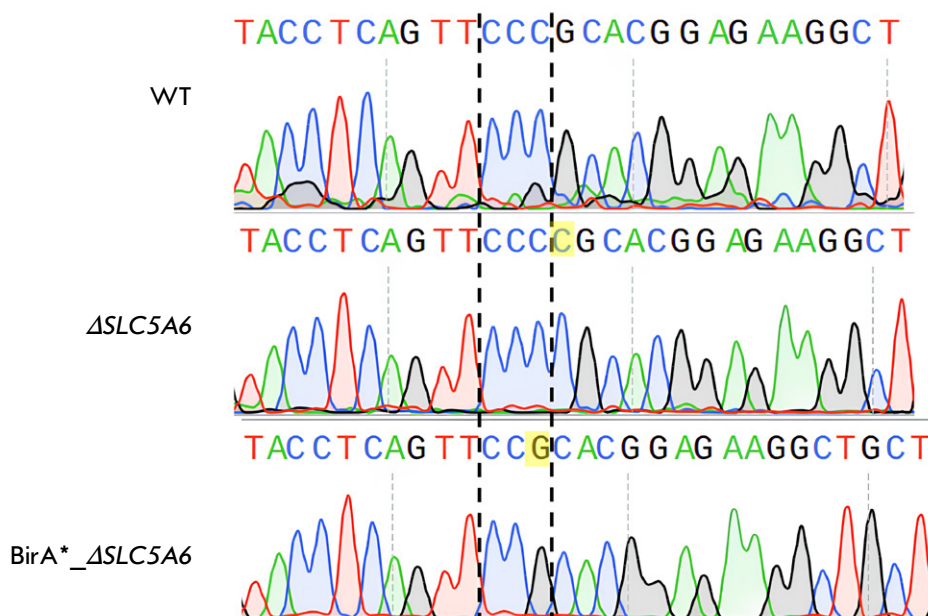
Генетическая конструкция для инактивации (pX459-SLC5A6) была создана на основе плазмиды pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459 V2.0, Addgene #62988 [25]), кодирующей компоненты системы CRISPR/Cas9 и содержащей ген устойчивости к пуромицину. Плазмиду предварительно разрезали эндонуклеазой BpiI для получения липких концов.

Последовательность, кодирующую гидовую РНК, получали из двух ДНК-олигонуклеотидов (5'-CACCGCGGTACCTCAGTTCCCGCA-3' и 5'-AA-CTGCGGGAAGTGAAGTACCGC-3'), образующих после гибридизации липкие концы (4 нуклеотида), комплементарные липким концам на векторе pX459. Олигонуклеотиды гибридизовали в буфере для Т4-ДНК-лигазы (Thermo Scientific, США), добавляя их до концентрации 1 мкМ каждого, после чего инкубировали при 95°C в течение 5 мин и постепенно охлаждали до 30°C в закрытом термостате. Полученный дуплекс (1 мкл) лигировали по липким концам в вектор pX459 с помощью набора Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher, США).

Компетентные клетки *E. coli* штамма JM109 трансформировали лигазной смесью, после чего колонии культивировали на чашках с ампициллином (50 мкг/мл). Из ночных культур выделяли плазмидную ДНК, используя набор Plasmid Miniprep («Евроген», Россия). Правильность вставки проверяли секвенированием по Сэнгеру с использованием праймера на промотор U6 (5'-GACTATCATATGCTTACCGT-3').

Для создания клеточных линий с нокаутом определенных генов клетки трансфицировали плазмидой pX459-SLC5A6 с использованием реагента Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen™: L3000001). Для трансфекции использовали 100 000 клеток, 1 мкг плазмиды и 1.5 мкл липофектамина. Через 24 ч среду культивирования заменяли свежей средой с пуромицином (1 мкг/мл). Одновременно с этим на среде с пуромицином инкубировали контрольные клетки HEK293 дикого типа и через 48 ч регистрировали гибель 100% контрольных клеток. Клетки, получившие плазмиду pX459-SLC5A6, высевали в 96-луночные планшеты (200 мкл среды на лунку), после чего отдельные клоны культивировали в 24-луночных планшетах.

Рис. 1. Инактивация гена *SLC5A6* в клетках линии HEK293. Показаны результаты секвенирования по Сэнгеру ПЦР-амплифицированного целевого локуса гена *SLC5A6* из клеток дикого типа (WT), клеток с нокаутом (Δ *SLC5A6*, инсерция 1 п.н.) и клеток со вставкой конструкции BirA* (*BirA**_ Δ *SLC5A6*, делеция 1 п.н.)



Для генотипирования полученных моноклональных линий из клеток выделяли суммарную ДНК (QuickExtract DNA Extraction Solution, Lucigen). Далее амплифицировали с помощью ПЦР участки в области предполагаемого разреза (праймеры для ПЦР: 5'-СТТСТГГАСТТГГСТТТСТГГ-3' и 5'-GACСТТГСТССТТСТССТТС-3'). Наличие мутации, приводящей к инактивации гена *SLC5A6*, проверяли методом секвенирования амплифицированных фрагментов по Сэнгеру (рис. 1). В результате для дальнейшей работы были отобраны линии клеток с нарушенной рамкой считывания *SLC5A6*: в линии Δ *SLC5A6* выявлена инсерция 1 п.н., в линии *BirA**_ Δ *SLC5A6* – делеция 1 п.н.

