

ISSN 0320-9725

Том 88, Номер 11

Ноябрь 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 11, 2023

Специальный выпуск, посвящённый памяти А.М. Оловникова

Приглашённый редактор И.А. Оловников

От редакции	2037
«На месте природы я бы сделал так...». Жизнь и гипотезы Алексея Оловникова (обзор) <i>Н.И. Оловникова, И.А. Оловников, А.И. Калмыкова</i>	2038
Взаимосвязи между развитием, ростом, размерами тела, размножением, старением и долголетием — компромиссы и темп жизни (обзор) <i>R. Yuan, E. Hascup, K. Hascup, A. Bartke</i>	2051
Оловников, теломеры и теломераза. Возможно ли продление здоровой жизни? (обзор) <i>Е.Е. Егоров</i>	2066
Нестабильная ДНК нейронов: счетчик продолжительности жизни и драйвер эволюции (обзор) <i>В.Е. Дьяконова</i>	2084
Потенциальные геропротекторы — из лаборатории в клинику (обзор) <i>А.А. Москалев</i>	2101
Ретротранспозоны и теломеры (обзор) <i>А.И. Калмыкова, О.А. Соколова</i>	2109
Мобильные и немобильные: многообразие обратных транскриптаз и их рекрутирование геномом хозяина (обзор) <i>И.Р. Архипова, И.А. Юшенова</i>	2127
Эффекты микрогравитации и физиология старения: сходные изменения или общие механизмы? (обзор) <i>А.Ю. Ратушный, Л.Б. Буравкова</i>	2138
Актuarная скорость старения в когортах человека <i>Л.А. Гаврилов, Н.С. Гаврилова</i>	2156

РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

Единственная остановленная 80S рибосома препятствует вовлечению мРНК в стресс-гранулы <i>А.Г. Федоровский, А.В. Бураков, И.М. Теренин, Д.А. Быков, К.А. Лашкевич, В.И. Попенко, Н.Е. Макарова, И.И. Сорокин, А.П. Сухинина, В.С. Прасолов, П.В. Иванов, С.Е. Дмитриев</i>	2166
Пептидные носители как средства доставки терапевтических нуклеиновых кислот. Механизмы и потенциал применения в медицине (обзор) <i>Е.Д. Тимотиевич, И.П. Шиловский, М.Р. Хаитов</i>	2183

Иммунные привилегии как результат взаимной регуляции иммунной и стволовой систем (обзор) <i>Д.В. Карпенко</i>	2206
Разнообразие и эволюция трансляционных аппаратов митохондрий (обзор) <i>М.В. Балева, У.Е. Пиунова, И.В. Чичерин, С.А. Левицкий, П.А. Каменский</i>	2221
Экспозиционная репарация нуклеотидов. Методы определения эффективности функционирования (обзор) <i>А.А. Попов, И.О. Петрусева, Н.В. Науменко, О.И. Лаврик</i>	2235
Метаболические свойства Т-лимфоцитов и методы их регуляции (обзор) <i>В.В. Власова, К.В. Шмагель</i>	2251
С-Концевые фрагменты апелина: биологические свойства и терапевтический потенциал (обзор) <i>О.И. Писаренко, И.М. Студнева</i>	2271
Патологические корреляты когнитивных нарушений при болезни Паркинсона: от молекул до нейронных сетей (обзор) <i>Н.И. Новиков, Е.С. Бражник, В.Ф. Кичигина</i>	2289
Функция консервативных «нефункциональных» остатков в апомиоглобине – обеспечить и сохранить правильную топологию белка (мини-обзор) <i>В.Е. Бычкова, Д.А. Долгих, В.А. Балобанов</i>	2308
Различия в структурных изменениях и патофизиологических эффектах липопротеидов низкой плотности при накоплении в них ацилгидроперокси-производных в наружном фосфолипидном монослое или при химической модификации апопротеина В-100 природным дикарбонилем <i>В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Г.Г. Коновалова</i>	2314
Изучение эффектов прогестерона и селективных лигандов мембранных рецепторов прогестерона в клетках НерG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека <i>Т.А. Шелкунова, И.С. Левина, И.А. Морозов, П.М. Рубцов, А.И. Гончаров, Ю.В. Кузнецов, И.В. Заварзин, О.В. Смирнова</i>	2326
Особенности ответа клеток карциномы лёгких человека A549 с нокаутированным геном <i>PRIMPOL</i> на генотоксический стресс <i>А.С. Громова, Е.О. Болдинова, Д.В. Ким, Р.Н. Чупров-Неточин, С.В. Леонов, М.В. Пустовалова, Д.О. Жарков, А.В. Макарова</i>	2340

CONTENTS

Vol. 88, Issue 11, 2023

In Memory of Alexey Olovnikov (Special Issue)

Guest Editor Ivan Olovnikov

Editorial	2037
“If I Were in Nature’s Place, I Would Do It Like This...”. Life and Hypotheses of Alexey Olovnikov (Review) <i>N. I. Olovnikova, I. A. Olovnikov, and A. I. Kalmykova</i>	2038
Relationships among Development, Growth, Body Size, Reproduction, Aging, and Longevity – Trade-Offs and Pace-of-Life (Review) <i>R. Yuan, E. Hascup, K. Hascup, and A. Bartke</i>	2051
Olovnikov, Telomeres and Telomerase. Is It Possible to Prolong a Healthy Life? (Review) <i>Y. E. Yegorov</i>	2066
Unstable DNA in Neurons: Counter of the Life Span and a Driver of Evolution (Review) <i>V. E. Dyakonova</i>	2084
Potential Geroprotectors – From the Bench to the Clinic (Review) <i>A. A. Moskalev</i>	2101
Retrotransposons and Telomeres (Review) <i>A. I. Kalmykova and O. A. Sokolova</i>	2109
To Be Mobile or Not: The Variety of Reverse Transcriptases and Their Recruitment by Host Genomes (Review) <i>I. R. Arkhipova and I. A. Yushenova</i>	2127
Microgravity Effects and Aging Physiology: Similar Changes or Common Mechanisms? (Review) <i>A. Yu. Ratushnyy and L. B. Buravkova</i>	2138
Actuarial Aging Rates in Human Cohorts <i>L. A. Gavrilov and N. S. Gavrilova</i>	2156

REGULAR ARTICLES

A Solitary Stalled 80S Ribosome Prevents mRNA Recruitment to Stress Granules <i>A. G. Fedorovskiy, A. V. Burakov, I. M. Terenin, D. A. Bykov, K. A. Lashkevich, V. I. Popenko, N. E. Makarova, I. I. Sorokin, A. P. Sukhinina, V. S. Prassolov, P. V. Ivanov, and S. E. Dmitriev</i>	2166
Peptide Carriers as Delivery Vehicles for Therapeutic Nucleic Acids. Mechanisms and Potential Applications in Medicine (Review) <i>E. D. Timotievich, I. P. Shilovskiy, and M. R. Khaitov</i>	2183

Immune Privileges as a Result of Mutual Regulation of the Immune and Stem Systems (Review) <i>D. V. Karpenko</i>	2206
Diversity and Evolution of Mitochondrial Translation Apparatus (Review) <i>M. V. Baleva, U. E. Piunova, I. V. Chicherin, S. A. Levitskii, and P. A. Kamenski</i>	2221
Nucleotide Excision Repair. Methods of Determination the Efficiency Functioning (Review) <i>A. A. Popov, I. O. Petruseva, N. V. Naumenko, and O. I. Lavrik</i>	2235
T-Lymphocyte Metabolic Features and Techniques to Modulate Them (Review) <i>V. V. Vlasova and K. V. Shmagel</i>	2251
Apelin C-Terminal Fragments: Biological Properties and Therapeutic Potential (Review) <i>O. I. Pisarenko and I. M. Studneva</i>	2271
Pathological Correlates of Cognitive Decline in Parkinson's Disease: From Molecules to Neural Networks (Review) <i>N. I. Novikov, E. S. Brazhnik, and V. F. Kichigina</i>	2289
The Function of the Conserved "Non-Functional" Residues in Apomyoglobin Is to Provide and Preserve the Correct Protein Topology (Mini-Review) <i>V. E. Bychkova, D. A. Dolgikh, and V. A. Balabanov</i>	2308
Differences in Structural Changes and Pathophysiologic Effects of Low-Density Lipoproteins upon Accumulation of Acylhydroperoxy Derivatives in Their Outer Phospholipid Monolayer or upon Chemical Modification of Apoprotein B-100 by Natural Dicarboxyl <i>V. Z. Lankin, A. K. Tikhaze, and G. G. Konovalova</i>	2314
Effects of Progesterone and Selective Ligands of Membrane Progesterone Receptors in HepG2 Cells of Human Hepatocellular Carcinoma <i>T. A. Shchelkunova, I. S. Levina, I. A. Morozov, P. M. Rubtsov, A. I. Goncharov, Yu. V. Kuznetsov, I. V. Zavarzin, and O. V. Smirnova</i>	2326
Characteristics of PRIMPOL Knockout A549 Cell Response to Genotoxic Stress <i>A. S. Gromova, E. O. Boldinova, D. V. Kim, R. N. Chuprov-Netochin, S. V. Leonov, M. V. Pustovalova, D. O. Zharkov, and A. V. Makarova</i>	2340

ОТ РЕДАКЦИИ



Алексей Матвеевич Оловников (1936–2022)

DOI: 10.31857/S0320972523110015, EDN: MPMSGU

Номер посвящён памяти яркого учёного-геронтолога Алексея Матвеевича Оловникова, чьи теоретические работы об укорочении теломер лежали у истоков нового направления науки — молекулярной биологии старения. Алексей Матвеевич был членом редакционной коллегии журнала; с его лёгкой руки журнал стал регулярно публиковать статьи геронтологической тематики. Начало этой традиции положил номер, полностью посвященный проблемам старения и укорочению теломер, авторами которого были ведущие мировые специалисты в этой области, откликнувшиеся на приглашение Алексея Матвеевича (№ 11, 1997).

На протяжении своей долгой научной деятельности Алексей Матвеевич Оловников опубликовал на страницах «Биохимии» полтора десятка статей (первая вышла в 1960 г., последняя — в 2022 г.), большинство из которых были теоретическими. Данным номером, в котором мы постарались собрать статьи об актуальном состоянии проблемы и различных аспектах старения и развития, мы отдаём дань памяти этому неординарному учёному и прекрасному человеку.

Первая статья (Н.И. Оловникова и др., стр. 2038) посвящена научной биографии Алексея Матвеевича Оловникова. Обзор R. Yuan и др. (стр. 2051) анализирует влияние физиологических факторов, таких как скорость роста, полового созревания и плодовитость, на процесс старения и продолжительность жизни. В обзоре Е.Е. Егорова (стр. 2066) обсуждается история и актуальное состояние науки о тело-

мерах и теломеразе. В.Е. Дьяконова (стр. 2084) подробно рассматривает тему, которую Алексей Матвеевич неоднократно обсуждал в своих геронтологических гипотезах: проблему нестабильности генома нейронов и физиологической роли этого явления. В статье А.А. Москалева (стр. 2101) представлен систематический взгляд на современные подходы к поиску геропротекторов. А.И. Калмыкова и О.А. Соколова (стр. 2109) рассматривают биологию терминальных мобильных элементов — альтернативного пути удлинения теломер, и обсуждают эволюционное сходство этого процесса с теломеразным механизмом. Статья И.Р. Архиповой и И.А. Юшеновой (стр. 2127) является подробным обзором важнейшего семейства ферментов — обратных транскриптаз — в эволюционном контексте, а также затрагивает малоизученную проблему их доместикации. В обзоре А.Ю. Ратушного и Л.Б. Буравковой (стр. 2138) представлен оригинальный взгляд на сходства естественного клеточного старения и эффектов микрогравитации. И, наконец, статья Л.А. и Н.С. Гавриловых (стр. 2156), классиков статистического подхода в геронтологии, исследует исторические изменения темпов роста смертности с возрастом с использованием когортных данных.

Мы благодарны всем авторам, которые откликнулись на приглашение и написали статьи для этого специального выпуска.

*Редакция журнала «Биохимия»
и приглашённый редактор номера И.А. Оловников*

«НА МЕСТЕ ПРИРОДЫ Я БЫ СДЕЛАЛ ТАК...». ЖИЗНЬ И ГИПОТЕЗЫ АЛЕКСЕЯ ОЛОВНИКОВА

Обзор

© 2023 Н.И. Оловникова¹, И.А. Оловников^{2*}, А.И. Калмыкова³

¹ ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167 Москва, Россия

² Biovision Ventures, Люксембург; электронная почта: ivan.olovnikov@gmail.com

³ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.07.2023

После доработки 25.09.2023

Принята к публикации 25.09.2023

В этой статье мы вспоминаем жизненный и научный путь блестящего геронтолога-теоретика Алексея Матвеевича Оловникова (1936–2022). В 1971 г. он опубликовал свою известную гипотезу о «маргинотомии», в которой предсказал репликативное укорочение теломер и его роль в качестве счетчика делений клеток и биологического возраста организма. В этой работе было сделано несколько ярких предположений, в частности о существовании теломеразы, которые через два десятилетия были подтверждены. Несмотря на это, Алексей Матвеевич двинулся дальше в своих теоретических исследованиях старения и выдвинул ряд новых гипотез, которые кажутся не менее экзотичными, чем в свое время казалась гипотеза маргинотомии. Алексей Матвеевич Оловников обладал незаурядным видением биологических проблем и, помимо старения, является автором ярких работ на темы развития, биоритмов, эволюции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Оловников, маргинотомия, теломеры, старение, принтомеры, хрономеры.

DOI: 10.31857/S0320972523110027, **EDN:** MWOKNY

ВВЕДЕНИЕ

В международной научной среде Алексей Матвеевич Оловников (1936–2022) наиболее известен благодаря своей провидческой работе об укорочении теломер и роли этого процесса в старении (1971–1973) (рис. 1). Коллеги знали его как интересного собеседника, которого волновали в первую очередь нерешенные проблемы биологии и который всегда взбудоражит своими вопросами даже скучный семинар. Для родных и близких он был человеком жизнерадостным, мягким, нетребовательным и любопытным до всего на свете. Но для всех была очевидна одна его черта — неординарность, которая проявлялась во всем, начиная от бытовых вещей (например, раскладывания документов на полу, потому что на столах вечно не хватало места) до дела всей его жизни — теоретической биологии (статьи его можно считать какими угодно, но, точно, не ординарными). А еще он очень любил термины и сокращения, и, используя его собственную аббре-



Рис. 1. Алексей Матвеевич Оловников (1936–2022)

* Адресат для корреспонденции.

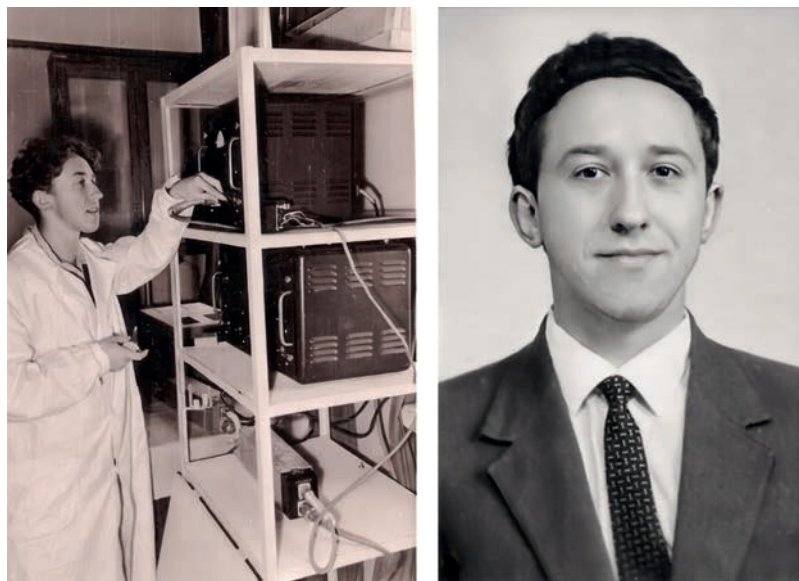


Рис. 2. А.М. Оловников — университетские годы (1953—1959 гг.)

виатуру, мы будем в этой статье называть его АМО. В этом очерке мы делаем краткий биографический экскурс и вспоминаем научный путь АМО.

БИОГРАФИЯ

Алексей Матвеевич родился 10 октября 1936 г. во Владивостоке, куда был направлен в рабочую командировку его отец — журналист Матвей Семенович Корман. Помимо журналистики, отец был инженером-изобретателем, и ему принадлежали несколько патентов. Матвей Семенович родился в еврейском местечке в Беларуси, в семье, из которой вышли талантливые художники, писатели, инженеры, герои Великой Отечественной войны. Мать АМО, Татьяна Алексеевна Оловникова, происходила из семьи купцов и предпринимателей старинного купеческого центра, города Раненбурга, где и сейчас в одном из особняков Оловниковых располагается городская администрация, а на берегу реки еще можно рассмотреть стены табачной фабрики Оловниковых. В 1941 г. Матвей Семенович был командирован на фронт военным журналистом от газеты «Медицинский работник» и без вести пропал в Украине осенью того же года. Татьяна Алексеевна закончила Московский педагогический институт, защитила кандидатскую диссертацию по психологии, после чего всю жизнь работала доцентом-преподавателем психологии.

Научный путь АМО начался с обучения на кафедре Биохимии биолого-почвенного факультета Московского государственного уни-

верситета имени М.В. Ломоносова, куда он поступил в 1953 г. (рис. 2). В университетские годы АМО заинтересовала иммунология, и он поступил в аспирантуру Института эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи в Отдел иммунологии и онкологии под руководством Л.А. Зильбера — человека потрясающей и тяжелой судьбы, создателя противочумной и других вакцин, пионера в поиске раковых антигенов, одного из отцов-основателей вирусной теории происхождения рака [1]. Позже АМО работал под руководством Г.И. Абелева, возглавившего отдел после смерти Льва Зильбера, в Лаборатории химии и биосинтеза антител А.Е. Гурвича. Всю жизнь АМО вспоминал своих учителей, а пример Льва Зильбера и его кредо — «счастье в жизни, а жизнь в работе» — кажется, никогда не выходило у него из головы.

АМО попал в Институт им. Н.Ф. Гамалеи в то время, когда институт переживал свой расцвет, и туда приезжали по приглашению Зильбера многие выдающиеся зарубежные иммунологи. В годы работы в Институте имени Н.Ф. Гамалеи АМО занимался различными темами прикладной иммунологии и опубликовал несколько интересных работ (рис. 3). Экспериментальная работа и тема кандидатской диссертации была посвящена разработке и применению иммуносорбентов в качестве диагностикумов и для иммунизации животных. Список публикаций по теме кандидатской диссертации украшала статья в журнале «Nature» в соавторстве с научным руководителем Ароном Гурвичем [2]. В ней они описали мощнейшее усиление иммуногенности при



Рис. 3. А.М. Оловников в институте им. Н.Ф. Гамалеи (1960-е гг.)

ковалентной сшивке антигена с нерастворимым носителем при иммунизации кроликов полученной суспензией. В 1966–1969 гг. был разработан новый иммунохимический метод — агрегат-гемагглютинация, который позволял с высокой чувствительностью выявлять растворимые антигены и был использован при тестировании микробных токсинов, опухолевого маркера альфа-фетопротеина и др. [3–7]. АМО перевел на русский язык несколько книг, среди которых были «Целостность организма и иммунитет» Ф. Бернета (Мир, 1964) и «Сравнительная иммунология» Э. Купер (Мир, 1980) [8, 9]. В 1977 г. АМО стал руководителем группы в Институте химической физики (ИХФ РАН), где он разрабатывал иммунохимические методы, руководил кандидатскими диссертациями. Затем в течение всех последующих лет был сотрудником Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля (ИБХФ РАН).