Синтез Bio-1

Биотин (1.74 г, 7.13 ммоль), HATU (2.71 г, 7.13 ммоль), DIPEA (2.49 мл, 14.27 ммоль) растворяли в 15 мл безводного DMF при помощи ультразвука. Отдельно готовили раствор 4-аминофенилаланина (2 г, 7.13 ммоль) в 5 мл DMF. Раствор биотина добавляли при перемешивании к раствору аминокислоты при помощи шприцевого насоса в течение 1 ч, после чего DMF удаляли в вакууме. К остатку при перемешивании приливали 100 мл воды и оставляли на 1 ч для формирования осадка. Осадок отфильтровывали, промывали H₂O (2 × 100 мл) и высушивали на воздухе. Получали продукт 2, серого цвета (3.1 г, 86%).

¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-*d*₆) δ = 9.8 (s, 1H), 7.5 (d, *J* = 8.0, 2H), 7.1 (d, *J* = 8.0, 2H), 7.0 (d, *J* = 8.3, 1H),

6.4 (s, 1H), 6.4 (s, 1H), 4.3 (t, *J* = 6.8, 1H), 4.3–4.1 (m, 1H), 4.1–4.0 (m, 1H), 3.2–3.1 (m, 1H), 3.0–2.9 (m, 1H), 2.9–2.7 (m, 2H), 2.6 (d, *J* = 12.4, 1H), 2.3 (t, *J* = 7.1, 2H), 1.7–1.5 (m, 3H), 1.5–1.5 (m, 1H), 1.4–1.3 (m, 1H), 1.3 (s, 9H), 1.3–1.2 (m, 1H). ¹³C-ЯМР (151 МГц, DMSO-*d*₆) δ = 173.8, 173.6, 171.0, 162.7, 155.4, 137.7, 132.5, 129.3, 118.9, 78.0, 61.1, 59.2, 55.4, 55.3, 36.2, 35.9, 28.2, 28.2, 28.1, 25.2.

Продукт 2, полученный в предыдущей реакции (3 г, 5.9 ммоль), растворяли в 4 М HCl/диоксан (60 мл). Реакционную массу перемешивали в течение 5 ч, что приводило к образованию взвеси. Осадок отфильтровывали, промывали Et₂O

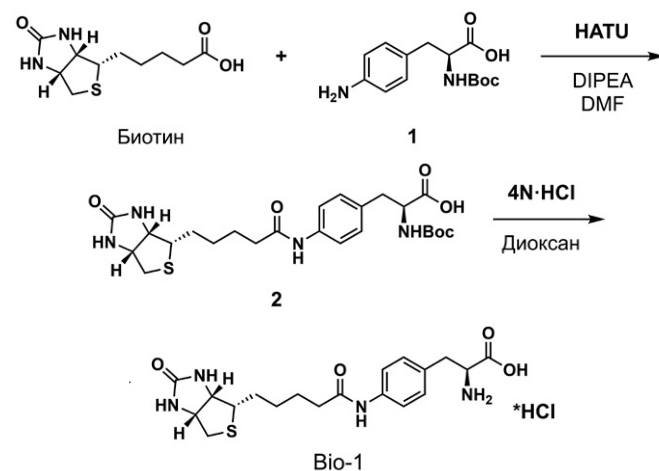


Схема 1. Синтез соединения Bio-1

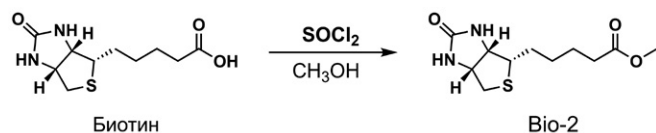


Схема 2. Синтез соединения **Bio-2**

(2 × 50 мл) и сушили на воздухе, получая бесцветный гидрохлорид **Bio-1** (2.6 г, 98%).

¹H-ЯМР (600 МГц, D₂O) δ = 7.4 (d, J=8.1, 2H), 7.3 (d, J = 8.1, 2H), 4.6–4.5 (m, 1H), 4.4 (dd, J = 8.0, 4.5, 1H), 4.3 (t, J = 6.7, 1H), 3.4–3.3 (m, 2H), 3.2 (dd, J = 14.8, 7.7, 1H), 3.0 (dd, J = 13.0, 4.8, 1H), 2.7 (d, J = 13.0, 1H), 2.4 (t, J = 7.3, 2H), 1.7 (tt, J = 14.8, 7.1, 3H), 1.6–1.5 (m, 1H), 1.5–1.4 (m, 2H). **¹³C-ЯМР** (151 МГц, D₂O) δ = 176.4, 171.9, 165.9, 137.1, 131.6, 130.8, 123.2, 62.7, 60.9, 56.0, 54.6, 40.3, 36.8, 35.7, 28.5, 28.3, 25.7.

Синтез Bio-2

Биотин (1 г, 4.1 ммоль) растворяли в 20 мл метанола, охлаждали до 0°C и по каплям добавляли тионилхлорид (2 мл, 20 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 10 ч, растворитель удаляли в вакууме. Остаток нейтрализовали 1 М NaHCO₃. Осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили на воздухе, получая после перекристаллизации из ацетона **Bio-2** (939 мг, 91%).

Спектральные данные **Bio-2** соответствовали описанным ранее [26].

¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-*d*₆) δ = 6.4 (s, 1H), 6.4 (s, 1H), 4.4–4.3 (m, 1H), 4.2–4.1 (m, 1H), 3.6 (s, 3H), 3.2–3.0 (m, 1H), 2.8 (dd, J = 12.4, 5.1, 1H), 2.6 (d, J = 12.4, 1H), 2.3 (t, J = 7.5, 2H), 1.7–1.4 (m, 4H), 1.4–1.2 (m, 2H). **¹³C-ЯМР** (151 МГц, DMSO-*d*₆) δ = 173.3, 162.7, 61.0, 59.2, 55.3, 51.2, 39.8, 33.1, 28.1, 28.0, 24.5.

Вестерн-блоттинг

Оптимальную концентрацию биотина, обеспечивающую эффективное биотинилирование белков, определяли путем тестирования на клеточных линиях HEK293 WT, BirA*, ΔSLC5A6 и BirA*_ΔSLC5A6. Клетки каждой линии высевали в 24-луночный планшет и инкубировали в течение 24 ч. Затем в культуральную среду добавляли водный раствор биотина в соответствующей концентрации либо контрольный раствор (вода). Клетки инкубировали в течение еще 24 ч в присутствии биотина. После этого клетки лизировали на льду с использованием RIPA-буфера, содержащего бензоназу (Sigma, США), в течение 15 мин, а затем фермент инактивировали нагреванием при 80°C в течение 3 мин.

Разведенные лизаты, нормированные по содержанию общего белка, анализировали методом ве-

стерн-блоттинга. Белки разделяли электрофорезом в 10% полиакриламидном геле с 0.1% SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью мокрого переноса (1 ч при 400 мА). Мембрану блокировали в 5% растворе обезжиренного сухого молока [27] в TBST (1–12 ч), затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с раствором стрептавидин-пероксидазного конъюгата (1:3000 в TBST, «ИМТЕК», Р-S Avs, Россия). После нескольких отмывок TBST (3 раза по 5 мин), TBS (3 раза по 5 мин) и дистиллированной водой проводили детекцию с использованием субстрата Clarity™ Western ECL (Bio-Rad).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние функциональной активности мультивитаминного транспортера SLC5A6 на способность клеток в культуре интернализировать биотин из внешней среды анализировали на клеточной линии эмбриональной почки человека HEK293. В этой линии клеток мы инактивировали ген *SLC5A6* с помощью системы CRISPR/Cas9, получив таким образом линию клеток Δ*SLC5A6*.

Транспортер SLC5A6 не нужен для поддержания в биотинилированном состоянии биотин-зависимых карбоксилаз в клеточной линии HEK293

Чтобы проверить эффективность транспорта биотина через клеточную мембрану, сравнили уровень биотинилирования белков в клеточных линиях HEK293 WT и Δ*SLC5A6*. С этой целью клетки инкубировали с биотином в различных концентрациях, после чего визуализировали биотинилированные белки методом вестерн-блоттинга с помощью стрептавидин-пероксидазного конъюгата (StreptHRP, рис. 2). Оказалось, что уровень биотинилирования не изменяется при инактивации гена *SLC5A6*.

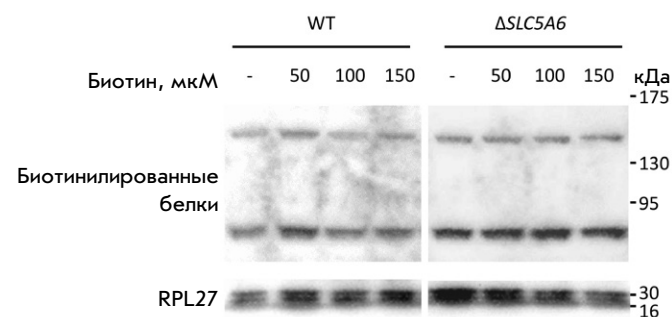


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ продуктов инкубации клеточных линий HEK293 WT (слева) и Δ*SLC5A6* (справа) с биотином в концентрации 50, 100, 150 мкМ

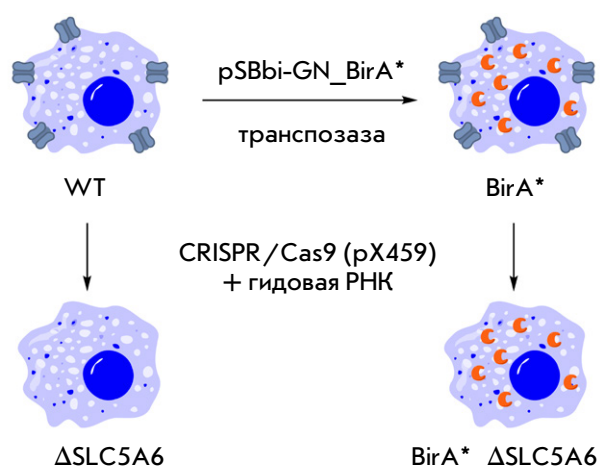


Рис. 3. Получение клеточных линий на основе HEK293. Клетки с повышенным уровнем биотинилированных белков (линия BirA*) получали путем введения мутантной биотинлигазы BirA*. Ген *BirA** встроили в геном с помощью плазмиды pSBbi-GN_BirA* и транспозазы. В клеточных линиях WT и BirA* ген *SLC5A6* инактивировали с помощью системы CRISPR-Cas9, используя вектор pX459 с гидовой РНК, нацеленной на экзон 8. Получены линии ΔSLC5A6 и BirA*_ΔSLC5A6

Мы предполагаем, что это может быть связано с трансмембранной диффузией или эндоцитозом биотина в течение 24 ч инкубации, что приводит к его относительно высокой концентрации в клетках. Кроме того, в доставке биотина через клеточную мембрану могут участвовать и другие транспортеры, например, транспортер монокарбоксилата 1 (MCT1) [28–30]. Отметим, что Subramanian V.S. и соавт. выдвигали гипотезу о диффузии витаминов через мембрану, что объясняет эффективность терапии биотином и пантотеновой кислотой пациентов с нарушенным мультивитаминным транспортером [15].

Тест-система для контроля проникновения биотина через мембрану клетки

Определив, что функционирование мультивитаминного транспортера SLC5A6 не является фактором, лимитирующим проникновение биотина в клетки в культуре при природном содержании биотинилированных белков, мы решили создать клеточные линии с искусственно повышенным уровнем биотинилирования.