Интерес к иммунологии АМО сохранил надолго. Так, в 1972 г. он предложил механизм «изотранспозиции трансгенов», как способ генерации многообразия антител путем комбинирования так называемых «трансгенов» — многочисленных отличающихся по последовательности участков ДНК, которые находятся рядом в определенном локусе хромосомы [10]. Формирование переменных областей антител из таких блоков могло дать колоссальное число вариантов в зависимости от числа закодированных в ДНК трансгенов. Воссоединение индивидуальных трансгенов, согласно его гипотезе, должно было происходить через так называемое «экстракопирование», т.е. создание копий индивидуальных трансгенов, которые объединялись в кодирующий ген вне хромосомы. Сейчас мы знаем, что

это внутрихромосомный рекомбинационный процесс.

Теоретические находки АМО сильно опережали свое время и остались незамеченными во многом потому, что не были опубликованы в общедоступных журналах. Иммунологическая гипотеза была доложена на симпозиуме «Молекулярно-генетические основы биосинтеза антител» в октябре 1972 г. в Цахкадзоре (Армения) и опубликована в сборнике Института им. Н.Ф. Гамалеи «Вопросы иммунологии» в 1974 г. [10]. Примерно пятью годами позже Судзуми Тонегава обнаружил, что в процессе дифференцировки В-лимфоцитов переменные области тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов образуются путем соединения нескольких сегментов, каждый из которых представлен в локусе иммуноглобулиновых генов во множестве различающихся вариантов. В результате такой рекомбинации создается разнообразие антител. За это открытие в 1987 г. Тонегава получил Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

ТЕЛОМЕРНАЯ ТЕОРИЯ СТАРЕНИЯ

Не многим людям так посчастливилось, как АМО: природа наградила его поистине неугасимым интересом к науке. Ни одной секунды своей жизни он не скучал, не чувствовал себя не у дел. Нерешенные проблемы биологии АМО воспринимал как личный вызов, его голова постоянно требовала задач, а способность осмысливать научную информацию и вычленять из нее самое главное были уникальными. Гипотезы АМО временами очень сложны и содержат множество дополнительных построений, которые камуфлируют

основную мысль. Несмотря на то что утверждения в его статьях подкреплены литературными фактами, логические выводы были зачастую настолько необычны, неожиданны и оригинальны, что воспринимались как фантазии и даже вызывали неприятие и протест. Так было с теорией концевой недорепликации, или маргинотомии (укорочение концов хромосом), опубликованной впервые в *Докладах Академии наук СССР* в 1971 г. [11, 12]. Это самая известная теоретическая работа АМО. Удивительно точное предсказание не только существования самого феномена, но и происходящих из него биологических последствий, вызывали потом неподдельный интерес: ведь они были сделаны задолго до того, как укорочение теломер и его молекулярное обеспечение были обнаружены и исследованы.

История открытия началась в 1966 г. с лекции гистолога А.Я. Фриденштейна, на которой АМО услышал про недавно опубликованные данные Леонарда Хейфлика о том, что нормальные соматические клетки, фибробласты, не могут бесконечно размножаться *in vitro*, и, сделав около 50 удвоений, прекращают делиться [13]. Более того, в клетках заложена программа отсчета удвоений: после 20 делений Хейфлик замораживал клетки в жидком азоте; после того как клетки размораживали, они делали 30 удвоений. То есть клетки «помнили», что уже сделали 20 делений, и им осталось всего 30.

АМО рассказывал, что этот факт настолько его потряс, что он не мог думать ни о чем другом. Как могла быть устроена программа отсчета делений? Объяснение возникло, как всегда, не тривиальное. Представив, как работает репликативный комплекс, АМО пришел к выводу, что молекула ДНК не может быть реплицирована до самого конца, а раз так, то при каждом удвоении на своих концах она будет становиться короче. Укорочение ДНК до какого-то критического предела может приводить к нарушению функций околотеломernih генов и гибели клетки. Теломерная теория старения отводила механизму укорочения концов хромосом роль таймера, который отмеряет число делений клетки и объясняет лимит Хейфлика. Когда у АМО брали интервью, он рассказывал историю про то, что эта идея пришла ему в голову, когда он наблюдал за первым и последним вагонами поезда в метро и обратил внимание, что между концом поезда и дверью, куда входят люди, есть мертвая зона. И если вместо поезда представить ДНК-полимеразу, у которой каталитический центр не может достичь самого края матрицы, то наглядно проявляется проблема репликации теломер. АМО

описал рождение гипотезы о маргинотомии в автобиографической заметке [14].

Здесь стоит сделать отступление и сказать, что АМО дважды встречался с Леонардом Хейфликом. Первый раз – в Киеве на геронтологическом конгрессе в 1972 г. Он мечтал подробно рассказать Хейфлику о своем объяснении лимита удвоений, в основном для того и поехал на конгресс, однако подробно поговорить им тогда не удалось [14]. Вторая встреча произошла в 1998 г. в Сан-Франциско, где проходила конференция «Telomeres and Telomerase», которую АМО с Л. Хейфликом открыли совместным сообщением.

Многие предсказания, сделанные на основе тогда еще полностью умозрительной гипотезы маргинотомии, подтвердились. Например то, что концы теломер представлены буферной повторяющейся последовательностью ДНК, являющейся расходным материалом [15, 16]. Блестяще подтвердился также постулат о существовании в половых и стволовых клетках особой формы ДНК-полимеразы, которая компенсирует укорочение теломер при делении [17, 18]. Благодаря этому ферменту зародышевая линия не стареет и обеспечивает полноценную передачу генетической информации в бесконечном числе поколений. Эта специализированная обратная транскриптаза, названная теломеразой, была сначала обнаружена у инфузории *Tetrahymena* [19] и охарактеризована Элизабет Блэкберн и Кэрл Грейдер.

В статье, рассказывающей об истории открытия теломеразы, они пишут, что не знали о гипотезе советского ученого до 1988 г., когда Кальвин Харли привлек их внимание к этой работе [20, 21]. И тогда, заинтригованные, Грейдер и Харли решили проверить, укорачиваются ли хромосомы в клетках человека, и показали, что обнаруженный у *Tetrahymena* процесс является общебиологическим, как предсказал АМО [22]. С того времени число исследований, посвященных проблеме концевой недорепликации, начало расти в геометрической прогрессии.

Помимо существования теломеразы, АМО предсказал, что механизм, созданный природой для бессмертия зародышевой линии, открывает возможность для патологии: соматическая клетка может воспользоваться теломеразой и встать таким образом на путь бесконечного размножения [12]. Действительно, было показано, что в ~85% раков теломераза активирована [23]. Способность бактерий к неограниченному размножению и их «бессмертие» в теории маргинотомии были объяснены кольцевой формой их хромосомы: поскольку

кольцо не имеет концов, бактерии не нуждаются в упомянутой компенсаторной ДНК-полимеразе. Позже стало известно об еще одном способе защиты от укорочения — надстройке концов хромосом с помощью мобильных элементов [24]. Таким путем пошла дрозофила. У нее нет теломеразы, но зато на концы ее хромосом могут присоединяться ретротранспозоны — мобильные последовательности ДНК, способные перемещаться по геному с помощью механизма обратной транскрипции. Также в гипотезе АМО было сделано несколько других предположений. В том числе, что «антимаргинотомия» (т.е. удлинение теломер) может иметь терапевтическое применение. Наконец, но не менее важно, было предположено, что первопричиной старения является укорочение теломер и «гибель клеток, участвующих в регуляции активности гипоталамуса и других гомеостатических центров».

Больше всего АМО интересовали механизмы развития и старения, генетическое устройство программы, которая ведет организм по всему пути онтогенеза от зарождения к гибели. И теломерная теория идеально, как казалось в начале, описывает программу старения. Однако с течением времени накапливались данные, которые указывали на то, что теломерная теория работает для культивируемых клеток, но не объясняет старение целых организмов. Так, например, при сравнении диких и лабораторных мышей выяснилось, что длина теломер у них резко различается: у лабораторных она может быть в 10 раз длиннее [25]. Можно было предположить, что они должны жить дольше, чем их сородичи в дикой природе, но оказалось, что живут они тот же срок. Также были выведены мыши, у которых отсутствовала теломеразная активность. Они оказались полностью жизнеспособными, давали потомство, несмотря на отсутствие теломеразы, и старели подобно всем остальным [26]. И только в 4–5 поколении у таких мышей стали появляться проблемы, а шестое поколение оказалось бесплодным. Даже в пределах одного организма митотические счетчики в клетках разных дифференцировок работают по-разному и отсчитывают различное число удвоений. Не был найден теломерный «сигнал старения», а конец хромосомы даже в сенесцентных клетках, т.е. клетках, исчерпавших свой лимит делений, после укорочения оказывался стандартно упакован теломерными белками и защищен от экзонуклеаз. Несмотря на то что в целом предсказания теломерной теории подтвердились, для АМО не оправдалась надежда, что она станет универсальным прин-

ципом, объясняющим причину старения организма. Укорочение теломер, по его словам, является лишь свидетелем, но не причиной старения [27].

Таким образом, этот круг замкнулся: разочаровавшись в правильности своей теории маргинотомии для объяснения феномена старения, АМО оставил ей узкое применение для объяснения «продолжительности жизни» клеточной культуры, для чего гипотеза и была выдвинута с самого начала. Нужно было искать новое решение.

Следует отметить, что роль теломер в старении продолжает активно изучаться. Например, согласно новым данным, в сенесцентных клетках возникает дисфункция теломер, не зависящая от их длины, и эти повреждения в теломерах ряд исследователей считают важным чек-пойнтом, запускающим механизм гибели клетки [28, 29]. Более того, существует теломер-центрическая теория, согласно которой, так или иначе, многие признаки старения, включая дисфункцию митохондрий, активацию воспаления, нарушение структуры хроматина и изменение протеостаза, активируются через дисфункцию теломер [30, 31]. Роль теломер в старении является темой нескольких статей в данном номере, а также главной темой специального памятного выпуска журнала «*Biogerontology*».

ОБЩАЯ ТЕОРИЯ РАЗВИТИЯ И СТАРЕНИЯ

АМО был приверженцем запрограммированности старения и был уверен, что программа эта имеет конкретный генетический механизм, в который вовлечен ограниченный набор факторов и который природа легко регулирует в зависимости от эволюционных и популяционных потребностей. Обнаружив ряд несостыковок в своей предыдущей гипотезе, АМО развил ее, сделав более универсальной [27, 32–34] (рис. 4). Опорными позициями новой теории старения можно считать следующие: 1) маргинотомия является надежным счетчиком клеточных удвоений; 2) но при этом укорочение концов хромосом не играет принципиальной роли в старении организма; 3) необходимо учесть нейроэндокринную теорию старения Владимира Дильмана, которую АМО считал центральной для объяснения старения животных [35]; 4) старение является неотъемлемым этапом онтогенеза, и потому должен существовать единый регуляторный механизм развития — от зарождения до смерти.



Рис. 4. А.М. Оловников делает доклад на геронтологической конференции (2000 г.)

АМО приходит к выводу, что в основе поддержания активного дифференцированного состояния клетки и ее старения лежит укорочение особых, пока еще гипотетических, внехромосомных линейных молекул ДНК, несущих регуляторные гены и защищенных теломерными повторами так же, как и линейные хромосомы. Он назвал эти молекулы принтомерами, «принтами» определенных участков хромосомы [32–34]. Будучи однажды скопированы со своего хромосомного оригинала, тканеспецифичные принтомеры работают в делящихся клетках, определяя состояние клеточной специализации. По мнению АМО, на ранних этапах эмбриогенеза, когда короткое воздействие морфогена должно определить судьбу определенной группы клеток, создание принтомер является способом реализации позиционной информации. Согласно гипотезе, принтомеры кодируют малые РНК, ответственные за экспрессию нужных генов за счет декомпактизации определенных участков хроматина [34, 36]. Гипотеза предполагала строгую упорядоченность структуры хроматина относительно ядерной мембраны. Связываясь с комплементарными сайтами в хромосоме вблизи ядерной

мембраны, малые РНК могут на короткое время открывать ядерную пору (поэтому данный тип РНК был назван фРНК – фонтанная). В результате резкого поступления ионов из перинуклеарного пространства в ядро, причем в строго определенном месте, происходит локальная декомпактизация хроматина и активация набора генов данной дифференцировки. РНК-зависимая ионная регуляция конфигурации хроматина может участвовать в процессе инактивации X-хромосомы, в эффекте положения гена, в феномене доминирования. Как пишет АМО, «эукариоты изобрели перинуклеарную цистерну вокруг хромосом именно для того, чтобы обрести возможность строго локальных, прицельных, ионных манипуляций со своей хроматиновой информотекой». Укорочение принтомер со временем может приводить к снижению дозы регуляторных РНК, обеспечивающих поддержание необходимой активности хромосомных структурных генов. Однако и эту гипотезу он не считал исчерпывающей, поскольку она объясняла активность клеток и тканей, но не слаженную работу всего организма.

В соответствии с нейроэндокринной теорией Дильмана, направлять развитие, организовать и поддерживать сбалансированную работу всего организма и определять его старение может только центральный управляющий орган, «физиологический топ-менеджер», каковым у высших животных является ЦНС. Учитывая эти работы, АМО сделал предположение, что в нейронах мозга работают свои принтомеры, которые он назвал хрономерами и которые контролируют взросление и старение организма в соответствии с его биологическим возрастом [27, 32, 37, 38]. Старение объяснялось теперь не укорочением теломер как таковых, а укорочением концов экстрахромосомной ДНК и тем самым снижением дозы регуляторных РНК, необходимых для поддержания активности генов в клетках данного типа. Более конкретно, хромеры контролируют экспрессию гормонов и рецепторов к ним в нейроэндокринных и нейротрофических центрах ЦНС. Как следствие, они контролируют все разнообразие процессов, происходящих в организме. Старение АМО назвал «болезнью количественных признаков», вызванной изменением активности генов после критического укорочения этих внехромосомных счетчиков.

Еще одним важным пунктом новой гипотезы было то, что укорочение хрономер в нейронах должно происходить волнами в такт



Рис. 5. Академик В.П. Скулачев, А.М. Оловников и чл.-корр. В.Н. Анисимов на геронтологической конференции на о. Стромболи (Италия), организованной Волтером Пьерпаоли (2005 г.)

с инфрадианными ритмами. Такой вывод АМО делает на основе работ В. Пьерпаоли, который экспериментально исследовал роль нейро-эндокринных органов, в частности эпифиза, в развитии и старении животных [39, 40]. В одной из своих работ АМО подробно описал, как он представляет этот процесс [37]. Но главное, он приходит к заключению, что ритмы не могут быть эндогенными. Все живые существа на Земле подвергаются внешним циклическим воздействиям геофизической природы, которые не могут не влиять на их жизнедеятельность. Две гипотезы АМО, опубликованные в 2005 и 2022 гг., рассматривают воздействие гравитации, самого безотказного и вечного водителя ритма на Земле, на процессы развития и старения [37, 41] (рис. 5). Эти яркие и неожиданные концепции старения заставляют оторвать взгляд от микроскопа и вспомнить, что живые существа живут на планете Земля, в ее космическом окружении. Так, в гипотезе, опубликованной в 2005 г., постулировано существование физиологического «луна-сенсора», расположенного в клетках эпифиза (пинеалоцитах), которые реагируют на механическое воздействие кальцината — давно описанного «мозгового песка» — при смене лунных циклов и гравитационного воздействия Луны [37]. Этот механизм объясняет резкие выбросы гормонов, смену циклов развития и ряд других явлений.

В своей последней «метрономной» гипотезе АМО формулирует новый взгляд на причину старения, отвергая наличие специальной

программы, сторонником существования которой он был на протяжении всей жизни [41]. Однако отказаться от существования вполне конкретного физиологического механизма, отсчитывающего биологическое время, АМО, конечно, не мог. Как и в лунасенсорной гипотезе, организм, живущий на Земле, рассматривается как мишень постоянного воздействия внешних мощных геофизических сил. Такими силами являются периодические смещения земной оси, которые приводят к изменению направления потока спинномозговой жидкости, что воспринимается волосковыми нейронами желудочков мозга (также давно описанного типа клеток). Это, в свою очередь, может запускать эпигенетические механизмы, опосредованные «темпоральной ДНК», влияющей на развитие. Старение в этой гипотезе рассматривается как пострепродуктивный этап развития, когда основная цель — продолжение жизни — выполнена, а темпоральная ДНК исчерпана. Как между собой соотносятся луна-сенсор и метроном, осталось не объясненным. Но, учитывая проницательные способности АМО и его дар научного предвидения, во всех его гипотетических построениях стоит разбираться. Эта последняя статья, опубликованная в журнале «Биохимия», была написана из последних сил, и главным источником этих сил была ответственность перед научным сообществом, невозможность не поделиться своими догадками.

Как видно, взгляды АМО претерпевали эволюцию на протяжении всей его карьеры.

Общая синтетическая гипотеза, состоящая из целого ряда концепций, создавалась АМО на протяжении многих лет, усложнялась, пестрила различными гипотетическими механизмами, новыми терминами, и была сложна для восприятия [42]. Однако стоит еще раз отметить, что ее базисными положениями являются: 1) наличие «парагенома», т.е. временных функциональных экстрахромосомных молекул ДНК; 2) централизованная регуляция процессов развития, осуществляемая ЦНС; 3) неумолимое воздействие двух счетчиков времени — внутреннего молекулярного (маргинотомия) и внешнего геофизического. Каждое из этих явлений в отдельности имеет множество экспериментальных подтверждений. К примеру, в последние годы начинают накапливаться данные о присутствии экстрахромосомной ДНК как в раковых, так и в нормальных тканях [43–45]. Частота встречаемости этого явления может указывать на то, что это вполне распространенный процесс, и не исключено, что в скором времени нас ждет очередное экспериментальное подтверждение гипотез АМО.

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ТЕОРИЯ

АМО интересовали не только старение, биоритмы и онтогенез. В его библиотеке книги и оттиски по проблемам эволюции, пожалуй, занимают первое место по количеству. Ему, как и многим биологам, не давала покоя проблема ограниченности выбора при естественном отборе, поскольку процент случайно возникающих благоприятных мутаций очень низок. То, что случайных ошибок недостаточно, видел и сам Дарвин, и с тех пор, как пишет АМО, «эта старая заноза все еще остается в теле эволюционной теории» [46]. Адаптивная эволюция может быть успешной только при своевременной и достаточной изменчивости генома организмов, оказавшихся в необычной среде обитания. Если мутации являются топливом для отбора, то механизм, который своевременно поставляет это топливо, так же важен для эволюции, как естественный отбор. Кроссинговер тут не помогает: слепая перетасовка генов не создает принципиально нового. АМО предлагает модель специализированной «машины для эволюции» («креатрона») [46, 47]. Согласно гипотезе, для того чтобы направленно модифицировать геном половых клеток, т.е. создавать в нем неслучайные мутации, необходимо, чтобы молекулярные сигналы доставлялись от «упражняющегося» (по Ламар-

ку) органа в геном клеток зародышевой линии. АМО предлагает объяснение загадочному факту [48], хорошо известному эмбриологам: миграциям первичных половых клеток по развивающемуся эмбриону перед заселением их в гонады. Он выдвигает предположение, что этот процесс используется для приобретения первичными герминальными клетками тканеспецифических маркеров, благодаря чему половые клетки взрослого организма становятся восприимчивы к молекулярным сигналам тех органов, с которыми их предшественники, первичные половые клетки, контактировали в ходе раннего органогенеза. Согласно гипотезе, интерфейсом-ретранслятором, который получает сигналы от органов и после процессирования переадресует их в гонады, является нейронная проекция частей тела в мозге, наподобие «гомункулуса Пенфилда» [46–48]. Транснейронная доставка сигнала от определенного органа является адресной, т.е. направленной к неслучайным группам герминальных клеток. Эволюционная машина, таким образом, должна выглядеть как трансмиссия сигнала от органа, аномально функционирующего в связи с изменившимися условиями, в нейрональную проекцию в мозге, а оттуда — в гонады, где сигнал воспримут «тканеспецифичные» герминальные клетки. Итоговым результатом работы этой эволюционной схемы являются эпигенетические модификации строго определенных локусов в геноме половых клеток, которые соответствуют «упражняющимся» (испытывающим стресс) органам. Топографически неслучайные эпигенетические изменения возникают в популяции и передаются потомкам в массовом порядке, в результате чего частота полезных изменений у потомков резко возрастает. В течение нескольких поколений эпигенетические изменения имеют повышенный шанс стать генетически закрепленными. Дальнейшее развитие эволюционной теории посвящено проблеме, какая молекула может быть использована в качестве сигнала для неслучайных генетических изменений. В 2022 г. была опубликована дополненная эволюционная гипотеза, в которой обсуждается возможная роль стабильных циркулярных РНК, которые могли бы исполнять роль мессенджера из сомы в герминативный орган [46]. Примечательно, что появились первые публикации об изменении уровня коротких РНК в половых клетках животных при воздействии экологического стресса [49]. Эти изменения рассматриваются как начало адаптивного процесса в изменившихся условиях обитания.

ПОДХОД АЛЕКСЕЯ ОЛОВНИКОВА К НАУЧНЫМ ПРОБЛЕМАМ

Здесь мы даем краткий и поверхностный обзор работ АМО. Далеко не все работы он доводил до публикации, хотя прорабатывал тщательно каждую гипотезу. Как правило, столкнувшись с нерешенной проблемой, он собирал обширную литературу по теме и, казалось бы, не по теме, общался со специалистами, и все это в какой-то момент помогало ему рассмотреть проблему как бы сверху и увидеть недостающее звено в контексте уже известной структурной и функциональной организации биологического процесса. АМО так написал о своем подходе в статье, посвященной проблемам морфогенеза: «Увидеть весь океан разом, как единое целое, можно только со спутника, с которого не видны волны, но хорошо различимы подводные течения и другие океанические тайны. В этой работе я пытался подняться как бы на спутнике, понимая, что сделать обзор всей литературы по биологическому морфогенезу просто невозможно, но интересно попытаться по-новому взглянуть на некоторые все еще не разгаданные тайны этого волнующего процесса и дать им свою интерпретацию» [50].

АМО обладал редкой способностью видеть неочевидное и не бояться рассказать об этом. Наверняка какая-то часть его выводов и размышлений не подтвердится, однако во всех случаях, когда дело доходило до публикации, он был уверен в своей правоте и даже говорил, что на месте природы сделал бы только так и не иначе. При этом он считал, что зарождающуюся уязвимую гипотезу легко убить критикой и разрушительными вопросами, поэтому до поры до времени тщательно оберегал новые идеи и ни с кем ими не делился. Статьи АМО переполнены информацией из-за того, что, помимо гипотезы, туда помещались многочисленные следствия с подробными объяснениями и ответвлениями. Нельзя не признать, что статьи АМО читаются очень непросто, зачастую утомляют и раздражают читателей детальными гипотезами, построенными на гипотезе [42]. Трудно предугадать, что окажется провидческим в его статьях, и станут ли экспериментаторы проверять чужие идеи. Но мы хотим еще раз подчеркнуть, что гипотезы эти надо рассматривать также с высоты, и вычленять из них ключевое — идею и принципы.

Семинары, конференции, доклады, на которых присутствовал АМО в качестве слушателя, запоминались благодаря его активному

участию в обсуждении, неожиданным вопросам и интересным комментариям. У него отсутствовало стремление задать вопрос ради вопроса или посадить в лужу докладчика. Некоторые его комментарии и вопросы при этом были остроумными и смешными. Так, на знаменитой Молекулярной школе в Звенигороде после представления В.А. Геодакяном его теории об Y-хромосоме как компасе эволюции АМО сказал, что ему очень нравится эта теория, но он не понимает, «как с помощью Y-хромосомы отбираются женские прелести». На другом семинаре В.П. Скулачев привел свой любимый пример того, как старение способствует эволюции: молодому зайцу легко убежать от лисы, но с возрастом это становится все сложнее, и поэтому заяц поумнее спасется, а заяц поглупее будет съеден лисой. АМО тогда возразил: «Коли так, зайцы за много поколений доумнели бы до член-корргов!»

В 70–80-х гг. на биологическом факультете МГУ в корпусе «А» регулярно проходил легендарный семинар выдающегося математика И.М. Гельфанда, организованный для биологов [51]. Биологов там учили логике, используя самые бесцеремонные приемы. Попастъ на семинар можно было только по приглашению его постоянного участника. А.Е. Гурвич, тогдашний научный руководитель АМО, привел на этот семинар своего молодого сотрудника. АМО вспоминал, что он, кажется, не произнес ни слова и только внимательно наблюдал за происходящим, однако вскоре А.Е. Гурвич, очень смущаясь, сказал, что И.М. Гельфанд просил больше не приглашать на семинар этого сотрудника. Что послужило причиной такого решения, АМО не интересовало, потому что стиль этого семинара был абсолютно неприемлем для него, не терпящего никакой несвободы в научных подходах и обсуждениях. Может быть, АМО не сдержался и высказал свое отношение к публичным поркам, происходящим на семинаре, а может быть, гениальный И.М. Гельфанд проницательно увидел, что бритва Оккама* этого молодого человека не возьмет. Действительно, в одном интервью АМО писал, что, наслушавшись советов применить этот логический принцип, прежде чем публиковать бредовую гипотезу об укорочении теломер, он почти возненавидел его. Ведь он в своих гипотезах как раз «множит сущности».

* Бритва Оккама — методологический подход, который рекомендует «не множить сущности», а из нескольких объяснений выбирать самое простое (например, состоящее из суммы уже известных явлений).



Рис. 6. А.М. Оловников с женой Н.И. Оловниковой на вручении Демидовской премии (февраль 2010 г.)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Надо признать, что АМО очень повезло в том, что, несмотря на отсутствие активного продвижения, одно из его предсказаний не только нашло экспериментальное подтверждение, но и породило новое направление науки, а ему самому принесло мировую известность. Биология теломер остается на острие науки уже несколько десятилетий, и, кажется, неисчерпаемы открытия все новых уровней регуляции теломер, какими, например, стали обнаружение теломерных транскриптов, теломерного сигналинга и многое другое. В 2009 г. АМО пережил пик популярности: группа ученых, обнаруживших и исследовавших теломеразу, получила Нобелевскую премию. АМО тоже был среди ученых, номинированных на премию, однако, как он пошутил: «Нобелевка прошла мимо кассы». Многих тогда интересовало, как он пережил такое разочарование? Однако если близко знать АМО, то будет понятно, что его взгляд на мир не предполагал обиды или разочарования. В книге Холла приводится его переписка с АМО как раз после получения американскими учеными Нобелевской премии. АМО писал, что рад подтверждению своей гипотезы, а еще тому, что вовремя опубликовал ее [21]. Написав эту работу в 1966 г., он только в 1971 г. опубликовал ее в русском журнале, а в 1973 — в международном. Зимой 2010 г. произошло приятное для него и памятное событие — получение Демидовской премии, почетной награды для ученых, учрежденной в 1831 г. промышленником П.Н. Демидовым (рис. 6). В инаугурационной лекции АМО рассказывал,

естественно, о своей основной работе, укорочении концов ДНК, взяв эпиграфом к докладу строки из стихотворения А.С. Пушкина: «...летят за днями дни, и каждый час уносит частичку бытия». Но даже на этой лекции он не преминул уточнить, что теломерная теория старения не верна, а ей на смену создана новая.

Возможно, АМО казался кому-то странным, кому-то — непонятным, необычным и сложным человеком, закрытым, если речь шла о частной жизни, но всегда очень отзывчивым и идущим на контакт, если речь шла о науке. Он очень ценил свободу — от догм, расписаний, формалистики — и, опять же, любил процитировать слова А.С. Пушкина про «праздность вольную, подругу размышленья». Мы часто, со школы, используем термин «цельная натура», и АМО, как никто другой, является примером такой натуры. Он ни в коем случае не был человеком «не от мира сего», любил свою семью, интересовался всем на свете — от политики до околонуточных сплетен, и при этом радостный и ясный свет всегда присутствовал в его жизни — это страсть к науке.

Вклад авторов. Н.И. Оловникова, И.А. Оловников, А.И. Калмыкова — написание и редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за фото Сергею Новикову (рис. 1 и 4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kisselev, L. L., Abelev, G. I., and Kisseljov, F. (1992) Lev Zilber, the personality and the scientist, *Adv. Cancer Res.*, **59**, 1-40, doi: 10.1016/S0065-230X(08)60301-2.
2. Olovnikov, A. M., and Gurvich, A. E. (1966) Immunization with protein-cellulose co-polymer (immunosorbent), *Nature*, **209**, 417-419, doi: 10.1038/209417A0.
3. Gorina, L. G., Fluor, F. S., Olovnikov, A. M., and Ezepeck, Yu. V. (1975) Use of the aggregate-hemagglutination technique for determining exoenterotoxin of *Bacillus cereus*, *Appl. Microbiol.*, **29**, 201-204, doi: 10.1128/AM.29.2.201-204.1975.
4. Abelev, G., Tsvetkov, V., Biriulina, T., El'gort, D., and Olovnikov, A. (1971) Evaluation of the use of highly sensitive methods of determining alpha-fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular cancer and teratoblastoma, *Bull. Eksp. Biol. Med.*, **71**, 75-81.
5. Olovnikov, A. M. (1966) Antigen content determined from the agglutination of erythrocytes coated with antiserum proteins polycondensed by tetranitrogen diamonodiphenylamine, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **169**, 1180-1183.
6. Olovnikov, A. M. (1967) Sensitization of erythrocytes by polycondensed proteins of immune serum and their use for determining antigen content, *Immunochemistry*, **4**, 77-80, doi: 10.1016/0019-2791(67)90157-7.
7. Olovnikov, A. M., and Tsvetkov, V. S. (1969) Detection of embryonic alpha-globulin in the serum of patients with various forms of cancer by the aggregate-hemagglutination method, *Bull. Eksp. Biol. Med.*, **68**, 102-104.
8. Купер Э. (1980) *Сравнительная иммунология* (под ред. Н. Г. Хрущева), Мир, Москва.
9. Бернет Ф. (1964) *Целостность организма и иммунитет* (под ред. В. Л. Рыжкова), Мир, Москва.
10. Оловников А. М. (1974) Об изотранспозиции трансгенов как возможном механизме возникновения многообразия антител, *Вопр. иммун.*, **6**, 71-75.
11. Оловников А. М. (1971) Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов, *ДАН СССР*, **201**, 1496-1499.
12. Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon, *J. Theor. Biol.*, **41**, 181-190, doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7.
13. Hayflick, L. (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains, *Exp. Cell. Res.*, **37**, 614-636, doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
14. Olovnikov, A. M. (1996) Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory, *Exp. Gerontol.*, **31**, 443-448, doi: 10.1016/0531-5565(96)00005-8.
15. Blackburn, E. H., and Gall, J. G. (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*, *J. Mol. Biol.*, **120**, 33-53, doi: 10.1016/0022-2836(78)90294-2.
16. Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., and Wu, J. R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6622-6626, doi: 10.1073/pnas.85.18.6622.
17. Greider, C. W. (1998) Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future, *Curr. Biol.*, **8**, R178-R181, doi: 10.1016/S0960-9822(98)70105-8.
18. Martínez, P., and Blasco, M. A. (2011) Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins, *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 161-176, doi: 10.1038/NRC3025.
19. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts, *Cell*, **43**, 405-413, doi: 10.1016/0092-8674(85)90170-9.
20. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1996) Telomeres, telomerase and cancer, *Sci. Am.*, **274**, 80-85, doi: 10.1038/scientificamerican0296-92.
21. Hall, S. S. (2003) *Merchants of Immortality: Chasing the Dream of Human Life Extension*, Mariner Books, New York.
22. Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, *Nature*, **345**, 458-460, doi: 10.1038/345458A0.
23. Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H., and Shay, J. W. (2016) Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies, *Genome Med.*, **8**, 69, doi: 10.1186/S13073-016-0324-X.
24. Pardue, M. L., Danilevskaya, O. N., Traverse, K. L., and Lowenhaupt, K. (1997) Evolutionary links between telomeres and transposable elements, *Genetica*, **100**, 73-84, doi: 10.1023/a:1018352706024.
25. Hemann, M. T., and Greider, C. W. (2000) Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4474-4478, doi: 10.1093/NAR/28.22.4474.
26. Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., and Greider, C. W. (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA, *Cell*, **91**, 25-34, doi: 10.1016/S0092-8674(01)80006-4.
27. Olovnikov, A. (2015) Chronographic theory of development, aging, and origin of cancer: role of chromosomes and printomeres, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 76-88, doi: 10.2174/1874609808666150422114916.
28. Galli, M., Frigerio, C., Longhese, M. P., and Clerici, M. (2021) The regulation of the DNA damage response at telomeres: focus on kinases, *Biochem. Soc. Trans.*, **49**, 933-943, doi: 10.1042/BST20200856.
29. Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F. D. M., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R.,

- Taschuk, M., Mann, J., and Passos, J. F. (2012) Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence, *Nat. Commun.*, **708**, 1-9, doi: 10.1038/NCOMMS1708.
30. Burbano, M. S. J., and Gilson, E. (2021) The power of stress: the telo-hormesis hypothesis, *Cells*, **1156**, 1-21, doi: 10.3390/CELLS10051156.
 31. Chakravarti, D., LaBella, K. A., and DePinho, R. A. (2021) Telomeres: history, health and hallmarks of aging, *Cell*, **184**, 306-322, doi: 10.1016/j.cell.2020.12.028.
 32. Olovnikov, A. M. (1999) Notes on a "printomere" mechanism of cellular memory and ion regulation of chromatin configurations, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 1427-1435.
 33. Olovnikov, A. M. (2003) The redusome hypothesis of aging and the control of biological time during individual development, *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 2-33, doi: 10.1023/A:1022185100035.
 34. Olovnikov, A. M. (2007) Role of paragenome in development, *Russ. J. Dev. Biol.*, **38**, 104-123, doi: 10.1134/S1062360407020075.
 35. Dilman, V. M., Revskoy, S. Y., and Golubev, A. G. (1986) Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integrated theory of aging, *Int. Rev. Neurobiol.*, **28**, 89-156, doi: 10.1016/S0074-7742(08)60107-5.
 36. Olovnikov, A. M. (1997) Towards the quantitative traits regulation: fountain theory implications in comparative and developmental biology, *Int. J. Dev. Biol.*, **41**, 923-931.
 37. Olovnikov, A. (2005) Lunasensor, infradian rhythms, telomeres, and the chromomere program of aging, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1057**, 112-132, doi: 10.1196/annals.1356.006.
 38. Olovnikov, A. M. (2007) Hypothesis: lifespan is regulated by chromomere DNA of the hypothalamus, *J. Alzheimer's Dis.*, **11**, 241-252, doi: 10.3233/jad-2007-11211.
 39. Pierpaoli, W., Dall'ara, A., Pedrinis, E., and Regelson, W. (1991) The pineal control of aging. The effects of melatonin and pineal grafting on the survival of older mice, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **621**, 291-313, doi: 10.1111/J.1749-6632.1991.TB16987.X.
 40. Pierpaoli, W. (1994) The pineal gland as ontogenetic scanner of reproduction, immunity, and aging. The aging clock, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **741**, 46-49, doi: 10.1111/J.1749-6632.1994.TB23084.X.
 41. Olovnikov, A. M. (2022) Planetary metronome as a regulator of lifespan and aging rate: the metronomic hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1640-1650, doi: 10.1134/S0006297922120197.
 42. Анисимов В. Н. (2003) «Игра в бисер» для биологов или наука послезавтра? (Рецензия на статью А.М. Оловникова «Редусомная гипотеза старения и контроля биологического времени в индивидуальном развитии»), *Биохимия*, **68**, 292-298.
 43. Turner, K. M., Deshpande, V., Beyter, D., Koga, T., Rusert, J., Lee, C., Li, B., Arden, K., Ren, B., Nathanson, D. A., et al. (2017) Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity, *Nature*, **543**, 122-125, doi: 10.1038/NATURE21356.
 44. Møller, H. D., Mohiyuddin, M., Prada-Luengo, I., Sailani, M. R., Halling, J. F., Plomgaard, P., Maretty, L., Hansen, A. J., Snyder, M. P., Pilegaard, H., and Lam, H. Y. K., Regenberg, B. (2018) Circular DNA elements of chromosomal origin are common in healthy human somatic tissue, *Nat. Commun.*, **1069**, 1-12, doi: 10.1038/S41467-018-03369-8.
 45. Chamorro González, R., Conrad, T., Stöber, M. C., Xu, R., Giurgiu, M., Rodriguez-Fos, E., Kasack, K., Brückner, L., van Leen, E., Helmsauer, K., et al. (2023) Parallel sequencing of extrachromosomal circular DNAs and transcriptomes in single cancer cells, *Nat. Genet.*, **55**, 880-890, doi: 10.1038/S41588-023-01386-Y.
 46. Olovnikov, A. M. (2022) Eco-crossover, or environmentally regulated crossing-over, and natural selection are two irreplaceable drivers of adaptive evolution: Eco-crossover hypothesis, *BioSystems*, **218**, 104706, doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104706.
 47. Olovnikov, A. M. (2009) Biological evolution based on nonrandom variability regulated by the organism, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1404-1409, doi: 10.1134/S0006297909120177.
 48. Olovnikov, A. M. (2013) Why do primordial germ cells migrate through an embryo and what does it mean for biological evolution? *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1190-1199, doi: 10.1134/S0006297913100143.
 49. Godden, A. M., and Immler, S. (2023) The potential role of the mobile and non-coding genomes in adaptive response, *Trends Genet.*, **39**, 5-8, doi: 10.1016/j.tig.2022.08.006.
 50. Olovnikov, A. (1996) Molecular mechanism of morphogenesis: a theory of locational DNA, *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 1948-1970.
 51. Vassetzky, S. G. (2008) Gelfand's seminar, *Russ. J. Dev. Biol.*, **39**, 364, doi: 10.1134/S1062360408060076.

“IF I WERE IN NATURE’S PLACE, I WOULD DO IT LIKE THIS...”.
LIFE AND HYPOTHESES OF ALEXEY OLOVNIKOV

Review

N. I. Olovnikova¹, I. A. Olovnikov^{2*}, and A. I. Kalmykova³

¹ *National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of the Russian Federation, 125167 Moscow, Russia*

² *Biovision Ventures, Luxembourg; e-mail: ivan.olovnikov@gmail.com*

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

In this article, we commemorate the life and scientific journey of the brilliant gerontologist-theorist Alexey Olovnikov (1936-2022). In 1971, he published his famous “marginotomy” hypothesis, in which he predicted the replicative shortening of telomeres and its role as a counter of cell divisions and biological age of an organism. This work put forth several remarkable assumptions, including the existence of telomerase, which were confirmed two decades later. Despite this, Alexey Olovnikov moved further in his theoretical studies of aging and proposed a series of new hypotheses that seem no less exotic than the marginotomy hypothesis once appeared. Alexey Olovnikov had an extraordinary way of looking at biological problems and, in addition to aging, authored striking concepts about development, biorhythms, and evolution.