Для этого на основе клеток HEK293 получили еще две клеточные линии (рис. 3).

Используя вектор на основе транспозазы Sleeping beauty (SB100X), в клетки HEK293 ввели ген *BirA**, кодирующий мутантную биотинлигазу *E. coli* BirA^{R118G} [31, 32]. Этот фермент катализирует неспецифическое присоединение биотина к остаткам лизина в белках. Таким образом биотин, поступающий в клетку, быстро используется для биотинилирования белков, в норме не связывающих биотин. Это позволяет оценивать скорость проникновения биотина через мембрану по уровню биотинилированных белков в клетке.

Далее мы внесли инактивирующую мутацию в ген *SLC5A6*, кодирующий белок hSMVT. Это позволило сравнивать процесс биотинилирования в клетках, содержащих активный и неактивный транспортер hSMVT. В клетки с геном *BirA** внесли инактивирующую мутацию и получили с помощью технологии CRISPR/Cas9 линию BirA*_ΔSLC5A6 (рис. 3), так же как ранее получили линию ΔSLC5A6 на основе клеток дикого типа.

Оценка эффективности транспорта биотина через клеточную мембрану с помощью тест-системы

Создав линии с эктопической экспрессией неспецифичной биотинлигазы BirA*, мы решили подобрать оптимальную концентрацию биотина в среде, пригодную для детекции транспорта этого витамина. С этой целью инкубировали клетки линий BirA* и BirA*_ΔSLC5A6 с разными концентрациями биотина: 0, 50, 100 и 150 мкМ (рис. 4А) в течение 24 ч. В обеих линиях наблюдалась большая разница в уровне биотинилирования в отсутствие добавленного биотина и при его концентрации 50 мкМ, после чего происходило насыщение и дальнейшее увеличение концентрации биотина, что не приводило к повышению уровня биотинилирования. Таким образом, концентрация 50 мкМ является оптимальной для оценки транспорта биотина. Кроме того, даже в отсутствие специально добавленного биотина уровень биотинилирования в клетках с инактивированным hSMVT был ниже, чем в клетках с активным транспортером.

Увеличение времени инкубации с биотином приводило к повышению уровня биотинилирования (рис. 4Б), причем наблюдались существенные различия, зависящие от наличия гена *SLC5A6*. Максимальный уровень биотинилирования в клетках линии BirA* достигается уже в первые несколько часов инкубации. В то же время в клетках BirA*_ΔSLC5A6, в которых нарушен транспорт биотина, процесс накопления биотинилированных белков протекает медленнее и достигает уровня, сопоставимого с максимальным уровнем в клетках ли-

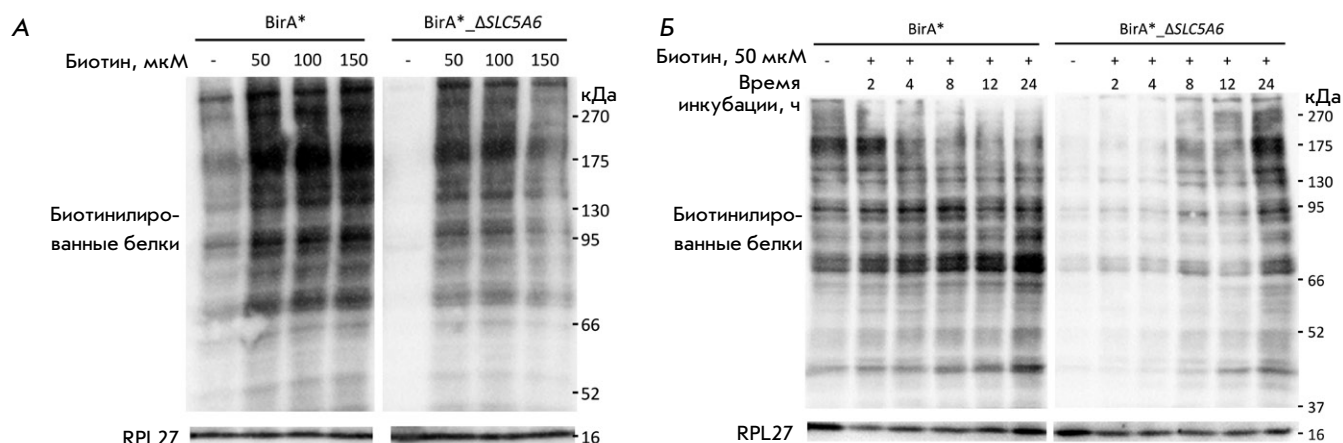


Рис. 4. Оценка уровня биотинилирования белков в клетках BirA* и BirA* Δ SLC5A6. А – зависимость уровня биотинилирования белков от концентрации биотина в среде при инкубации в течение 24 ч. Б – зависимость уровня биотинилирования белков от времени инкубации

нии BirA*, только спустя 24 ч. Это может служить подтверждением того, что hSMVT играет важную роль в транспорте биотина и, следовательно, в развитии патологических состояний у пациентов с мутациями в этом гене.

Синтез производных биотина для проникновения в клетки

Выбор производных биотина для синтеза был основан на таком изменении свойств его молекулы, которые могли облегчить ее проникновение в клетки альтернативными путями, не зависящими от транспортера hSMVT, что открывает новые возможности для лечения пациентов с мутациями гена SLC5A6. Для реализации этой задачи мы рассматривали два подхода.