Keywords: Olovnikov, marginotomy, telomeres, aging, printomeres, chromomeres

ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ РАЗВИТИЕМ, РОСТОМ, РАЗМЕРАМИ ТЕЛА, РАЗМНОЖЕНИЕМ, СТАРЕНИЕМ И ДОЛГОЛЕТИЕМ – КОМПРОМИССЫ И ТЕМП ЖИЗНИ

Обзор

© 2023 R. Yuan^{1*}, E. Hascup², K. Hascup^{2,3}, A. Bartke¹

¹ Southern Illinois University School of Medicine,
Department of Internal Medicine, 19628 Springfield, Illinois, USA; e-mail: ryuan@siu.edu

² Southern Illinois University School of Medicine,
Department of Medical, Microbial, Cellular Immunology and Biology, 19628 Springfield, Illinois, USA

³ Department of Neurology, Dale and Deborah Smith Center for Alzheimer's Research and Treatment,
Neuroscience Institute, Southern Illinois University School of Medicine, Springfield, Illinois, USA

Поступила в редакцию 26.07.2023

После доработки 18.10.2023

Принята к публикации 19.10.2023

Взаимосвязи между ростом, метаболизмом, воспроизводством потомства, размерами тела и процессом старения живого организма и продолжительностью его жизни изучались на протяжении десятилетий. Для объяснения наблюдаемых ассоциаций были предложены различные объединяющие «теории старения». В целом, быстрое развитие, раннее половое созревание, приводящее к ранним репродуктивным усилиям, а также рождение большого количества потомства ассоциированы с более короткой продолжительностью жизни. Связь размера тела взрослой особи и продолжительности её жизни включает в себя заметный контраст между положительной корреляцией, наблюдаемой при сравнениях между различными видами, и отрицательной корреляцией, наблюдаемой при сравнении особей одного и того же вида. В настоящей работе мы предполагаем, что продолжительность жизни и, вероятно, скорость старения связаны с «темпом жизни». Медленный темп жизни, включающий медленный рост, позднее половое созревание и небольшое количество потомства, предполагает медленное старение и долгую жизнь. Быстрый темп жизни (быстрый рост, раннее половое созревание и значительные репродуктивные усилия) ассоциируется с более быстрым старением и более короткой жизнью, предположительно из-за лежащих в их основе компромиссов. Предлагаемые взаимосвязи между темпом жизни и её продолжительностью применимы как к меж-, так и к внутривидовым сравнениям, а также к диетическим, генетическим и фармакологическим вмешательствам, которые продлевают жизнь, и к доказательствам «программирования» жизненного пути в раннем периоде жизни. Хотя имеющиеся данные свидетельствуют о существовании причинно-следственной связи для по крайней мере некоторых из этих ассоциаций, необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы подтвердить эти предположения и выявить соответствующие механизмы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, долголетие, темп жизни, компромиссы, программы развития, рост, воспроизводство, размер тела.

DOI: 10.31857/S0320972523110039, **EDN:** MOSWOS

ВВЕДЕНИЕ

Старение является частью жизненного пути почти всех живых организмов, в том числе всех людей. Это, несомненно, общеизвестный факт, и он часто служит основанием

для широко распространённого убеждения, что со старением мы ничего не можем поделать. Научные свидетельства в пользу того, что биологический процесс старения можно подвергать изменениям и что эти изменения могут способствовать укреплению здоровья и продлению жизни, были доступны на протяжении десятилетий. Однако лишь недавно эти научные данные стали постепенно включать в рамки теорий и повседневную медицинскую практику, а также в политику общественного

Принятые сокращения: GH – growth hormone, гормон роста; IGF-1 – insulin-like growth factor-1, инсулиноподобный фактор роста 1.

* Адресат для корреспонденции.

здравоохранения. В таком контексте мы считаем, что настало время рассмотреть компромиссы между развитием и старением, которые связаны с мерами по борьбе со старением, и определить механизмы, лежащие в их основе. Инновационные исследования ограничения калорийности питания на лабораторных грызунах показали, что увеличение продолжительности жизни этих животных связано с уменьшением размеров тела и подавлением фертильности. Когда молодые животные подвергались ограничению калорийности питания, скорость их роста снижалась, а половое созревание задерживалось. Сильное ограничение калорийности питания может приводить к полному подавлению репродуктивной функции, при этом принося заметные преимущества с точки зрения здоровья и долголетия. Эти и другие результаты подводят нас к вопросу о том, связаны ли различия в продолжительности жизни представителей разных биологических видов, а также особей одного и того же вида со сходными компромиссами (а возможно, и существуют благодаря им). В этой статье мы кратко рассмотрим взаимосвязи между половым созреванием и размножением, а также соматическим ростом, размером тела взрослой особи и долголетием. Кроме того, мы обсудим роль гормона роста (GH, growth hormone) и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1, insulin-like growth factor 1), ключевых регуляторов роста, созревания и размера тела взрослого организма, в контроле старения млекопитающих и взаимосвязях между «темпом жизни», биологическим процессом старения и программами развития живого организма. Наконец, мы также обсудим некоторые клеточные и молекулярные механизмы, которые могут объяснить наблюдаемые ассоциации и компромиссы.

РАЗМЕР ТЕЛА И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ: БОЛЬШИЕ МЫШИ УМИРАЮТ МОЛОДЫМИ. НО БОЛЕЕ КРУПНЫЕ МЛЕКОПИТАЮЩИЕ ЖИВУТ НАМНОГО ДОЛЬШЕ МЫШЕЙ

У млекопитающих взаимосвязи между размером тела взрослой особи и продолжительностью жизни носят очень сложный характер. В целом, более крупные виды живут дольше, а самым долгоживущим млекопитающим является огромный гренландский кит. Положительная корреляция между размером тела взрослой особи и максимальной продолжительностью жизни у всех видов млекопитающих хорошо

документирована, и она поразительна [1]. Однако есть важные исключения. Многие виды летучих мышей живут намного дольше, чем грызуны сходных размеров или землеройки [2]. Ещё одним удивительным примером повышенного долголетия является голый землекоп (*Heterocephalus glaber*). Несмотря на то что голые землекопы по размеру тела схожи с лабораторными мышами, в контролируемых лабораторных условиях они живут примерно в десять раз дольше [3]. Если рассмотреть млекопитающих, то приматы живут дольше, чем можно было бы предположить в соответствии с размерами их тела, и наш собственный вид является наиболее ярким примером. Средняя продолжительность жизни человека намного превышает таковую для гораздо более крупных жвачных и непарнокопытных, а документально подтверждённая максимальная продолжительность жизни человека (122 года) [4] превышает продолжительность жизни слонов.

Долгую жизнь крупных животных связывают со снижением риска их смертности от внешних условий, особенно смертности от хищников. Увеличение продолжительности жизни сопряжено с приобретением в процессе эволюции физиологических характеристик и репродуктивных стратегий, которые благоприятствуют долгому выживанию или совместимы с ним. Мы обсудим эти ассоциации ниже. Механически крайние значения продолжительности жизни связаны с молекулярными и клеточными механизмами защиты от рака (слоны) [5] и способностью восстанавливать повреждённую ДНК (гренландские киты) [6]. Увеличение продолжительности жизни летучих мышей, голых землекопов и приматов в прошлом связывали со снижением риска нападения хищников на животных, способных летать или жить под землёй, а также с защитой от многочисленных внешних причин смертности за счёт социальной организации в сочетании с интеллектом [2, 7]. Кроме того, исключительно долгую продолжительность жизни голых землекопов объясняют не только их специализированным подземным образом жизни, но и сопутствующей замечательной способностью переносить гипоксию и процветать в средах с ограниченным доступом кислорода, что может привести к снижению уровня окислительных повреждений [8].

В отличие от положительной корреляции размера тела и продолжительности жизни, наблюдаемой в ходе сравнения представителей различных видов млекопитающих, также имеются многочисленные примеры того, что более мелкие, а не более крупные особи одного

и того же вида живут дольше [9, 10]. Это особенно ярко и убедительно показано на лабораторных популяциях домашних мышей и домашних собак [11, 12]. Сравнение продолжительности жизни мышей из разных инбредных линий или линий, отобранных по различиям скорости роста и/или размеров тела взрослых особей [13–15], а также сравнения отдельных мышей из генетически гетерогенной популяции [11] последовательно показывают отрицательную корреляцию между размерами тела взрослых особей и их продолжительностью жизни. Более того, было показано, что мутации, вызывающие карликовость, также приводят к значительному увеличению продолжительности жизни. Мыши с гомозиготными аллелями таких мутаций могут жить на 50% дольше, чем генетически нормальные животные (дикого типа), рождённые в том же помёте и содержащиеся в идентичных условиях с точки зрения питания и факторов окружающей среды [16, 17].

Сравнение различных пород домашних собак или отдельных собак, различающихся по размеру, последовательно показывает отрицательную корреляцию между массой тела взрослой особи и продолжительностью жизни [12]. Собаки очень маленьких размеров обычно живут более 15 лет, тогда как собаки самых крупных пород вряд ли доживут до 10-летнего возраста [10, 18]. Подобные отрицательные связи размера тела и продолжительности жизни также были описаны у лабораторных крыс [19] и одомашненных лошадей [20], а также в различных популяциях человека [21]. Кроме того, было показано, что медицинские вмешательства, продлевающие продолжительность жизни, такие как лечение рапамицином в раннем возрасте, сопровождаются уменьшением размеров тела [22, 23]. Однако интерпретация данных о связи роста человека с продолжительностью жизни осложняется ролью социально-экономического статуса, питания в раннем возрасте, наличия доступа к медицинской помощи, прогресса в медицине и множества стратегий общественного здравоохранения. Следовательно, существование отрицательной корреляции между ростом человека и ожидаемой продолжительностью жизни не является общепринятым фактом и часто является предметом дискуссий [24]. Эта тема обсуждалась нами более подробно в предыдущих публикациях [25, 26].

Заслуживает внимания тот факт, что связь скорости роста и развития (ключевого элемента темпа жизни) со старением и продолжительностью жизни существенно отличается от

связи размера тела взрослой особи с теми же особенностями жизненного пути. Так, более медленный рост ассоциирован с более медленным старением и продолжительностью жизни. Это выявляется при проведении как межвидового, так и внутривидового сравнения. В то же время только при сравнении особей одного и того же вида взрослые особи меньших размеров живут дольше, чем более крупные особи. Трудно найти объяснение этому парадоксу противоположных взаимосвязей. В одной работе было показано, что уровни циркулирующего IGF-1, ключевого медиатора стимулирующего действия GH гипофиза на соматический рост, у более крупных по размерам видов неожиданно ниже, чем у мелких видов [27]. Это контрастирует с положительной корреляцией между уровнями IGF-1 и размером тела внутри одного вида [28]. Как будет отмечено далее в этой статье, мы предпочитаем другое объяснение, а именно: роль скорости роста, развития и созревания (в сочетании с продолжительностью роста и другими фенотипическими характеристиками) в программировании процесса старения и долголетия. Естественно, эти объяснения не являются взаимоисключающими, и могут быть задействованы также и другие механизмы. Например, различия в продолжительности жизни особей как одного вида, так и различных видов можно объяснить такими факторами, как динамика деления и роста клеток [29], состав клеточных мембран [30], повреждение и репарация молекул ДНК [31], а также укорочение теломера и теломеразная активность [32]. Эти механизмы, вероятно, взаимодействуют друг с другом. Кроме того, вполне вероятно, что корреляция между размером тела и продолжительностью жизни не подразумевает существование причинно-следственной связи. Вместо этого на оба эти фактора может влиять общий фактор, потенциально являющийся одним из «столпов» или «отличительных признаков» старения, что обсуждается в антагонистической плейотропной теории [33] или теории гиперфункции [34].

Медленные темпы роста могут также влиять на старение и продолжительность жизни, оказывая влияние на развитие мозга [35]. В предыдущей работе были проанализированы 493 вида млекопитающих, от грызунов до китообразных. В результате была выявлена убедительная связь: млекопитающие с более крупным мозгом по сравнению с размером тела, как правило, имеют более длительную продолжительность жизни и репродуктивный период [36]. Это наблюдение вызывает интерес

с учётом того, что более крупный мозг требует метаболических затрат и длительных фаз развития. Следовательно, естественный отбор должен благоприятствовать эволюции более крупного мозга только в том случае, если он предлагает компенсаторные преимущества. Одним из таких преимуществ является облегчение адаптивного ответа на новые или сложные социально-экологические проблемы. Эта концепция была воплощена в гипотезе «когнитивного буфера» (CBH, cognitive buffer hypothesis) [37]. Согласно этой гипотезе, более крупный мозг усиливает поведенческую адаптивность в ответ на изменяющиеся условия окружающей среды, упрощает процесс обучения и даёт видам возможность эффективно преодолевать экологические препятствия. Кроме того, эта адаптивность способствует формированию стабильных социальных групп, что соответствует гипотезе социального интеллекта (SIH, social intelligence hypothesis), которая предполагает, что виды, живущие в таких группах, сталкиваются с повышенными когнитивными потребностями, и это требует наличия более крупного мозга, чтобы справиться с тонкостями групповой жизни [38]. Действительно, стабильные социальные группы дают преимущества, включая совместную защиту, разделение ресурсов, совместную родительскую заботу и повышение репродуктивного успеха за счёт повышения выживаемости отдельных особей и потомства. Интересно, что социальная структура может играть решающую роль в формировании взаимосвязи между размером тела, воспроизводством и продолжительностью жизни. Это очевидно у эусоциальных насекомых, таких как муравьи и пчёлы, а также у млекопитающих, таких как голый землекоп. У этих видов самки в репродуктивной фазе жизни часто имеют существенно более крупные размеры тела, но живут значительно дольше, чем другие члены их сообществ. Таким образом, у этих животных увеличение репродуктивных возможностей ассоциировано с увеличением, а не уменьшением продолжительности жизни.

ГОРМОНАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ РОСТА И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ: РОЛЬ ГОРМОНА РОСТА ГИПОФИЗА В ПРОЦЕССЕ КОНТРОЛЯ СТАРЕНИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Прошло более 25 лет с тех пор, как мы предположили, что ГН играет важную роль в контроле старения млекопитающих. Наше предположение было основано на исследова-

ниях трансгенных по ГН мышей и мышей с наследственной карликовостью. Мы показали, что гигантские трансгенные мыши обладают многочисленными фенотипическими характеристиками, напоминающими старение [39], и подтвердили, что продолжительность жизни этих животных намного короче, чем у их нормальных братьев и сестёр [40]. Мы также показали, что продолжительность жизни мышей *Prop1^{df}* (карликовые мыши Ames), у которых наблюдается дефицит нескольких аденогипофизарных гормонов, включая ГН, значительно увеличивается [17]. Эти результаты подразумевают, что поддержание нормального уровня ГН-зависимой передачи сигналов влечёт за собой «издержки» с точки зрения продолжительности жизни, и что неограниченный доступ к ГН приводит к ускоренному старению. Доказательства роли ГН в контроле старения были значительно подкреплены последующей демонстрацией того, что изолированный дефицит ГН в результате делеции гормона, высвобождающего гормон роста (GHRH, growth hormone releasing hormone), который является ключевым гипоталамическим регулятором биосинтеза и секреции ГН [41], или мутации в гене рецептора GHRH (GHRHR, growth hormone releasing hormone) [42], а также делеция гена рецептора гормона роста (GHR, growth hormone receptor) [43] приводят к заметному увеличению продолжительности жизни мышей. Другими словами, ингибирования синтеза ГН или блокады его действия достаточно для увеличения продолжительности жизни. Эти исследования также показали, что продление жизни в отсутствие ГН-зависимой передачи сигналов является высоковоспроизводимым открытием и не ограничивается конкретной мутацией, генетическим фоном животных или условиями их содержания в конкретной лаборатории. Этот момент заслуживает особого внимания, поскольку в одной более ранней работе было показано сокращение, а не увеличение продолжительности жизни мышей с наследственной карликовостью [44]. В настоящее время считается, что такие результаты были вызваны условиями содержания и проблемами со здоровьем животных в соответствующей лаборатории [45–47].

Следует отметить, что в результате дополнительных исследований карликовых мышей Ames были получены доказательства того, что связь между недостаточностью ГН и большей продолжительностью жизни этих животных является причинно-следственной. Шесть недель заместительной терапии с использованием ГН, начатой в возрасте одной или двух

недель, привели к значительному сокращению продолжительности жизни этих животных [48]. Более того, большинство фенотипических характеристик, которые отличают карликовых мышей Ames от нормальных мышей (дикого типа) и, как полагают, представляют собой механизмы и/или маркеры их более медленного старения и увеличения продолжительности жизни, было полностью или почти полностью нормализовано («спасено») вследствие применения такого режима замещения GH [48–50]. Механизмы, с помощью которых применение GH в раннем возрасте изменяет фенотип и продолжительность жизни взрослых особей, почти наверняка являются эпигенетическими и включают модификации гистонов [51].

Значительное влияние дефицита GH, резистентности к нему и избытка этого гормона на продолжительность жизни лабораторных мышей вызвало множество вопросов о применимости этих результатов к другим видам, особенно к людям [52]. Патологический избыток GH при акромегалии и гигантизме снижает продолжительность жизни человека [53, 54], что повторяет результаты, полученные у гигантских трансгенных по GH мышей [55, 56]. Более того, многие симптомы этих состояний, включая повышенный риск диабета, сердечно-сосудистых заболеваний и некоторых видов рака, напоминают симптомы нормального старения. Однако в отличие от результатов, полученных на различных типах карликовых мышей, люди с изолированным дефицитом гормона роста (IGHD, isolated growth hormone deficiency) или резистентностью к GH (синдром Ларона) не живут дольше [57, 58], а в одной человеческой популяции с наследственным IGHD было зарегистрировано снижение продолжительности жизни [59]. Интересно, что хотя продолжительность жизни не увеличивается из-за генетических синдромов, которые блокируют GH-зависимую передачу сигналов, люди с резистентностью к GH или его дефицитом в значительной степени защищены от хронических заболеваний, связанных со старением, включая рак, диабет и атеросклероз. У них также наблюдается улучшение в поддержании различных физиологических функций в пожилом возрасте [60]. По крайней мере, одна популяция людей с IGHD, по-видимому, с большей вероятностью достигает исключительного долголетия [61]. Что касается средних значений продолжительности жизни, то защитное влияние дефицита GH или резистентности к нему, по-видимому, уравнивается повышенным риском ранней смертности, особенно

смертей, связанных с несчастными случаями и злоупотреблением алкоголем [25, 60]. Повышенные шансы дожить до глубокой старости были зарегистрированы также у «маленьких людей с острова Крк», популяции людей с дефицитом GH, вызванным мутацией гена *Prop1*, того же самого гена, который мутировал у долгоживущих карликовых мышей Ames [57].

В ряде недавних работ и текущих исследований рассматривалась возможная роль изменений в пределах нормального диапазона GH- и IGF-1-зависимой передачи сигналов в контроле старения человека. Было показано, что потомки семей долгожителей, выявленных в рамках Лейденского исследования долголетия [62], демонстрируют несколько благоприятных показателей здоровья по сравнению со своими партнёрами. В их числе – снижение частоты возникновения диабета, гипертонии и гиперхолестеринемии, снижение риска возникновения других распространённых возрастных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые (например, ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность и инсульт), нейродегенеративные (например, болезни Альцгеймера и Паркинсона), остеопороз, хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ), артрит, возрастная макулярная дегенерация, заболевания почек, возрастная потеря слуха и другие состояния, которые обычно ассоциируются со старением [63–68]. Важно отметить, что для потомства таких долгожителей также характерна более низкая смертность по сравнению со своими партнёрами [69]. Кроме того, было показано, что у этих людей снижена скорость секреции GH и осуществляется более «жёсткий» контроль этого процесса [62, 70]. Эти данные свидетельствуют о том, что нормальный уровень GH-зависимой передачи сигналов так же ускоряет старение у людей, как и у лабораторных домашних мышей, и что более низкие уровни GH полезны для здоровья и продолжительности жизни. Конечно, трудно исключить альтернативные интерпретации, такие как существование корегуляторов, влияющих как на секрецию GH, так и на процесс старения.