Первый подход к доставке молекулы, минуя SLC5A6, заключается в создании гибридных молекул (пролекарств), состоящих из терапевтической части и компонента, имитирующего полезный метаболит, способный распознаваться специфическим транспортером. Например, транспортер LAT1 (Large Amino Acid Transporter-1) успешно используется для доставки кетопрофена и феруловой кислоты в нейроны, а также некоторых препаратов в опухолевые клетки [33–35]. Для этого терапевтические молекулы модифицируют, присоединяя их к аминокислотам – субстратам LAT1. Для оценки работоспособности этого подхода синтезировали биотиновое производное *n*-аминофенилаланина (**Bio-1**, рис. 5А, схема 1). Мы предполагаем, что после доставки этого вещества в клетку фермент биотинидаза будет

способствовать высвобождению биотина в свободном виде (рис. 5А), как это происходит при расщеплении *N*-биотинил-4-аминобензойной кислоты биотинидазой до биотина и *n*-аминобензойной кислоты [36, 37].

Второй подход заключается в снижении полярности молекулы. В этом случае может либо упроститься свободная диффузия молекулы через мембрану, либо активироваться другой транспортер этой молекулы, минуя hSMVT. Мы синтезировали метиловый эфир биотина (**Bio-2**), обладающий повышенной гидрофобностью. После проникновения в клетку биотин может высвобождаться под действием эстераз (рис. 5Б, схема 2).

Эффективность транспорта через клеточную мембрану биотина и его производных

Для сравнения способности биотина и его производных проникать в клетки инкубировали биотин, Bio-1 или Bio-2 с клеточными линиями HEK293 (WT), Δ SLC5A6, BirA* и BirA* Δ SLC5A6. Показано, что в клетках с функциональным транспортером hSMVT все три молекулы служат источником биотина. Так, не выявлены различия в уровне биотинилирования белков в клетках дикого типа, инкубируемых с биотином, Bio-1 и Bio-2 (данные не приведены).

При использовании клеток с эктопической экспрессией биотинлигазы BirA* уровень биотинилирования белков многократно возрастал. В этом случае все три молекулы могут быть использованы для доставки биотина в клетку (рис. 6, линия BirA*). Уровень проникновения через мембрану Bio-1

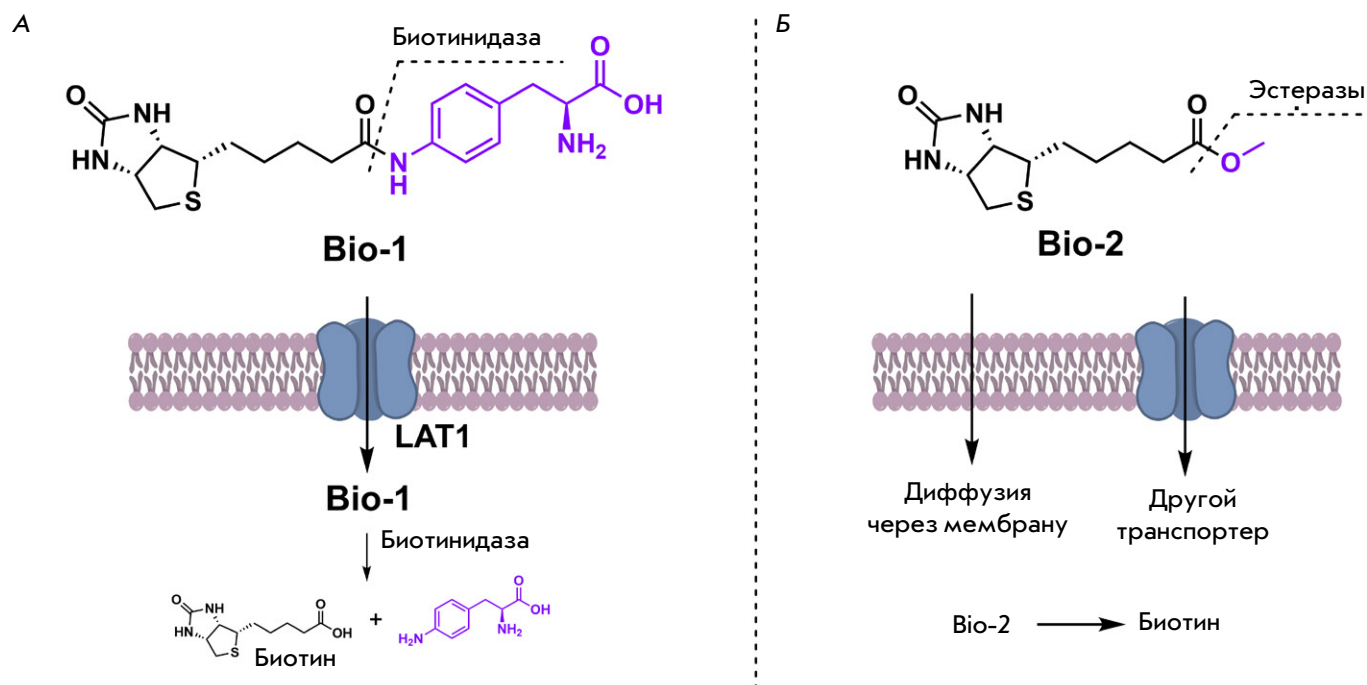


Рис. 5. Синтезированные аналоги биотина Bio-1 (А) и Bio-2 (Б), предположительная схема их транспорта через мембрану и дальнейшее ферментативное расщепление с высвобождением свободного биотина