Во многих работах было рассмотрено возможное участие IGF-1 в IGF/инсулин-зависимой передаче сигналов в процессе старения человека. Была показана как положительная, так и отрицательная связь этого белка с долголетием. Подробный анализ этого сложного набора наблюдений выходит за рамки этой краткой статьи. Тем не менее мы хотели бы отметить, что вероятная причина расхождений результатов различных исследований была недавно изложена Zhang et al. Авторы проанализировали

уровни IGF-1, смертности и заболеваний, связанных со старением, включая деменцию, диабет, рак, сосудистые заболевания и остеопороз, у более 400 000 человек в возрасте от 30 до 80 лет [71]. Результаты свидетельствуют о том, что IGF-1 является нелинейным предиктором риска. Он в сочетании с возрастом изменяет риск развития различных клинических событий. В частности, у молодых людей с высоким уровнем IGF-1 наблюдался защитный эффект против заболеваний, тогда как пожилые люди с повышенным уровнем IGF-1 подвергались повышенному риску развития заболеваний или смертности [71]. Кроме того, связь между уровнем IGF-1 и риском заболевания имеет U-образную форму, указывая на то, что чрезмерно высокие и низкие уровни IGF-1 могут оказывать отрицательное влияние на восприимчивость к заболеваниям [71].

С использованием 32 инбредных линий мышей был проведён комплексный метаанализ сложного влияния IGF-1 на процесс старения, включая различные генетические варианты, половые различия и взаимодействие между IGF-1 и возрастом [72–74]. Эти линии представляют основное разнообразие генома *Mus musculus*, обеспечивая богатый источник генетических вариантов, разнообразие которого на один-два порядка превышает таковое для последовательностей, наблюдаемых в человеческих популяциях [75]. Результаты работы продемонстрировали связь между более низкими уровнями IGF-1 и увеличенной средней продолжительностью жизни у инбредных линий мышей [72]. Однако при сопоставлении уровней IGF-1 и продолжительности жизни была выявлена корреляция, специфичная для пола животного [74]. У самок более низкие уровни IGF-1 были ассоциированы с повышенным риском смерти в молодом возрасте (< 180 дней). При этом наблюдалось повышение максимальной продолжительности жизни, что давало и большие вариации продолжительности жизни. У самцов существенные изменения риска ранней смерти выявлены не были, однако более высокие уровни IGF-1 были ассоциированы с увеличением максимальной продолжительности жизни. Следовательно, у самцов более высокий уровень IGF-1 связан с повышенными вариациями продолжительности жизни [74]. Следует отметить работу, в которой было изучено влияние введения в организм самцов и самок мышей, достигших зрелого возраста (18 месяцев), антител против рецептора IGF-1 (IGF1R). Для самок мышей это воздействие повысило продолжительность жизни в здоровом состоянии и привело

к 9%-ному увеличению средней продолжительности жизни, а также к уменьшению количества новообразований и воспалений. При этом у мышей-самцов существенных изменений не наблюдалось [76]. Эти результаты ещё раз подчёркивают влияние IGF-1 на старение в зависимости от пола и указывают на важность учёта временного окна для оказания воздействия на IGF-1-зависимую передачу сигналов с целью увеличения продолжительности жизни. В частности, это поднимает интригующие вопросы о том, может ли повышение уровня IGF-1 в пожилом возрасте потенциально продлить максимальную продолжительность жизни мужчин.

РЕПРОДУКТИВНОЕ РАЗВИТИЕ, ВОЗРАСТ ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ И СТАРЕНИЕ. КОМПРОМИССЫ И РАЗЛИЧНЫЕ ЖИЗНЕННЫЕ ИСТОРИИ

Сравнение репродуктивных усилий короткоживущих и долгоживущих видов млекопитающих выявило серьёзные различия, которые предполагают наличие компромиссов. Для не долгоживущих млекопитающих характерен короткий период полового созревания и беременности, большие помёты и раннее прекращение грудного вскармливания, что связано с короткими интервалами между помётами. Например, мыши и другие мелкие грызуны могут достигать половой зрелости менее чем за два месяца и производить потомство в количестве 10–12 детёнышей с интервалом в один-два месяца. Напротив, крупные долгоживущие виды обычно демонстрируют противоположные репродуктивные характеристики: позднее половое созревание, рождение одного детёныша или очень маленького помёта, а также длительный период вскармливания. Например, жвачные и непарнокопытные (в том числе одомашненные коровы, овцы и лошади) могут не достичь половой зрелости в год своего рождения, иметь продолжительность беременности от нескольких до 11 месяцев, производить одного или, реже, двух потомков один раз в год и выкармливать их в течение нескольких месяцев. Домашние собаки демонстрируют очень большие различия в продолжительности жизни при сравнении мелких и крупных пород, а также между животными смешанных пород, различающимися по размеру тела (подробности и ссылки ранее в этой статье). Bargas-Gallaraga et al. недавно сообщили, что вклад в воспроизводство потомства негативно влияет на продолжительность жизни этого

вида, и что эту взаимосвязь нельзя объяснить корреляцией репродуктивных усилий и продолжительности жизни с размером тела [77]. Замечательное исследование жизненного пути более семи тысяч самок южных морских слонов в их естественной среде обитания выявило корреляцию между возрастом рождения первого детёныша и началом актуарного старения (определяемую как увеличение смертности с возрастом) [78]. Однако с точки зрения выживаемости и чистого репродуктивного результата самки, рано давшие потомство, превзошли в популяции тех, у которых детёныши появились позднее [78]. По-видимому, различия в индивидуальных способностях справляться с трудностями раннего возраста могут перевесить последствия компромисса между репродуктивными показателями и долголетием.

Доказательства компромисса между воспроизводством и долголетием были получены в исследованиях ограничения калорийности питания (CR, *calorie restriction*) [79] и в исследованиях, в которых варьировали состав макро- и микронутриентов пищевого рациона (в первую очередь относительное содержание белков и углеводов) [80, 81], или же этот состав определялся выбором самих подопытных животных [82, 83]. В целом, более высокое потребление калорий и белка способствовало воспроизводству потомства, но не выживанию [83]. CR может значительно увеличить продолжительность жизни большинства исследованных популяций лабораторных грызунов и может блокировать или задерживать половое созревание и приводить к бесплодию или уменьшению размера помёта и увеличению интервалов между помётами [84]. Однако эти компромиссы были тонкими и зависели от конкретных особенностей исследования. Конкретные результаты зависят от вида (например, крысы или мыши), возраста животного, в котором начинается CR, и процента снижения потребления пищи [84]. Сообщалось, что CR, помимо подавления репродуктивной функции, также вызывает замедление репродуктивного старения и повышение возраста, в котором репродуктивная функция может быть «повторно пробуждена» в результате возобновления нормального питания [85]. Задержка полового созревания, уменьшение размера помёта и увеличение интервалов между помётами, а также различные признаки задержки репродуктивного старения в сочетании со значительным увеличением продолжительности жизни наблюдались также у мышей с наследственной карликовостью [86].

Следует особо подчеркнуть связь возраста полового созревания со старением и долго-

летием. Ассоциация более раннего полового созревания с более короткой продолжительностью жизни видна при проведении сравнения как различных видов, так и особей внутри конкретного вида. Важно отметить, что возраст полового созревания у короткоживущих животных является ранним не только хронологически, но и относительно средней продолжительности жизни. Например, лабораторные мыши достигают половой зрелости в возрасте от трёх до шести недель, что составляет примерно 3–5% от их средней продолжительности жизни, тогда как люди обычно достигают половой зрелости в возрасте 12–15 лет, что соответствует 15–19% от средней продолжительности жизни. Корреляция между возрастом полового созревания и продолжительностью жизни также была обнаружена при сравнении особей или когорт (например, разных линий или пород) внутри одного и того же вида [73].

Учитывая устойчивую корреляцию, наблюдаемую между возрастом полового созревания и продолжительностью жизни, а также сложную связь между размером тела, старением и продолжительностью жизни, возникает интригующий вопрос: может ли замедление репродуктивного развития при сохранении соматического роста привести к задержке старения и увеличению продолжительности жизни? Ответ на этот вопрос является сложной задачей из-за тесно скоординированного контроля между соматическим ростом и репродуктивным развитием. Интересно, что наше недавнее исследование с участием гетерогенных мышей UM-НЕТ3, которым в раннем возрасте (15–56 дней) вводили метформин, показало, что хотя метформин увеличивал уровень циркулирующего IGF-1 и размер тела, он значительно задерживал половое созревание самок [87]. Это означает, что введение метформина потенциально может разделить регуляторные пути, контролирующие соматическое и репродуктивное развитие. Основным механизмом этого эффекта может быть связан с молекулярной функцией метформина, выражающийся в повышении активности АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК, *AMP activated protein kinase*) [88]. Размножение млекопитающих – это энергозатратный процесс, происходящий при адекватном питании [89]. АМРК – это датчик количества питательных веществ, который активируется при уменьшении соотношения АТФ/АМР или голодании. Активированная АМРК выключает пути потребления АТФ, такие как синтез белка, липогенез и глюконеогенез, и включает пути генерации АТФ,

такие как окисление жирных кислот, гликолиз и аутофагия [90]. У млекопитающих активированная АМРК на молекулярном уровне ингибирует протеинкиназу, называемую «мишень рапамицина млекопитающих» (mTOR, mammalian target of rapamycin), путём прямого фосфорилирования опухолевого супрессора комплекса туберозного склероза 2 (tumor suppressor tuberous sclerosis complex 2, TSC2) и белка, ассоциированного с регуляцией mTOR (RAPTOR, regulatory-associated protein of mTOR) [91]. Повышение уровня mTOR-зависимой передачи сигналов может значительно ускорить половое созревание самок и повысить их фертильность [92]. Важно отметить: недавно было показано, что ингибирование рапамицином mTOR-зависимой передачи сигнала подавляет репродуктивную функцию, а также увеличивает период жизни в здоровом состоянии и в целом продолжительность жизни [22, 23]. Сложные взаимосвязи между размножением, размером тела и старением до сих пор остаются не раскрытыми. Понимание роли АМРК- и mTOR-зависимой передачи сигналов в совместной регуляции процессов развития и старения представляет большой интерес. Обсуждение лежащих в основе эволюционных процессов и недавний обзор этой области исследований см. в работах Kozlowski et al., Tatar et al. и White et al. [93–95].

ПРОГРАММИРОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ВЗРОСЛОГО ОРГАНИЗМА НА РАННИХ ПЕРИОДАХ ЖИЗНИ. МОЖЕТ ЛИ ЗАМЕДЛЕНИЕ ТЕМПА ЖИЗНИ ПРИВЕСТИ К УВЕЛИЧЕНИЮ ЕЁ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ?

Интерес к роли событий, происходящих в раннем возрасте, в программировании дальнейшей жизни возник по крайней мере 64 года назад с выходом новаторской работы Waddington по «канализации» развития [96]. Эти исследования заложили основу современного понимания эпигенетических явлений и механизмов индукции фенотипических факторами окружающей среды. Исследования влияния голодания во время беременности на риск возникновения сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний у потомства во взрослом состоянии привели к появлению прочно обоснованной концепции «Истоки здоровья и болезней в процессе развития» (DOHaD, Developmental Origins of Health and Disease) [97]. Хотя большинство исследований, созвучных этой концепции, затрагивали

пагубные последствия голодания, недоедания, токсических веществ и стресса во время беременности, также были получены убедительные доказательства того, что воздействие окружающей среды, имевшее место в детском и подростковом возрасте, может иметь долгосрочные последствия для здоровья человека, включая и риск возникновения хронических заболеваний [98, 99]. Основываясь на этих выводах, можно предположить, что события раннего возраста могут определять темп жизни и ассоциированные с ним компромиссы, такие как распределение доступных ресурсов между воспроизводством потомства и процессами, способствующими долголетию.

Наши исследования влияния заместительной терапии ГН на продолжительность жизни долгоживущих карликовых мышей Ames, для которых характерен дефицит ГН, предоставили дополнительные данные в поддержку идеи программирования старения и долголетия на раннем этапе жизни [48]. В этой работе карликовым животным в возрасте одной или двух недель на протяжении шести недель вводили ГН. Это вызывало ожидаемое ускорение роста животных во время введения гормона и увеличение массы тела взрослой особи до значений, приблизительно промежуточных между массой контрольных (им вводили носитель гормона) карликов и их нормальных братьев и сестёр (мыши дикого типа). Как упоминалось ранее в этой статье, различные фенотипические характеристики, связанные с «отличительными признаками» («столпами») старения, включая маркеры глиоза головного мозга, инсулин плазмы крови, адипонектин, кетоновые тела и липидные профили, измеренные примерно через год или даже позже после завершения терапии ГН, полностью (или почти полностью) приходили в норму. Они больше не отличались от значений, измеренных у контрольных животных дикого типа, получавших физиологический раствор [48–50]. Более того, поразительная продолжительность жизни этих мышей была значительно снижена в результате шести недель введения ГН в раннем возрасте [48]. По-видимому, это эндокринное вмешательство в раннем возрасте привело к долгосрочным, вероятно, необратимым физиологическим изменениям, отражающим глубокие изменения в жизненном пути (и/или способствующим им). Механизмы, лежащие в основе этого явления, почти наверняка связаны с эпигенетикой. Согласно имеющимся на сегодняшний день данным, можно предположить, что они включают модификации гистонов [51].

ТЕМП ЖИЗНИ И СТАРЕНИЕ. СВЯЗЬ РАННЕГО РОСТА И РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ УСИЛИЙ С ДОЛГОЛЕТИЕМ

В предыдущих разделах этой статьи мы обсудили доказательства роли компромиссов роста, созревания и размножения в контроле старения, а также участие GH и IGF-1 в обеспечении этих компромиссов. Также были упомянуты парадоксальные различия между отношением размера тела взрослой особи и продолжительностью жизни при сравнении особей между видами и внутри них. Картина, которая вытекает из имеющихся данных, согласуется с концепцией программирования старения в процессе развития, которая подтверждается многими экспериментальными данными, а также теоретическими соображениями [96, 100–104]. В частности, в исследованиях, проведённых на мышах [105], собаках [106] и с участием людей [107, 108], более быстрый ранний рост и большая масса тела молодых особей были ассоциированы с более высокой заболеваемостью и смертностью. На лабораторных мышах было показано, что фармакологические вмешательства, влияющие на ранний соматический рост, оказывают большое влияние на продолжительность жизни животных. Шиндяпина и коллеги показали, что введение рапамицина генетически разнообразным мышам UMNET3 в течение первых 45 дней постнатальной жизни приводило к снижению скорости их роста и увеличению продолжительности жизни (средней), а также, что важно, продолжительности жизни в здоровом состоянии [22]. Как упоминалось ранее, относительно короткий период введения GH в раннем возрасте ускорял рост и снижал продолжительность жизни у карликовых мышей Ames [48]. Также увеличение продолжительности жизни при действии рапамицина в раннем возрасте было достигнуто у мелкого (планктонного) ракообразного (дафния) и у плодовой мушки дрозофилы [22, 23]. Как и в случае с ранним темпом роста, раннее половое созревание отрицательно связано с продолжительностью жизни в различных исследованиях [73].

Что, по нашему мнению, заслуживает особого внимания, так это то, что взаимная связь между продолжительностью жизни и ключевыми элементами темпа жизни, а именно: ростом, созреванием и репродуктивными усилиями, наблюдается при сравнениях между различными видами млекопитающих, а также между различными линиями, породами и особями внутри одного вида. Это резко контрастирует

со связью между продолжительностью жизни и размером тела взрослой особи, которая в этих сравнениях скорее обратная, чем прямая. Интересно, что различия в темпе жизни коррелируют с различиями в продолжительности жизни и у людей очень низкого роста. Таким образом, низкий рост, обусловленный изолированным дефицитом GH в когорте Itabaianinha (Итабаянинья, Бразилия) или резистентностью к GH, связан с медленным темпом жизни (медленный рост, задержка полового созревания и снижение фертильности), защитой от различных возрастных заболеваний и состояний, приводящих к «здоровому старению», а также с нормальной продолжительностью жизни [25, 109]. В то же время низкий рост в различных популяциях пигмеев ассоциирован с быстрым темпом жизни (быстрое развитие и ранний возраст первой беременности) и очень короткой продолжительностью жизни [110]. Особенно ярким примером взаимной связи между темпом и продолжительностью жизни является африканская рыба нотобранх Фурцера (*Nothobranchius furzeri*), обитающая в эфемерных водоёмах. Икринки этих замечательных животных выживают в почве после высыхания прудов, и мальки рыб вылупляются в тот момент, когда пруд восстанавливается к следующему сезону дождей. Молодые рыбы развиваются со скоростью, которую называют «взрывной», быстро размножаются и стареют, что приводит к тому, что средняя продолжительность их жизни составляет от четырёх до шести месяцев, являясь самой короткой среди всех позвоночных [111]. Важно отметить, что быстрое старение и ранняя гибель наблюдаются и у содержащихся в неволе рыб этого вида, в аквариумах, которые, разумеется, сезонно не пересыхают, а рыбы обеспечены надёжным запасом пищи [112]. Это указывает на генетическую приспособленность вида к его естественной среде обитания.

В определение темпа жизни обычно входит скорость основного обмена, а медленный обмен веществ часто связан с задержкой старения. Однако продолжительность жизни определяется не просто скоростью обмена веществ. Наиболее ярким примером этого являются сравнение показателей млекопитающих и птиц. У птиц скорость метаболизма выше, чем у млекопитающих того же размера, но они живут дольше, а не меньше. Это может быть связано со снижением внешней смертности организмов, которые, летая, могут избегать хищников и других рисков окружающей среды [113, 114]. Интересно, что среднесуточная скорость метаболизма, измеряемая потреблением кислорода на единицу массы тела, у долгоживущих мышей

с генетически обусловленным дефицитом GH или резистентных к нему, увеличивается, а не снижается [115]. Анализ и интерпретация данных энергетического метаболизма осложняются различиями между скоростью основного метаболизма, скоростью метаболизма в состоянии покоя и расходом энергии или скоростью «полевого» метаболизма, а также разными способами представления биоэнергетических данных. Мы рассматривали эти сложные вопросы в более ранних публикациях [116–118].

Чтобы понять компромиссы между размером тела, воспроизводством, старением и долголетием, необходимы дальнейшие исследования, которые позволят понять основные механизмы и то, что они значат для здоровья человека и старения. Включение этих знаний в медицинскую практику и политику общественного здравоохранения может способствовать укреплению здоровья и увеличению продолжительности жизни в будущем.

Вклад авторов. Rong Yuan и Andrzej Bartke являются авторами идеи рукописи. Rong Yuan

и Andrzej Bartke написали рукопись при участии всех авторов. Erin Hascup и Kevin Hascup отредактировали рукопись и участвовали в её обсуждении.

Благодарности. Приносим извинения тем, чьи работы по обсуждаемым в статье вопросам не были процитированы из-за ограничений формата или их непреднамеренного пропуска. Мы благодарны Лизе Хенсли за редакционную помощь.

Финансирование. Эта работа была поддержана Инициативой исследований гериатрии на медицинском факультете SIU (AB) и Национальными институтами здравоохранения (гранты R01 AG057767, R01 AG061937), Центром исследований и лечения болезни Альцгеймера Дейла и Деборы Смит, а также Фондом Кеннета Старка (ERN и КН).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Speakman, J. R. (2005) Body size, energy metabolism and lifespan, *J. Exp. Biol.*, **208**, 1717–1730, doi: 10.1242/jeb.015556.
2. Brunet-Rossinni, A. K., and Austad, S. N. (2004) Ageing studies on bats: a review, *Biogerontology*, **5**, 211–222, doi: 10.1023/B:BGEN.0000038022.65024.d8.
3. Ruby, J. G., Smith, M., and Buffenstein, R. (2018) Naked mole-rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age, *Elife*, **7**, e31157, doi: 10.7554/eLife.31157.
4. Santrock, J. (2007) Life Expectancy, in *A topical Approach to: Lifespan Development*, The McGraw-Hill Companies, Inc, New York. pp 128–132.
5. Abegglen, L. M., Caulin, A. F., Chan, A., Lee, K., Robinson, R., Campbell, M. S., Kiso, W. K., Schmitt, D. L., Waddell, P. J., Bhaskara, S., Jensen, S. T., Maley, C. C., and Schiffman, J. D. (2015) Potential mechanisms for cancer resistance in elephants and comparative cellular response to DNA damage in humans, *JAMA*, **314**, 1850–1860, doi: 10.1001/jama.2015.13134.
6. Keane, M., Semeiks, J., Webb, A. E., Li, Y. I., Quesada, V., Craig, T., Madsen, L. B., van Dam, S., Brawand, D., Marques, P. I., Michalak, P., Kang, L., Bhak, J., Yim, H. S., Grishin, N. V., Nielsen, N. H., Heide-Jorgensen, M. P., Oziolor, E. M., Matson, C. W., Church, G. M., et al. (2015) Insights into the evolution of longevity from the bowhead whale genome, *Cell Rep.*, **10**, 112–122, doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.008.
7. Buffenstein, R. (2005) The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **60**, 1369–1377, doi: 10.1093/gerona/60.11.1369.
8. Park, T. J., Smith, E. S. J., Reznick, J., Bennett, N. C., Applegate, D. T., Larson, J., and Lewin, G. R. (2021) African naked mole-rats demonstrate extreme tolerance to hypoxia and hypercapnia, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1319**, 255–269, doi: 10.1007/978-3-030-65943-1_9.
9. Bartke, A., Sun, L. Y., and Longo, V. (2013) Somatotrophic signaling: trade-offs between growth, reproductive development, and longevity, *Physiol. Rev.*, **93**, 571–598, doi: 10.1152/physrev.00006.2012.
10. Greer, K. A., Canterberry, S. C., and Murphy, K. E. (2007) Statistical analysis regarding the effects of height and weight on life span of the domestic dog, *Res. Vet. Sci.*, **82**, 208–214, doi: 10.1016/j.rvsc.2006.06.005.
11. Miller, R. A., Harper, J. M., Galecki, A., and Burke, D. T. (2002) Big mice die young: early life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice, *Aging Cell*, **1**, 22–29, doi: 10.1046/j.1474-9728.2002.00006.x.
12. Kraus, C., Pavard, S., and Promislow, D. E. (2013) The size-life span trade-off decomposed: why large dogs die young, *Am. Nat.*, **181**, 492–505, doi: 10.1086/669665.
13. Bartke, A. (2003) Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice, *Neuroendocrinology*, **78**, 210–216, doi: 10.1159/000073704.

14. Roberts, R. C. (1961) The lifetime growth and reproduction of selected strains of mice, *Heredity*, **16**, 369-381, doi: 10.1038/hdy.1961.46.
15. Eklund, J., and Bradford, G. E. (1977) Longevity and lifetime body weight in mice selected for rapid growth, *Nature*, **265**, 48-49, doi: 10.1038/265048b0.
16. Bartke, A., Wright, J. C., Mattison, J. A., Ingram, D. K., Miller, R. A., and Roth, G. S. (2001) Extending the lifespan of long-lived mice, *Nature*, **414**, 412, doi: 10.1038/35106646.
17. Brown-Borg, H. M., Borg, K. E., Meliska, C. J., and Bartke, A. (1996) Dwarf mice and the aging process, *Nature*, **384**, 33, doi: 10.1038/384033a0.
18. Patronek, G. J., Waters, D. J., and Glickman, L. T. (1997) Comparative longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **52**, B171-B178, doi: 10.1093/gerona/52a.3.b171.
19. Rollo, C. D. (2002) Growth negatively impacts the life span of mammals, *Evol. Dev.*, **4**, 55-61, doi: 10.1046/j.1525-142x.2002.01053.x.
20. Brosnahan, M. M., and Paradis, M. R. (2003) Demographic and clinical characteristics of geriatric horses: 467 cases (1989-1999), *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **223**, 93-98, doi: 10.2460/javma.2003.223.93.
21. Samaras, T. T., and Elrick, H. (1999) Height, body size and longevity, *Acta Med. Okayama*, **53**, 149-169.
22. Shindyapina, A. V., Cho, Y., Kaya, A., Tyshkovskiy, A., Castro, J. P., Deik, A., Gordevicius, J., Poganik, J. R., Clish, C. B., Horvath, S., Peshkin, L., and Gladyshev, V. N. (2022) Rapamycin treatment during development extends life span and health span of male mice and *Daphnia magna*, *Sci. Adv.*, **8**, eabo5482, doi: 10.1126/sciadv.abo5482, doi: 10.1126/sciadv.abo5482.
23. Aiello, G., Sabino, C., Pernici, D., Audano, M., Antonica, F., Giancesello, M., Ballabio, C., Quattrone, A., Mitro, N., Romanel, A., Soldano, A., and Tiberi, L. (2022) Transient rapamycin treatment during developmental stage extends lifespan in *Mus musculus* and *Drosophila melanogaster*, *EMBO Rep.*, **23**, e55299, doi: 10.15252/embr.202255299.
24. Vangipurapu, J., Stancáková, A., Jauhiainen, R., Kuusisto, J., and Laakso, M. (2017) Short adult stature predicts impaired β -cell function, insulin resistance, glycemia, and type 2 diabetes in finnish men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **102**, 443-450, doi: 10.1210/jc.2016-2933.
25. Aguiar-Oliveira, M. H., and Bartke, A. (2019) Growth hormone deficiency: health and longevity, *Endocr. Rev.*, **40**, 575-601, doi: 10.1210/er.2018-00216.
26. Bartke, A. (2017) Somatic growth, aging, and longevity, *NPJ Aging Mech. Dis.*, **3**, 14, doi: 10.1038/s41514-017-0014-y.
27. Stuart, J. A., and Page, M. M. (2010) Plasma IGF-1 is negatively correlated with body mass in a comparison of 36 mammalian species, *Mech. Ageing Dev.*, **131**, 591-598, doi: 10.1016/j.mad.2010.08.005.
28. Yakar, S., Wu, Y., Setser, J., and Rosen, C. J. (2002) The role of circulating IGF-I: lessons from human and animal models, *Endocrine*, **19**, 239-248, doi: 10.1385/ENDO:19:3:239.
29. Tomasetti, C., Poling, J., Roberts, N. J., London, N. R., Jr., Pittman, M. E., Haffner, M. C., Rizzo, A., Baras, A., Karim, B., Kim, A., Heaphy, C. M., Meeker, A. K., Hruban, R. H., Iacobuzio-Donahue, C. A., and Vogelstein, B. (2019) Cell division rates decrease with age, providing a potential explanation for the age-dependent deceleration in cancer incidence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 20482-20488, doi: 10.1073/pnas.1905722116.
30. Papsdorf, K., Miklas, J. W., Hosseini, A., Cabruja, M., Morrow, C. S., Savini, M., Yu, Y., Silva-Garcia, C. G., Haseley, N. R., Murphy, L. M., Yao, P., de Launoit, E., Dixon, S. J., Snyder, M. P., Wang, M. C., Mair, W. B., and Brunet, A. (2023) Lipid droplets and peroxisomes are co-regulated to drive lifespan extension in response to mono-unsaturated fatty acids, *Nat. Cell Biol.*, **25**, 672-684, doi: 10.1038/s41556-023-01136-6.
31. MacRae, S. L., Croken, M. M., Calder, R. B., Aliper, A., Milholland, B., White, R. R., Zhavoronkov, A., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., Gorbunova, V., Zhang, Z. D., and Vijg, J. (2015) DNA repair in species with extreme lifespan differences, *Aging (Albany NY)*, **7**, 1171-1184, doi: 10.18632/aging.100866.
32. Adwan Shekhidem, H., Sharvit, L., Leman, E., Manov, I., Roichman, A., Holtze, S., Huffman, D., Cohen, H., Hildebrandt, T., Shams, I., and Atzmon, G. (2019) Telomeres and longevity: a cause or an effect? *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3233, doi: 10.3390/ijms20133233.
33. Mitteldorf, J. (2019) What is antagonistic pleiotropy? *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1458-1468, doi: 10.1134/S0006297919120058.
34. Gems, D. (2022) The hyperfunction theory: an emerging paradigm for the biology of aging, *Ageing Res. Rev.*, **74**, 101557, doi: 10.1016/j.arr.2021.101557.
35. Sakai, T., Matsui, M., Mikami, A., Malkova, L., Hamada, Y., Tomonaga, M., Suzuki, J., Tanaka, M., Miyabe-Nishiwaki, T., Makishima, H., Nakatsukasa, M., and Matsuzawa, T. (2013) Developmental patterns of chimpanzee cerebral tissues provide important clues for understanding the remarkable enlargement of the human brain, *Proc. Biol. Sci.*, **280**, 20122398, doi: 10.1098/rspb.2012.2398.
36. Gonzalez-Lagos, C., Sol, D., and Reader, S. M. (2010) Large-brained mammals live longer, *J. Evol. Biol.*, **23**, 1064-1074, doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.01976.x.
37. Allman, J., McLaughlin, T., and Hakeem, A. (1993) Brain weight and life-span in primate species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 118-122, doi: 10.1073/pnas.90.1.118.
38. Dunbar, R. I. (2009) The social brain hypothesis and its implications for social evolution, *Ann Hum Biol.*, **36**, 562-572, doi: 10.1080/03014460902960289.
39. Bartke, A., Turyn, D., Aguilar, C. C., Sotelo, A. I., Steger, R. W., Chen, X. Z., and Kopchick, J. J. (1994)

- Growth hormone (GH) binding and effects of GH analogs in transgenic mice, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **206**, 190-194, doi: 10.3181/00379727-206-43740.
40. Bartke, A., Brown-Borg, H. M., Bode, A. M., Carlson, J., Hunter, W. S., and Bronson, R. T. (1998) Does growth hormone prevent or accelerate aging? *Exp. Gerontol.*, **33**, 675-687, doi: 10.1016/s0531-5565(98)00032-1.
 41. Sun, L. Y., Spong, A., Swindell, W. R., Fang, Y., Hill, C., Huber, J. A., Boehm, J. D., Westbrook, R., Salvatori, R., and Bartke, A. (2013) Growth hormone-releasing hormone disruption extends lifespan and regulates response to caloric restriction in mice, *Elife*, **2**, e01098, doi: 10.7554/eLife.01098.
 42. Coschigano, K. T., Holland, A. N., Riders, M. E., List, E. O., Flyvbjerg, A., and Kopchick, J. J. (2003) Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span, *Endocrinology*, **144**, 3799-3810, doi: 10.1210/en.2003-0374.
 43. Coschigano, K. T., Clemmons, D., Bellush, L. L., and Kopchick, J. J. (2000) Assessment of growth parameters and lifespan of GHR/BP gene-disrupted mice, *Endocrinology*, **141**, 2608-2613, doi: 10.1210/endo.141.7.7586.
 44. Fabris, N., Pierpaoli, W., and Sorkin, E. (1972) Lymphocytes, hormones, and ageing, *Nature*, **240**, 557-559, doi: 10.1038/240557a0.
 45. Silberberg, R. (1972) Articular aging and osteoarthritis in dwarf mice, *Pathol. Microbiol.*, **38**, 417-430, doi: 10.1159/000162458.
 46. Schneider, G. B. (1976) Immunological competence in Snell-Bagg pituitary dwarf mice: response to the contact-sensitizing agent oxazolone, *Am. J. Anat.*, **145**, 371-394, doi: 10.1002/aja.1001450306.
 47. Shire, J. G. (1973) Growth hormone and premature ageing, *Nature*, **245**, 215-216, doi: 10.1038/245215a0.
 48. Sun, L. Y., Fang, Y., Patki, A., Koopman, J. J., Allison, D. B., Hill, C. M., Masternak, M. M., Darcy, J., Wang, J., McFadden, S., and Bartke, A. (2017) Longevity is impacted by growth hormone action during early postnatal period, *Elife*, **6**, e24059, doi: 10.7554/eLife.24059.
 49. Sadagurski, M., Landeryou, T., Cady, G., Kopchick, J. J., List, E. O., Berryman, D. E., Bartke, A., and Miller, R. A. (2015) Growth hormone modulates hypothalamic inflammation in long-lived pituitary dwarf mice, *Aging Cell*, **14**, 1045-1054, doi: 10.1111/acer.12382.
 50. Li, X., McPherson, M., Hager, M., Fang, Y., Bartke, A., and Miller, R. A. (2022) Transient early life growth hormone exposure permanently alters brain, muscle, liver, macrophage, and adipocyte status in long-lived Ames dwarf mice, *FASEB J.*, **36**, e22394, doi: 10.1096/fj.202200143R.
 51. Zhang, F., Icyuz, M., Bartke, A., and Sun, L. Y. (2020) The effects of early-life growth hormone intervention on tissue specific histone H3 modifications in long-lived Ames dwarf mice, *Aging (Albany NY)*, **13**, 1633-1648, doi: 10.18632/aging.202451.
 52. Colao, A., Ferone, D., Marzullo, P., and Lombardi, G. (2004) Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management, *Endocr. Rev.*, **25**, 102-152, doi: 10.1210/er.2002-0022.
 53. Jadresic, A., Banks, L. M., Child, D. F., Diamant, L., Doyle, F. H., Fraser, T. R., and Joplin, G. F. (1982) The acromegaly syndrome. Relation between clinical features, growth hormone values and radiological characteristics of the pituitary tumours, *Quart. J. Med.*, **51**, 189-204.
 54. Orme, S. M., McNally, R. J., Cartwright, R. A., and Belchetz, P. E. (1998) Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. United Kingdom Acromegaly Study Group, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 2730-2734, doi: 10.1210/jcem.83.8.5007.
 55. Pendergrass, W. R., Li, Y., Jiang, D., and Wolf, N. S. (1993) Decrease in cellular replicative potential in "giant" mice transfected with the bovine growth hormone gene correlates to shortened life span, *J. Cell Physiol.*, **156**, 96-103, doi: 10.1002/jcp.1041560114.
 56. Wolf, E., Kahnt, E., Ehrlein, J., Hermanns, W., Brem, G., and Wanke, R. (1993) Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: lessons from transgenic animal models, *Mech. Ageing Dev.*, **68**, 71-87, doi: 10.1016/0047-6374(93)90141-d.
 57. Aguiar-Oliveira, M. H., Oliveira, F. T., Pereira, R. M., Oliveira, C. R., Blackford, A., Valenca, E. H., Santos, E. G., Gois-Junior, M. B., Meneguz-Moreno, R. A., Araujo, V. P., Oliveira-Neto, L. A., Almeida, R. P., Santos, M. A., Farias, N. T., Silveira, D. C., Cabral, G. W., Calazans, F. R., Seabra, J. D., Lopes, T. F., Rodrigues, E. O., et al. (2010) Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**, 714-721, doi: 10.1210/jc.2009-1879.
 58. Laron, Z. (2011) Life span and mortality of patients with Laron Syndrome, in *Laron syndrome – from Man to Mouse : Lessons from Clinical and Experimental Experience* (Laron, Z., and Kopchick, J. J., eds) 1 Edn., Springer, Berlin, Heidelberg, doi: 10.1007/978-3-642-11183-9_41.
 59. Besson, A., Salemi, S., Gallati, S., Jenal, A., Horn, R., Mullis, P. S., and Mullis, P. E. (2003) Reduced longevity in untreated patients with isolated growth hormone deficiency, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 3664-3667, doi: 10.1210/jc.2002-021938.
 60. Guevara-Aguirre, J., Balasubramanian, P., Guevara-Aguirre, M., Wei, M., Madia, F., Cheng, C. W., Hwang, D., Martin-Montalvo, A., Saavedra, J., Ingles, S., de Cabo, R., Cohen, P., and Longo, V. D. (2011) Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans, *Sci. Transl. Med.*, **3**, 70ra13, doi: 10.1126/scitranslmed.3001845.

61. Krzysnik, C., Grguric, S., Cvijovic, K., and Laron, Z. (2010) Longevity of the hypopituitary patients from the island Krk: a follow-up study, *Pediatr. Endocrinol. Rev.*, **7**, 357-362.
62. Schoenmaker, M., de Craen, A. J., de Meijer, P. H., Beekman, M., Blauw, G. J., Slagboom, P. E., and Westendorp, R. G. (2006) Evidence of genetic enrichment for exceptional survival using a family approach: the Leiden Longevity Study, *Eur. J. Hum. Genet.*, **14**, 79-84, doi: 10.1038/sj.ejhg.5201508.
63. Rosing, M. P., Westendorp, R. G., de Craen, A. J., Frollich, M., de Goeij, M. C., Heijmans, B. T., Beekman, M., Wijsman, C. A., Mooijaart, S. P., Blauw, G. J., Slagboom, P. E., and van Heemst, D. (2010) Favorable glucose tolerance and lower prevalence of metabolic syndrome in offspring without diabetes mellitus of nonagenarian siblings: the Leiden longevity study, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **58**, 564-569, doi: 10.1111/j.1532-5415.2010.02725.x.
64. De Goeij, M. C., Halbesma, N., Dekker, F. W., Wijsman, C. A., van Heemst, D., Maier, A. B., Mooijaart, S. P., Slagboom, P. E., Westendorp, R. G., and de Craen, A. J. (2014) Renal function in familial longevity: the Leiden Longevity Study, *Exp. Gerontol.*, **51**, 65-70, doi: 10.1016/j.exger.2013.12.012.
65. Kroft, L. J., van der Bijl, N., van der Grond, J., Altmann-Schneider, I., Slagboom, P. E., Westendorp, R. G., de Roos, A., and de Craen, A. J. (2014) Low computed tomography coronary artery calcium scores in familial longevity: the Leiden Longevity Study, *Age (Dordr)*, **36**, 9668, doi: 10.1007/s11357-014-9668-6.
66. Altmann-Schneider, I., de Craen, A. J. M., Slagboom, P. E., Westendorp, R. G. J., van Buchem, M. A., Maier, A. B., and van der Grond, J. (2012) Brain tissue volumes in familial longevity: the Leiden Longevity Study, *Aging Cell*, **11**, 933-939, doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00868.x.
67. Altmann-Schneider, I., van der Grond, J., Slagboom, P. E., Westendorp, R. G., Maier, A. B., van Buchem, M. A., and de Craen, A. J. (2013) Lower susceptibility to cerebral small vessel disease in human familial longevity: the Leiden Longevity Study, *Stroke*, **44**, 9-14, doi: 10.1161/STROKEAHA.112.671438.
68. Stijntjes, M., de Craen, A. J. M., van Heemst, D., Meskers, C. G. M., van Buchem, M. A., Westendorp, R. G. J., Slagboom, P. E., and Maier, A. B. (2013) Familial longevity is marked by better cognitive performance at middle age: The Leiden Longevity Study, *PLoS One*, **8**, e57962, doi: 10.1371/journal.pone.0057962.
69. Westendorp, R. G., van Heemst, D., Rosing, M. P., Frollich, M., Mooijaart, S. P., Blauw, G. J., Beekman, M., Heijmans, B. T., de Craen, A. J., and Slagboom, P. E. for the Leiden Longevity Study Group (2009) Nonagenarian siblings and their offspring display lower risk of mortality and morbidity than sporadic nonagenarians: The Leiden Longevity Study, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **57**, 1634-1637, doi: 10.1111/j.1532-5415.2009.02381.x.
70. Van der Spoel, E., Jansen, S. W., Akintola, A. A., Ballieux, B. E., Cobbaert, C. M., Slagboom, P. E., Blauw, G. J., Westendorp, R. G. J., Pijl, H., Roelfsema, F., and van Heemst, D. (2016) Growth hormone secretion is diminished and tightly controlled in humans enriched for familial longevity, *Aging Cell*, **15**, 1126-1131, doi: 10.1111/accel.12519.
71. Zhang, W. B., Ye, K., Barzilai, N., and Milman, S. (2021) The antagonistic pleiotropy of insulin-like growth factor 1, *Aging Cell*, **20**, e13443, doi: 10.1111/accel.13443.
72. Yuan, R., Tsaih, S. W., Petkova, S. B., Marin de Esvikova, C., Xing, S., Marion, M. A., Bogue, M. A., Mills, K. D., Peters, L. L., Bult, C. J., Rosen, C. J., Sundberg, J. P., Harrison, D. E., Churchill, G. A., and Paigen, B. (2009) Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels, *Aging Cell*, **8**, 277-287, doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00478.x.
73. Yuan, R., Meng, Q., Nautiyal, J., Flurkey, K., Tsaih, S. W., Krier, R., Parker, M. G., Harrison, D. E., and Paigen, B. (2012) Genetic coregulation of age of female sexual maturation and lifespan through circulating IGF1 among inbred mouse strains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 8224-8229, doi: 10.1073/pnas.1121113109.
74. Yuan, R., Musters, C. J. M., Zhu, Y., Evans, T. R., Sun, Y., Chesler, E. J., Peters, L. L., Harrison, D. E., and Bartke, A. (2020) Genetic differences and longevity-related phenotypes influence lifespan and lifespan variation in a sex-specific manner in mice, *Aging Cell*, **19**, e13263, doi: 10.1111/accel.13263.
75. Ideraabdullah, F. Y., de la Casa-Esperon, E., Bell, T. A., Detwiler, D. A., Magnuson, T., Sapienza, C., and de Villena, F. P. (2004) Genetic and haplotype diversity among wild-derived mouse inbred strains, *Genome Res.*, **14**, 1880-1887, doi: 10.1101/gr.2519704.
76. Mao, K., Quipildor, G. F., Tabrizian, T., Novaj, A., Guan, F., Walters, R. O., Delahaye, F., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Ejima, K., Li, P., Allison, D. B., Salimi-Moosavi, H., Beltran, P. J., Cohen, P., Barzilai, N., and Huffman, D. M. (2018) Late-life targeting of the IGF-1 receptor improves healthspan and lifespan in female mice, *Nat. Commun.*, **9**, 2394, doi: 10.1038/s41467-018-04805-5.
77. Bargas-Galarraga, I., Vila, C., and Gonzalez-Voyer, A. (2023) High investment in reproduction is associated with reduced life span in dogs, *Am. Nat.*, **201**, 163-174, doi: 10.1086/722531.
78. Oosthuizen, W. C., Peron, G., Pradel, R., Bester, M. N., and de Bruyn, P. J. N. (2021) Positive early-late life-history trait correlations in elephant seals, *Ecology*, **102**, e03288, doi: 10.1002/ecy.3288.
79. Shanley, D. P., and Kirkwood, T. B. (2000) Calorie restriction and aging: a life-history analysis, *Evolution*, **54**, 740-750, doi: 10.1111/j.0014-3820.2000.tb00076.x.
80. Solon-Biet, S. M., Walters, K. A., Simanainen, U. K., McMahon, A. C., Ruohonen, K., Ballard, J. W. O.,