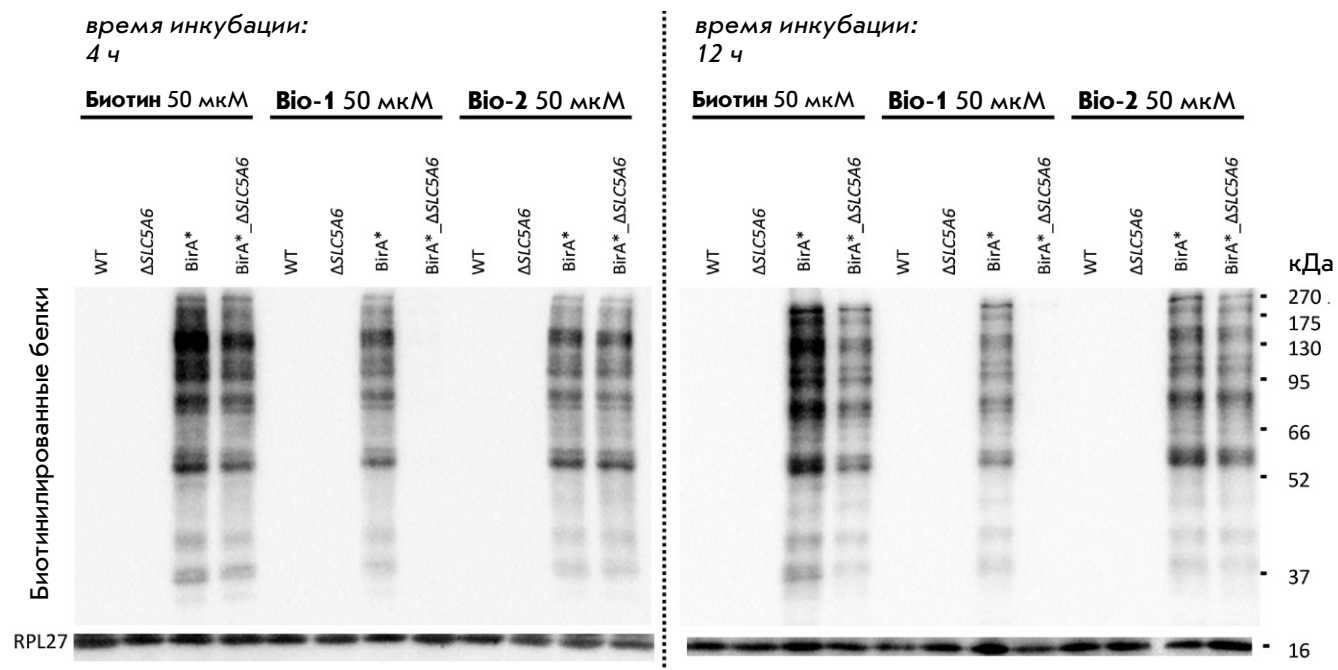


Рис. 6. Сравнение уровня биотинилирования белков в различных клеточных линиях после инкубации с биотином, Bio-1 и Bio-2

и Bio-2 несколько ниже по сравнению с биотином. При этом во всех случаях насыщение наблюдается уже через 4 ч инкубации.

Инактивация hSMVT снижает уровень проникновения биотина в клетку: как после 4 ч, так и после 12 ч инкубации уровень биотинилирования белков в клетках BirA*_ Δ SLC5A6 был ниже, чем в BirA*.

Результаты инкубации клеток с Bio-1 оказались неожиданными: при инактивации hSMVT даже инкубация с Bio-1 в течение 12 ч не приводила к повышению уровня биотинилированных белков в клетках (рис. 6, клетки BirA*_ Δ SLC5A6), в то время как при использовании функционального транспортера биотинилирование сохранялось на высоком уровне (рис. 6, линия BirA*). Исходя из этого можно заключить, что Bio-1 не транспортируется через LAT1, как ожидалось. Скорее всего, эта молекула может проникать в клетку только с участием hSMVT, что объясняет высокий уровень биотинилирования в клетках BirA* и его полное отсутствие при инактивации гена SLC5A6. Таким образом, мы наблюдали эффект, противоположный тому, что ожидали. Оказалось, что биотин может проникать в клетки несколькими путями, причем путь через hSMVT является только одним из них. Напротив, производное Bio-1 оказалось неспособным использовать путь транспорта, доступный биотину, и могло проникать в клетки исключительно через hSMVT.

В то же время при инкубации клеток с Bio-2 различие в биотинилировании белков в клетках BirA*_ Δ SLC5A6 и в BirA* было незначительным. Это свидетельствует о том, что способность соединения Bio-2 проникать в клетку не зависит от транспортера hSMVT.

Исходя из полученных результатов мы полагаем, что биотин в молекуле Bio-1 играет ключевую роль в транспортировке связанных с ним фрагментов через hSMVT. При этом прикрепленный к биотину *n*-аминофенилаланин не мешает транспорту через hSMVT, но мешает альтернативным путям транспорта. Это свойство биотина находит применение в направленной доставке лекарственных средств в клетки [38, 39] в виде конъюгата с биотином. Считается, что ключевую роль в транспорте таких лекарств выполняет белок hSMVT, однако, несмотря на многочисленные исследования, остается ряд нерешенных вопросов, касающихся механизма транспорта этих конъюгатов [30]. Например, есть данные [40] о необходимости свободной карбоксильной группы в молекуле биотина для его эффективного транспорта через SMVT. Однако в работах, где утверждается, что транспорт пролекарств осу-

ществляется через SMVT, молекула биотина присоединена к конъюгату именно через карбоксильную группу [30]. Наши данные также свидетельствуют о том, что свободная карбоксильная группа биотина не относится к необходимым для транспорта производных биотина через hSMVT.

С помощью разработанной тест-системы нам удалось показать, что биотин и его метиловый эфир Bio-2 могут транспортироваться в клетки независимо от hSMVT. Разработанная нами тест-система может стать инструментом для разработки пролекарств, содержащих биотин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе создана новая система для контроля транспорта биотина и его производных в клетки. Эта система является альтернативой сложным методам, которые требуют использования радиоактивно меченного биотина.