- Raubenheimer, D., Handelsman, D. J., Le Couteur, D. G., and Simpson, S. J. (2015) Macronutrient balance, reproductive function, and lifespan in aging mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3481-3486, doi:10.1073/pnas.1422041112.
81. Senior, A. M., Solon-Biet, S. M., Cogger, V. C., Le Couteur, D. G., Nakagawa, S., Raubenheimer, D., and Simpson, S. J. (2019) Dietary macronutrient content, age-specific mortality and lifespan, *Proc. Biol. Sci.*, **286**, 20190393, doi: 10.1098/rspb.2019.0393.
82. Simpson, S. J., Clissold, F. J., Lihoreau, M., Ponton, F., Wilder, S. M., and Raubenheimer, D. (2015) Recent advances in the integrative nutrition of arthropods, *Annu. Rev. Entomol.*, **60**, 293-311, doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020917.
83. Simpson, S. J., Le Couteur, D. G., Raubenheimer, D., Solon-Biet, S. M., Cooney, G. J., Cogger, V. C., and Fontana, L. (2017) Dietary protein, aging and nutritional geometry, *Ageing Res. Rev.*, **39**, 78-86, doi: 10.1016/j.arr.2017.03.001.
84. Weindruch, R., and Walford, R. L. (1988) *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*, Charles C. Thomas, Springfield, IL.
85. Merry, B. J., and Holehan, A. M. (1979) Onset of puberty and duration of fertility in rats fed a restricted diet, *J. Reprod. Fertil.*, **57**, 253-259, doi: 10.1530/jrf.0.0570253.
86. Bartke, A., Brown-Borg, H., Mattison, J., Kinney, B., Hauck, S., and Wright, C. (2001) Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice, *Exp. Gerontol.*, **36**, 21-28, doi: 10.1016/S0531-5565(00)00205-9.
87. Zhu, Y., Fang, Y., Medina, D., Bartke, A., and Yuan, R. (2022) Metformin treatment of juvenile mice alters aging-related developmental and metabolic phenotypes, *Mech. Ageing Dev.*, **201**, 111597, doi: 10.1016/j.mad.2021.111597.
88. Kulkarni, A. S., Gubbi, S., and Barzilai, N. (2020) Benefits of metformin in attenuating the hallmarks of aging, *Cell Metab.*, **32**, 15-30, doi: 10.1016/j.cmet.2020.04.001.
89. Dupont, J., Reverchon, M., Bertoldo, M. J., and Froment, P. (2014) Nutritional signals and reproduction, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **382**, 527-537, doi: 10.1016/j.mce.2013.09.028.
90. Hardie, D. G. (2007) AMP-activated/SNFI protein kinases: conserved guardians of cellular energy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 774-785, doi: 10.1038/nrm2249.
91. Shaw, R. J. (2009) LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth, *Acta Physiol. (Oxf)*, **196**, 65-80, doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01972.x.
92. Guo, Z., and Yu, Q. (2019) Role of mTOR signaling in female reproduction, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **10**, 692, doi: 10.3389/fendo.2019.00692.
93. Kozłowski, J., Konarzewski, M., and Czarneński, M. (2020) Coevolution of body size and metabolic rate in vertebrates: a life-history perspective, *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*, **95**, 1393-1417, doi: 10.1111/brv.12615.
94. Tatar, M. (2023) Stalking the link between reproduction and aging, *EMBO Rep.*, **24**, e57374, doi: 10.15252/embr.202357374.
95. White, C. R., Alton, L. A., Bywater, C. L., Lombardi, E. J., and Marshall, D. J. (2022) Metabolic scaling is the product of life-history optimization, *Science*, **377**, 834-839, doi: 10.1126/science.abm7649.
96. Waddington, C. H. (1959) Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters, *Nature*, **183**, 1654-1655, doi: 10.1038/1831654a0.
97. Silveira, P. P., Portella, A. K., Goldani, M. Z., and Barbieri, M. A. (2007) Developmental origins of health and disease (DOHaD), *J. Pediatr. (Rio J)*, **83**, 494-504, doi: 10.2223/JPED.1728.
98. Vaiserman, A. M. (2015) Epigenetic programming by early-life stress: evidence from human populations, *Dev. Dynamics*, **244**, 254-265, doi: 10.1002/dvdy.24211.
99. Hargreaves, D., Mates, E., Menon, P., Alderman, H., Devakumar, D., Fawzi, W., Greenfield, G., Ham-moudeh, W., He, S., Lahiri, A., Liu, Z., Nguyen, P. H., Sethi, V., Wang, H., Neufeld, L. M., and Patton, G. C. (2022) Strategies and interventions for healthy adolescent growth, nutrition, and development, *Lancet*, **399**, 198-210, doi: 10.1016/S0140-6736(21)01593-2.
100. Waddington, C. H. (2014) *The Strategy of the Genes*, Routledge, doi: 10.4324/9781315765471.
101. Austad, S. N., and Hoffman, J. M. (2018) Is antagonistic pleiotropy ubiquitous in aging biology? *Evol. Med. Public Health*, **2018**, 287-294, doi: 10.1093/emph/eoy033.
102. Kirkwood, T. B., and Rose, M. R. (1991) Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **332**, 15-24, doi: 10.1098/rstb.1991.0028.
103. Feltes, B. C., de Faria Poloni, J., and Bonatto, D. (2015) Development and aging: two opposite but complementary phenomena, *Interdiscip. Top. Gerontol.*, **40**, 74-84, doi: 10.1159/000364932.
104. Blagosklonny, M. V. (2022) Rapamycin treatment early in life reprograms aging: hyperfunction theory and clinical practice, *Aging (Albany NY)*, **14**, 8140-8149, doi: 10.18632/aging.204354.
105. Parra-Vargas, M., Ramon-Krauel, M., Lerin, C., and Jimenez-Chillaron, J. C. (2020) Size does matter: litter size strongly determines adult metabolism in rodents, *Cell Metab.*, **32**, 334-340, doi: 10.1016/j.cmet.2020.07.014.
106. Wang, T., Ma, J., Hogan, A. N., Fong, S., Licon, K., Tsui, B., Kreisberg, J. F., Adams, P. D., Carvunis, A. R., Bannasch, D. L., Ostrander, E. A., and Ideker, T. (2020) Quantitative translation of dog-to-human aging by conserved remodeling of the DNA methylome, *Cell Syst.*, **11**, 176-185.e176, doi: 10.1016/j.cels.2020.06.006.
107. Dietz, W. H. (1998) Childhood weight affects adult morbidity and mortality, *J. Nutr.*, **128**, 411s-414s, doi: 10.1093/jn/128.2.411S.

108. Maffei, C., and Tatò, L. (2001) Long-term effects of childhood obesity on morbidity and mortality, *Hormone Res.*, **55 Suppl 1**, 42-45, doi: 10.1159/000063462.
109. Aguiar-Oliveira, M. H., and Salvatori, R. (2012) Life-time Growth Hormone (GH) Deficiency: Impact on Growth, Metabolism, Body Composition, and Survival Capacity, in *Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease* (Preedy, V. R., ed.) Springer New York, New York, NY, pp. 2699-2710, doi: 10.1007/978-1-4419-1795-9_160.
110. Migliano, A. B., Vinicius, L., and Lahr, M. M. (2007) Life history trade-offs explain the evolution of human pygmies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20216-20219, doi: 10.1073/pnas.0708024105.
111. Terzibasi, E., Lefrancois, C., Domenici, P., Hartmann, N., Graf, M., and Cellerino, A. (2009) Effects of dietary restriction on mortality and age-related phenotypes in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*, *Aging Cell*, **8**, 88-99, doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00455.x.
112. Reichard, M., and Polačik, M. (2019) *Nothobranchius furzeri*, an 'instant' fish from an ephemeral habitat, *eLife*, **8**, e41548, doi: 10.7554/eLife.41548.
113. Holmes, D. J., and Austad, S. N. (1995) Birds as animal models for the comparative biology of aging: a prospectus, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **50**, B59-B66, doi: 10.1093/gerona/50a.2.b59.
114. Harper, J. M., and Holmes, D. J. (2021) New perspectives on avian models for studies of basic aging processes, *Biomedicine*, **9**, 649, doi: 10.3390/biomedicine9060649.
115. Darcy, J., and Bartke, A. (2017) Functionally enhanced brown adipose tissue in Ames dwarf mice, *Adipocyte*, **6**, 62-67, doi: 10.1080/21623945.2016.1274470.
116. Westbrook, R., Bonkowski, M. S., Strader, A. D., and Bartke, A. (2009) Alterations in oxygen consumption, respiratory quotient, and heat production in long-lived GHRKO and Ames dwarf mice, and short-lived bGH transgenic mice, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **64**, 443-451, doi: 10.1093/gerona/gln075.
117. Darcy, J., Fang, Y., Hill, C. M., McFadden, S., Sun, L. Y., and Bartke, A. (2016) Original Research: Metabolic alterations from early life thyroxine replacement therapy in male Ames dwarf mice are transient, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **241**, 1764-1771, doi: 10.1177/1535370216650292.
118. Bartke, A., Brannan, S., Hascup, E., Hascup, K., and Darcy, J. (2021) Energy metabolism and aging, *World J. Mens Health*, **39**, 222-232, doi: 10.5534/wjmh.200112.

RELATIONSHIPS AMONG DEVELOPMENT, GROWTH, BODY SIZE, REPRODUCTION, AGING, AND LONGEVITY – TRADE-OFFS AND PACE-OF-LIFE

Review

R. Yuan^{1*}, E. Hascup², K. Hascup^{2,3}, and A. Bartke¹

¹ Southern Illinois University School of Medicine, Department of Internal Medicine, 19628 Springfield, Illinois, USA; e-mail: ryuan@siumed.edu

² Southern Illinois University School of Medicine, Department of Medical, Microbial, Cellular Immunology and Biology, 19628 Springfield, Illinois, USA

³ Department of Neurology, Dale and Deborah Smith Center for Alzheimer's Research and Treatment, Neuroscience Institute, Southern Illinois University School of Medicine, Springfield, Illinois, USA

Relationships of growth, metabolism, reproduction, and body size to the biological process of aging and longevity have been studied for decades and various unifying “theories of aging” have been proposed to account for the observed associations. In general, fast development, early sexual maturation leading to early reproductive effort, as well as production of many offspring, have been linked to shorter lifespans. The relationship of adult body size to longevity includes a remarkable contrast between the positive correlation in comparisons between different species and the negative correlation seen in comparisons of individuals within the same species. We now propose that longevity and presumably also the rate of aging are related to the “pace-of-life.” A slow pace-of-life including slow growth, late sexual maturation, and a small number of offspring, predicts slow aging and long life. The fast pace of life (rapid growth, early sexual maturation, and major reproductive effort) is associated with faster aging and shorter life, presumably due to underlying trade-offs. The proposed relationships between the pace-of-life and longevity apply to both inter- and intra-species comparisons as well as to dietary, genetic, and pharmacological interventions that extend life and to evidence for early life programming of the trajectory of aging. Although available evidence suggests the causality of at least some of these associations, much further work will be needed to verify this interpretation and to identify mechanisms that are responsible.

Keywords: aging, longevity, pace-of-life, trade-offs, developmental programming, growth, reproduction, body size

ОЛОВНИКОВ, ТЕЛОМЕРЫ И ТЕЛОМЕРАЗА. ВОЗМОЖНО ЛИ ПРОДЛЕНИЕ ЗДОРОВОЙ ЖИЗНИ?

Обзор

© 2023 Е.Е. Егоров

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: yegorov58@gmail.com

Поступила в редакцию 20.07.2023

После доработки 29.08.2023

Принята к публикации 31.08.2023

Наука о теломерах и теломеразе сделала огромный прогресс за последние десятилетия. В этом обзоре мы рассматриваем ее сначала в историческом контексте (цепочка открытий Каррель → Хейфлик → Оловников → Блекборн), а затем рассматриваем современные знания об устройстве и динамике теломер в норме и патологии. Центральной темой обзора являются последствия укорочения теломер, включая теломерный эффект положения, сигнал повреждения ДНК и увеличение генетической нестабильности. Отдельно рассматривается клеточная сенильность и роль длины теломер в ее развитии. Также обсуждаются терапевтические аспекты и риски применения теломеразы и других способов удлинения теломер.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: теломеры, теломераза, старение, канцерогенез, Оловников, теломерный кризис, клеточное старение, воспалительное старение, генетическая нестабильность.

DOI: 10.31857/S0320972523110040, EDN: MMNSJH

ИСТОРИЧЕСКОЕ ВВЕДЕНИЕ

Цитологи называют теломерами концевые участки хромосом, видимые в световом микроскопе. Это очень большие структуры, охватывающие районы в миллионы пар оснований ДНК. Впервые описания теломер как особых структур, обеспечивающих целостность хромосом, появились в работах Меллера, выполненных на хромосомах дрозофилы в 1938 г. [1], и в работах МакКлинток, выполненных на хромосомах кукурузы в 1938–1941 гг. [2–4]. Суть этих ранних наблюдений заключается в том, что разорванная хромосома остается нестабильной до тех пор, пока не обретет новую теломеру либо за счет рекомбинации, либо *de novo*. Современные биологи называют теломерами значительно меньшие концевые районы хромосом — длиной тысячи нуклеотидных пар.

Идея о стабилизации линейной хромосомы за счет особой организации концевой области, хотя и осознавалась учеными, но не была особо плодотворной. Драйвером изучения теломер послужили исследования о смертных и бессмертных клетках.

Еще в XIX веке после многочисленных доказательств клеточной теории стало ясно, что существуют смертные и бессмертные клетки многоклеточных организмов, в том числе человека. Бессмертные клетки должны быть, поскольку живые организмы, являясь продуктом длительной эволюции, до сих пор живы. При этом наши клетки умирают, в том числе и программным образом. Ранние опыты по культивированию клеток указывали на потенциальное бессмертие клеток. Опыты по серийной трансплантации опухолевых клеток в перитонеальных полостях крыс (конец XIX века) [5], потом известный опыт Алексиса Карреля, когда клетки цыпленка непрерывно размножались 30 лет, создали не совсем верное представление о бессмертии клеток [6].

Ретроспективно мы понимаем, что опыты, демонстрирующие смертность клеток в культуре, мало информативны. Такой результат всегда можно объяснить технической ошибкой. В качестве яркого примера можно привести с большим трудом опубликованную работу Леонарда Хейфлика, которая говорила о том, что «в наших руках клетки не способны к бесконечному делению» [7].

Будущий нобелевский лауреат Пейтон Раус (Peyton Rous) в качестве рецензии написал всего одно слово — «чужь» [8]. Тем не менее «предел Хейфлика» оказался реальным, а термин стал общепринятым.

Главной причиной устойчивости мнения о том, что культивируемые клетки бессмертны, была известность Карреля. Автор идеи делать органы из клеток пациента, чтобы избежать отторжения (еще до открытия групп крови), автор сосудистого шва (Нобелевская премия 1912 г.), изобретатель массы приспособлений для трансплантации и стерильной работы — он был чрезвычайно авторитетен. Фактически, им была разработана технология первичной хирургической обработки ран во время Первой мировой войны, что спасло тысячи жизней. В то же время он был человеком, предложившим «гуманный и экономичный способ утилизации неполноценных людей в газовых камерах» («should be humanely and economically disposed of in small euthanasic institutions supplied with proper gases»), что было реализовано уже во время Второй мировой войны. После 1945 г. в 20 городах Франции были обратно переименованы улицы, названные в честь Карреля. Французы очень не любили тех, кто сотрудничал с нацистами [9–11].

Итак, обнаруженное в опытах Хейфлика ограничение пролиферативного потенциала должно было найти объяснение. После того, как в общих чертах стали ясны механизмы репликации ДНК, появилась гипотеза, предлагающая механизм работы такого счетчика. В 1971 г. Алексей Оловников предложил «принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов», который заключается в том, что ДНК-полимераза не в состоянии полностью реплицировать линейную матрицу, реплика получается всегда короче в начальной ее части [12]. Постепенное укорачивание ДНК (недорепликация) ограничивает пролиферативный потенциал клеток и может служить основой счетчика клеточных делений в опытах Хейфлика. В той же работе было постулировано, что в бессмертных клетках должен существовать фермент, который достраивает хромосомные концы.

Подобный фермент, впоследствии названный теломеразой, был обнаружен в 1985 г. в клетках простейшего [13]. Авторы в то время посчитали, что обнаруженный ими в клетках инфузории фермент нужен только для репликации особых теломер этого простейшего. Позже они (Нобелевские лауреаты Элизабет Блекборн и Кэрол Грейдер) вспоминали: «Мы не знали об идеях Оловникова до 1988 г., когда

Кальвин Харли рассказал о них Грейдер. Заинтригованные, Грейдер, Харли и их коллеги решили выяснить, не происходит ли со временем укорочение хромосом в клетках человека» [14].

Уже в следующем 1989 г. теломераза была обнаружена в клетках человека, и было обнаружено изменение длины теломер человека в процессе развития. Через год было выявлено укорочение теломер при старении клеток. В 1998 г. было доказано, что экспрессия теломеразы, индуцированная путем введения гена, ведет к иммортализации клеток.