С помощью тест-системы установлено, что биотин и его метиловый эфир (Bio-2) способны проникать в клетки независимо от транспортера hSMVT, кодируемого геном SLC5A6, что указывает на существование альтернативных путей их транспорта. Однако, когда потребность в биотине возрастает, hSMVT становится ключевым фактором, обеспечивающим максимальную эффективность доставки.

Конъюгат биотина с *n*-аминофенилаланином (Bio-1) проникает в клетки только через hSMVT, что делает его непригодным для альтернативных путей доставки. Однако такая специфичность позволяет использовать hSMVT для транспорта других соединений в клетки в виде конъюгата с биотином. Разработанная тест-система является ценным инструментом для изучения механизмов поступления витаминов в клетки и в дальнейшем может быть использована для разработки терапевтических стратегий и оценки эффективности лекарств, предназначенных для пациентов с мутацией гена SLC5A6, а также других транспортеров. ●

Исследование проведено при поддержке гранта АИС Научные школы МГУ, № 24-Ш04-13 («Персонализированные мыши: создание и исследование точных мышечных моделей генетически обусловленных заболеваний»), а также в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

Авторы благодарят Программу развития МГУ за доступ к приборам CeleniaX и SeqStudio, использованным для оценки трансфекции, роста клеток и секвенирования генетических конструкций соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yee SW, Wang J, Giacomini KM. Rare Diseases linked to mutations in vitamin transporters expressed in the human blood–brain Barrier. *Clin Pharmacol Ther.* 2024;116(6):1513–1520. doi:10.1002/cpt.3433
2. Uchida Y, Ito K, Ohtsuki S, Kubo Y, et al. Major involvement of Na⁺-dependent multivitamin transporter (SLC5A6/SMVT) in uptake of biotin and pantothenic acid by human brain capillary endothelial cells. *J Neurochem.* 2015;134(1):97–112. doi:10.1111/jnc.13092
3. Subramanian VS, Marchant JS, Boulware MJ, et al. Membrane targeting and intracellular trafficking of the human sodium-dependent multivitamin transporter in polarized epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(4):C663–C671. doi:10.1152/ajpcell.00396.2008
4. Neophytou C, Pitsouli C. Biotin controls intestinal stem cell mitosis and host-microbiome interactions. *Cell Rep.* 2022;38(10):110505. doi:10.1016/j.celrep.2022.110505
5. Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J.* 2011;437(3):357–372. doi:10.1042/BJ20110326
6. Ghosal A, Lambrecht N, Subramanya SB, Kapadia R, Said HM. Conditional knockout of the Slc5a6 gene in mouse intestine impairs biotin absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;304(1):G64–G71. doi:10.1152/ajpgi.00379.2012
7. Zempleni J, Wijeratne SSK, Hassan YI. Biotin. *BioFactors.* 2009;35(1):36–46. doi:10.1002/biof.8
8. Karachaliou CE, Livanou E. Biotin homeostasis and human disorders: recent findings and perspectives. *Int J Mol Sci.* 2024;25(12):6578. doi:10.3390/ijms25126578
9. Atamna H, Newberry J, Erlitzki R, et al. Biotin deficiency inhibits heme synthesis and impairs mitochondria in human lung fibroblasts. *J Nutr.* 2007;137(1):25–30. doi:10.1093/jn/137.1.25
10. Leonardi R, Jackowski S. Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A. *EcoSal Plus.* 2007;2(2). doi:10.1128/ecosalplus.3.6.3.4
11. Sabui S, Kapadia R, Ghosal A, et al. Biotin and pantothenic acid oversupplementation to conditional SLC5A6 KO mice prevents the development of intestinal mucosal abnormalities and growth defects. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018;315(1):C73–C79. doi:10.1152/ajpcell.00319.2017
12. Hauth I, Waterham H, Wanders RJ, et al. A mild case of SMVT deficiency illustrating the importance of treatment response in variant classification. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2022;8(2):a006185. doi:10.1101/mcs.a006185
13. Byrne AB, Arts P, Polyak SW, et al. Identification and targeted management of a neurodegenerative disorder caused by biallelic mutations in SLC5A6. *NPJ Genom Med.* 2019;4(1):28. doi:10.1038/s41525-019-0103-x
14. Schwantje M, de Sain-van der Velden M, Jans J, et al. Genetic defect of the sodium-dependent multivitamin transporter: A treatable disease, mimicking biotinidase deficiency. *JIMD Rep.* 2019;48(1):11–14. doi:10.1002/jmd2.12040
15. Subramanian VS, Constantinescu AR, Benke PJ, et al. Mutations in SLC5A6 associated with brain, immune, bone, and intestinal dysfunction in a young child. *Hum Genet.* 2017;136(2):253–261. doi:10.1007/s00439-016-1751-x
16. Holling T, Nampoothiri S, Tarhan B, et al. Novel biallelic variants expand the SLC5A6-related phenotypic spectrum. *Eur J Hum Gen.* 2022;30(4):439–449. doi:10.1038/s41431-021-01033-2
17. Montomoli M, Vetro A, Tubili F, et al. A novel SLC5A6 homozygous variant in a family with multivitamin-dependent neurometabolic disorder: Phenotype expansion and long-term follow-up. *Eur J Med Genet.* 2023;66(8):104808. doi:10.1016/j.ejmg.2023.104808
18. Van Vyve F-X, Mercier N, Papadopoulos J, et al. A new case of sodium-dependent multivitamin transporter defect occurring as a life-threatening condition responsive to early vitamin supplementation and literature review. *Mol Genet Genomic Med.* 2024;12(2). doi:10.1002/mgg3.2388
19. Biotin. *Reactions Weekly.* 2024;2020(1):104. doi:10.1007/s40278-024-64469-9
20. Arooran T, Fernando PMS, Dayasiri K, et al. Child with holocarboxylase synthetase deficiency. *Clin Chim Acta.* 2024;558:119086. doi:10.1016/j.cca.2024.119086
21. Livanou E, Costopoulou D, Vassiliadou I, et al. Analytical techniques for determining biotin. *J Chromatogr A.* 2000;881(1–2):331–343. doi:10.1016/S0021-9673(00)00118-7
22. Mariasina SS, Chang CF, Navalayeu TL, et al. Williams-Beuren syndrome related methyltransferase WBSCR27: From structure to possible function. *Front Mol Biosci.* 2022;9. doi:10.3389/fmolb.2022.865743
23. Kowarz E, Löscher D, Marschalek R. Optimized sleeping beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnol J.* 2015;10(4):647–653. doi:10.1002/biot.201400821
24. Mátés L, Chuah MKL, Belay E, et al. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet.* 2009;41(6):753–761. doi:10.1038/ng.343
25. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
26. Karaj E, Sindi SH, Kuganasan N, et al. Tunable cysteine-targeting electrophilic heteroaromatic warheads induce ferroptosis. *J Med Chem.* 2022;65(17):11788–11817. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00909
27. Cui Y, Ma L. Sequential use of milk and bovine serum albumin for streptavidin-probed western blot. *Biotechniques.* 2018;65(3):125–126. doi:10.2144/btn-2018-0006
28. Daberkow RL, White BR, Cederberg RA, et al. Monocarboxylate transporter 1 mediates biotin uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr.* 2003;133(9):2703–2706. doi:10.1093/jn/133.9.2703
29. Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SS. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2008;3(6):715–724. doi:10.1586/17446651.3.6.715
30. Tripathi R, Guglani A, Ghorpade R, et al. Biotin conjugates in targeted drug delivery: Is it mediated by a biotin transporter, a yet to be identified receptor, or (an)other unknown mechanism(s)? *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2023;38(1):2276663. doi:10.1080/14756366.2023.2276663
31. Roux KJ, Kim DI, Burke B, et al. BioID: A screen for protein-protein interactions. *Curr Protoc Protein Sci.* 2018;91:19.23.1–19.23.15. doi:10.1002/cpps.51
32. Choi-Rhee E, Schulman H, Cronan JE. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. *Protein Science.* 2004;13(11):3043–3050. doi:10.1110/ps.04911804
33. Peura L, Malmioja K, Laine K, et al. Large amino acid transporter 1 (LAT1) prodrugs of valproic acid: new pro-drug design ideas for central nervous system delivery. *Mol Pharm.* 2011;8(5):1857–1866. doi:10.1021/mp2001878
34. Puris E, Gynther M, Huttunen J, et al. L-type amino acid transporter 1 utilizing prodrugs: How to achieve effective brain delivery and low systemic exposure of drugs. *J Con-*

- trol Release*. 2017;261:93–104. doi:10.1016/j.jconrel.2017.06.023
35. Huttunen J, Peltokangas S, Gynther M, et al. l-Type amino acid transporter 1 (LAT1/Lat1)-utilizing prodrugs can improve the delivery of drugs into neurons, Astrocytes and microglia. *Sci Rep*. 2019;9(1):12860. doi:10.1038/s41598-019-49009-z
36. Szabó E, Szatmári I, Szőnyi L, et al. Quantitative analytical method for the determination of biotinidase activity in dried blood spot samples. *Anal Chem*. 2015;87(20):10573–10578. doi:10.1021/acs.analchem.5b02996
37. Kobza KA, Chaiseeda K, Sarath G, et al. Biotinyl-methyl 4-(amidomethyl)benzoate is a competitive inhibitor of human biotinidase. *J Nutr Biochem*. 2008;19(12):826–832. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.11.002
38. Maiti S, Paira P. Biotin conjugated organic molecules and proteins for cancer therapy: A review. *Eur J Med Chem*. 2018;145:206–223. doi:10.1016/j.ejmech.2018.01.001
39. Park S, Kim E, Kim WY, et al. Biotin-guided anticancer drug delivery with acidity-triggered drug release. *Chem Commun*. 2015;51(45):9343–9345. doi:10.1039/C5CC03003J
40. Said HM. Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption. *J Nutr*. 2009;139(1):158–162. doi:10.3945/jn.108.092023

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 Редакцией 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:

- 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).

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 корректу-

рой. 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 сноска, 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: сноска (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: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п.}$ – 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 μM ; 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 сокращениями (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 редколлгией 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 редколлгией. 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 редколлгией.

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.

Библиографические описания цитируемых источников в списке литературы следует оформлять в соответствии с требованиями Международного комитета редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE) и AMA Manual of Style: A Guide for Authors and Editors (11th Edition).

Подробные правила оформления ссылок представлены тут: <https://actanaturae.ru/2075-8251/pages/view/references>

Пользователям специализированного ПО для формирования библиографии редакция рекомендует следующие ресурсы:

- EndNote — скачать файл стиля Acta Naturae.ens, просмотреть референтный стиль JAMA: Journal of the American Medical Association (AMA 11th edition);
- Zotero — просмотреть референтный стиль American Medical Association 11th edition (brackets);
- Mendeley — просмотреть референтный стиль American Medical Association.

Примеры оформления ссылок:

1. Hisakata R, Nishida S, Johnston A. An adaptable metric shapes perceptual space. *Curr Biol*. 2016;26(14):1911-1915. doi: 10.1016/j.cub.2016.05.047
2. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. CSHL Press; 2001.
3. Hogue CWV. Structure databases. In: Baxevanis AD, Ouellette BFF, eds. *Bioinformatics*. 2nd ed. Life Sciences Series. Wiley-Interscience; 2001:83-109.

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