Помимо провидческих статей Оловникова 1971 и 1973 гг., можно выделить несколько других его важных работ. Несколько месяцев назад Алексея Матвеевича не стало, и при написании исторической части обзора хотелось бы особенно остановиться на некоторых его гипотезах: подтвержденных и нет. Во-первых, мало кто вспоминает, что Оловников предположил, что, помимо недорепликации, к укорочению теломер может приводить и недорепарация [15, 16]. Действительно, впоследствии было обнаружено, что теломеры укорачиваются с разной скоростью (из расчета на деление) в зависимости от условий культивирования клеток [17, 18]. Таким образом, укорочение теломер превращается не в простой счетчик делений, а в суммарный показатель, учитывающий различные факторы, в том числе условия окислительного стресса.

Во-вторых, примерно на границе тысячелетий Оловников выдвинул гипотезу о существовании перихромосомных частиц, представляющих собой копии сегментов хромосом [19]. Было предположено, что транскрипция этих частиц дает некие короткие РНК, управляющие многими процессами, связанными с пространственной и временной регуляцией генов и перестройкой хроматина. Были введены термины: редусомы, хрономеры, принтомеры, фонтанная РНК и др. Эта гипотеза до сих пор ждет своего подтверждения. Отдаленным аналогом таких частиц можно считать TERRA (см. далее).

Следует отметить, что научные события, связанные с изучением клеточного бессмертия, приобрели широкую известность в силу их интенсивного освещения массовой прессой. Автор данной статьи узнал о пресловутых 50 делениях, на которые способны клетки человека, из газеты «За рубежом». Термин «предел Хейфлика» вошел в энциклопедии. В отличие от Хейфлика и Карреля, работы Оловникова были мало известны, в том числе из-за оторванности советской науки от мирового процесса. Только перевод работы 1971 г.

(через 2 года) на английский [20] позволил познакомиться с ней мировую общественность. И это сработало через 15 лет, приведя к взрывному росту количества работ на тему роли теломера и старения во всем мире и в итоге — к Нобелевской премии, но не А.М. Оловникову.

ТЕЛОМЕРЫ

Теломеры являются концами хромосом, поэтому они должны быть упакованы так, чтобы системы репарации не путали их с двунитевыми обрывами. Для этого в ходе

эволюции появились теломерные последовательности, имеющие способность сворачиваться специальным образом, и специализированные белки, которые защищают эти «обрывы». У людей и всех позвоночных теломерная ДНК представлена последовательностью 5'-(TTAGGG) n -3' [21]. На концах теломер человека имеются одноцепочечные 3'-участки длиной около 100–150 нуклеотидов [22] (рис. 1).

Этот одноцепочечный участок имеется как в клетках с теломеразой, так и без нее, поэтому не может быть объяснен теломеразной активностью. Присутствие этого свободного

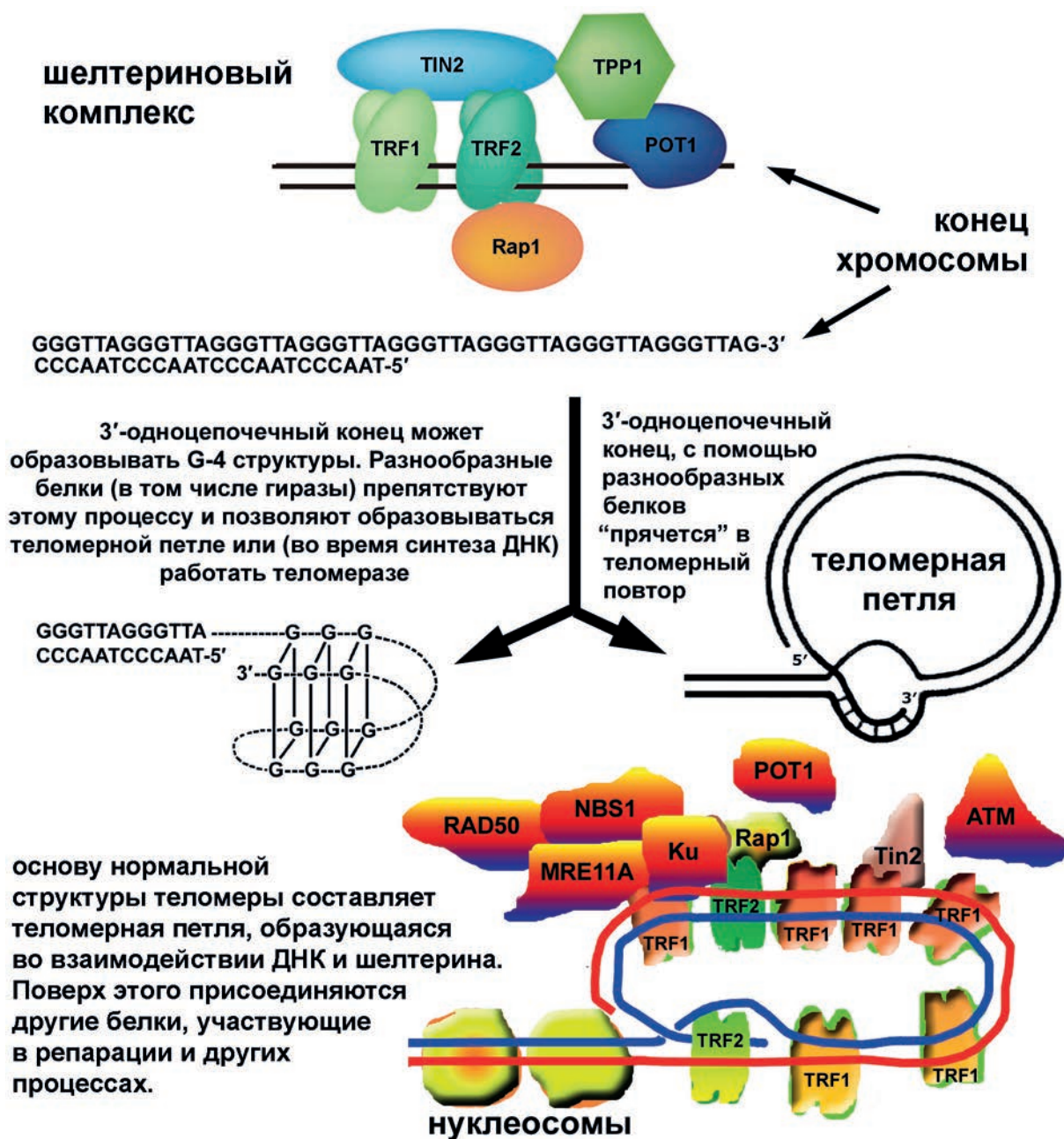


Рис. 1. Сильно упрощенная схема организации теломер

3'-конца является прямым следствием концевой недорепликации, а именно: удаления 5'-концевой РНК-затравки на противоположной цепи и невозможность ее заполнить ДНК-полимеразой при репликации.

Как следует из структуры, этот одонитевой участок содержит повторяющиеся кластеры из трех гуанинов (GGG). Расчеты показывают, что такая последовательность легко образует неканонические структуры (триплексы, квадруплексы). G-4-структуры (квадруплексы) могут быть интрамолекулярными, бимолекулярными и даже тетрамолекулярными, то есть соединяющими 4 нити ДНК. Нити в них могут быть параллельными и антипараллельными. Считается, что для образования квадруплекса требуется минимум 12 гуанинов [23].

Существует альтернативная, более широко принятая модель поведения одноцепочечного 3'-конца ДНК. Эксперименты группы De Lange позволили предложить модель теломеры, основанную на теломерной петле [24]. Согласно ей, одноцепочечный конец вместе с белками взаимодействует с двойной спиралью теломерной ДНК. Таким образом, формируется теломерная петля. Длина этой петли коррелирует с длиной теломерного повтора, измеренной независимыми методами.

Шесть белков, присутствующих в теломерах, образуют комплекс, который получил название шелтерин. Два белка (TRF1 и TRF2) связывают двуцепочечные районы теломерной ДНК, два белка (POT1 и TPP1) связывают одноцепочечную ДНК, а еще два белка (TIN2 и Rap1) не имеют (по крайней мере у человека) ДНК-связывающих сайтов [25, 26] (рис. 1).

Несмотря на то что теломерные районы ДНК лишены последовательностей, кодирующих белки, они транскрибируются. При этом образуется длинная некодирующая РНК TERRA (TElomeric Repeat-containing RNA) [27, 28]. Экспрессия TERRA инициируется в субтеломерных областях [29]. Таким образом, она содержит субтеломерные последовательности с 5'-конца и теломерные повторы UUAGGG — на 3'-конце [30].

Различные события, ведущие к изменению экспрессии TERRA, сильно отражаются на длине теломер [31, 32]. Например, экспрессия TERRA очень чувствительна к стрессам [33, 34] и зависит от эпигенетических изменений в субтеломерных областях [35]. Интересно, что TERRA в большом количестве обнаруживается в составе экзосом плазмы и способна модулировать воспалительный ответ [36]. Также экспрессия TERRA меняется при прогерии Хатчинсона—Гилфорда [37].

В целом, однако, пока не сложилась понятная картина функционирования TERRA. Ясно, что экспрессия TERRA влияет на массу очень разнородных клеточных реакций, включая поддержание теломер, состояние хроматина, ответ на стресс, индукцию воспаления. Интенсивно изучают участие TERRA в канцерогенезе. Читателю можно рекомендовать свежие статьи [38–42].

ТЕЛОМЕРАЗА

Теломераза является обратной транскриптазой со встроенной РНК-матрицей для синтеза теломерного повтора. Основу фермента составляет белковая часть human telomerase reverse transcriptase (hTERT) и РНК-компонент (hTERC). Малая часть hTERC содержит матрицу для синтеза теломерной ДНК [43]. Фермент работает в виде большого комплекса с молекулярной массой около полумиллиона дальтон. В комплекс входят hTERT, hTERC, дискерин, TCAB1, а также временно ассоциированные белки (pontin, reptin) и шапероны HSP90 и TRiC [44].

Как и было предсказано в гипотезе Оловникова, теломераза экспрессируется в половых, стволовых и раковых клетках. В последнем случае наблюдается активация hTERT, которая в нормальных соматических клетках практически отсутствует. В сравнительно небольшом проценте случаев (в зависимости от тканевого происхождения рака) раковые клетки активируют альтернативный механизм поддержания теломер (ALT), основанный на рекомбинации.

Ограничивающим скорость работы компонентом теломеразы у человека является белок hTERT. Ген, кодирующий hTERT, имеет общую длину около 37 кб и состоит из 16 экзон и 15 интронов. У человека описано 20 вариантов сплайсинга *hTERT* [45], некоторые из которых сильно влияют на теломеразную активность [46]. Сплайсинг *hTERT* меняется не только в процессе развития, но и при канцерогенезе [47].

Другим способом регуляции активности теломеразы является транскрипционный. Промотор *hTERT* содержит множество сайтов связывания факторов транскрипции. Среди наиболее изученных регуляторов можно выделить с-Мус, рецептор эстрогена, HIF-1, NF- κ B, Menin, STAT3/5, MAD1, ETS, Sp1/3, USF, NFX1 и др. [48]. Присутствие сайтов для многочисленных активаторов и репрессоров предполагает очень сложную систему регуляции экспрессии гена (рис. 2).

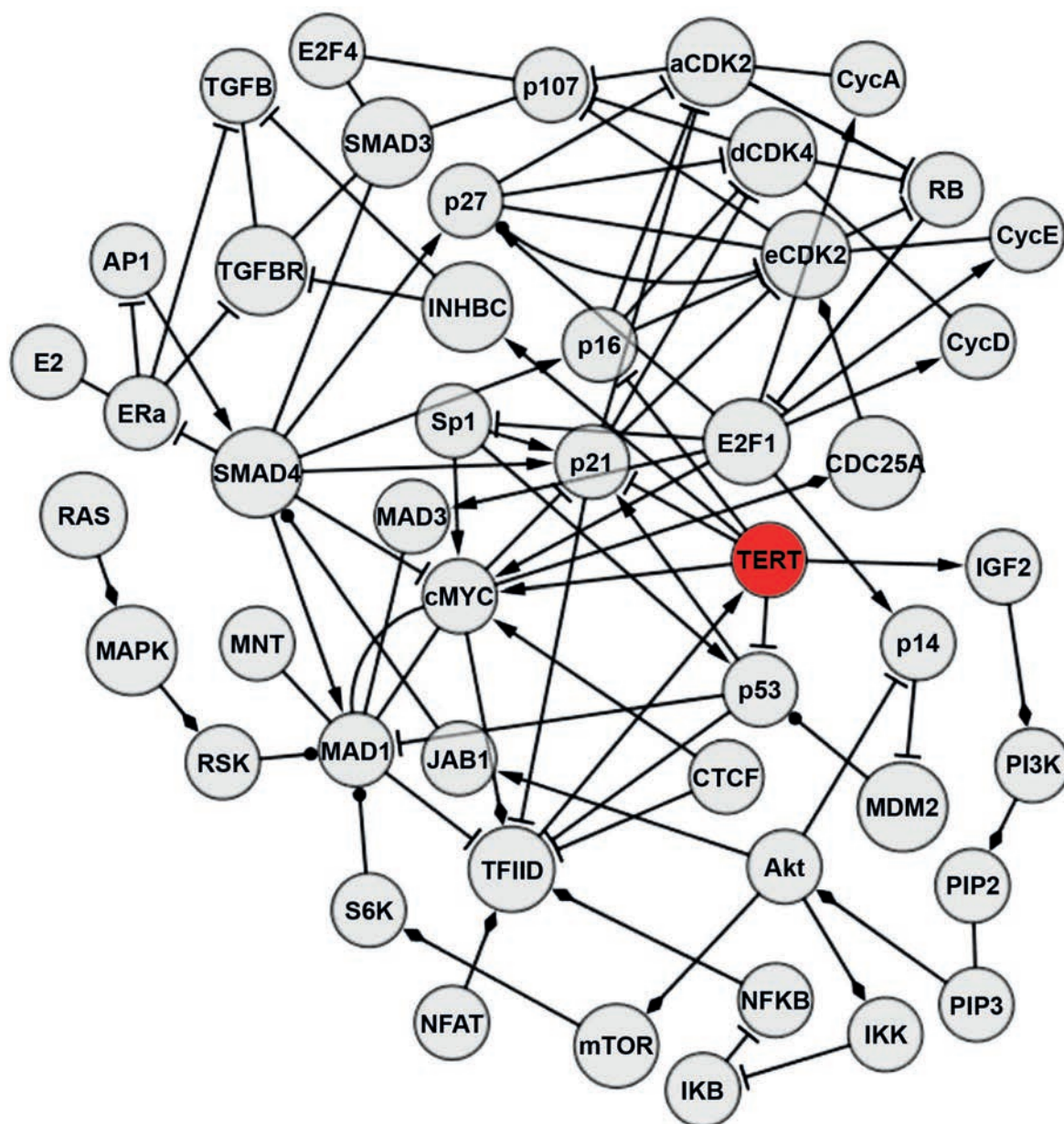


Рис. 2. Частичный интерактом в регуляции hTERT (из работы [49])

Помимо транскрипции и сплайсинга, регуляция теломеразной активности может происходить за счет посттрансляционных модификаций, включая фосфорилирование [50]. Способность теломеразы удлинять теломеры зависит также от многих факторов, включая локализацию внутри ядра или в цитоплазме, а также состояния хроматина [51]. Теломераза должна проходить этап созревания в тельцах Кахаля, где содержится TCAB1 [52, 53]. Подавление активности может достигаться за счет задержки теломеразы в ядрышке.

Регуляция hTERT главным образом связана с клеточным циклом. В ней участвуют комплексы циклинов/циклинзависимых ки-

наз (cdk), регулирующие транскрипционные факторы, которые связываются с промотором *hTERT*. В циклическом характере регуляции двойную роль играет E2F-1, выступая как репрессор и активатор. Каскады PI3K/Akt, NF-κB и MAP-киназ активируют hTERT. Фосфорилирование p107 комплексом циклинов/cdk, а также связывание эстрогена с его рецептором E_{ra} снимают тормозящие влияния каскада TGF-β. Через положительную обратную связь экспрессия hTERT активирует каскад PI3K/Akt, который, в свою очередь, активирует клеточный цикл посредством MAD1 и деградации p53, активирует каскад NF-κB и блокирует каскад TGF-β.

ВНЕХРОМОСОМНЫЕ ФУНКЦИИ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Со временем стали накапливаться данные о действии теломеразы, которые трудно объяснить только через влияние на хромосомы. Например, усиленная экспрессия mTERT (мышинная теломераза) способствует канцерогенезу и заживлению ран [54]. Усиленная экспрессия теломеразы изменяет функции стволовых клеток [55]. Удивительный результат был получен при введении гена *hTERT* в клетки пациента, страдающего болезнью Ниманна–Пика, редким наследственным заболеванием, характеризующимся нарушением липидного метаболизма. Введение *hTERT* нормализовало фенотип клеток [56]. Было также показано, что теломераза влияет на активность генов гликолиза [57], стимулирует транскрипцию генов, ассоциированных с эпителио-мезенхимальным переходом (vimentin и snail) [58]. Теломераза может влиять на работу NF-κB-зависимых генов, то есть участвовать в регуляции воспаления [59]. Описано взаимное влияние hTERT на каскад Wnt [60].

В условиях окислительного стресса hTERT действует как редокс-регулятор, перемещаясь в митохондрии, где защищает митохондриальную ДНК и способствует поддержанию уровня антиокислительных ферментов [61]. Не совсем ясен вопрос о том, происходит ли передвижение hTERT из ядра в митохондрии или ново-синтезированный белок идет в митохондрии напрямую.

Экспрессия *hTERT* участвует в эпигенетической регуляции, влияя на фактор STAT3, который активирует ДНК-метилтрансферазу I [62]. В 2009 г. был обнаружен факт, что белок hTERT способен образовывать комплекс не только с hTERC, но и с RMRP (RNA component of mitochondrial RNA-processing endoribonuclease) [63]. Такой комплекс обладает

РНК-зависимой РНК-полимеразной активностью, продуцируя длинные двуцепочечные РНК. Мутации RMRP ассоциированы с болезнью гипоплазии хряща и волос у человека [64]. Высказываются предположения, что hTERT может формировать аналогичные комплексы с другими РНК [65]. Нами было показано ранее, что даже без РНК теломеразный белок обладает нематричной ДНК-полимеразной активностью [66]. Впоследствии эти данные были подтверждены [67].

ЧТО ПРОИСХОДИТ, КОГДА ТЕЛОМЕРЫ УКОРАЧИВАЮТСЯ?

В теории маргинотомии Оловникова было предложено, что триггером к остановке делений и смерти клеток является затрагивание субтеломерных генов, критических для функционирования клетки. Это предположение в прямом виде не было подтверждено, что послужило одним из пунктов, подтолкнувших Оловникова к созданию новой гипотезы старения. Тем не менее при концевой недорепликации происходит укорочение ДНК, и это имеет явные физиологические последствия. Какова же связь между этими явлениями? На данный момент мы можем ясно видеть по крайней мере три различных механизма воздействия укорачивания теломер на клетки, которые в общем виде не совпадают между собой.

Теломерный эффект положения. В 2001 г. впервые был описан эффект изменения экспрессии генов, расположенных рядом с теломерой при изменении ее длины [68]. В качестве объяснения предлагалась гипотеза «гетерохроматинового чулка», который в общем виде можно описать следующим образом: теломерные последовательности имеют особую хроматиновую упаковку и особые эпигенетические



Рис. 3. Гипотеза петлевого строения теломер. Теломерная ДНК вместе с теломер-связывающими белками может формировать петли. В силу ограничения свободного вращения ДНК и взаимодействия с разнообразными белками ДНК в петле имеет напряженную конформацию. При укорачивании теломерной ДНК наступает момент, когда длина теломерного повтора не позволяет образоваться петле. Теломерный конец ДНК приобретает свободную конформацию, которая воспринимается клеткой как сигнал повреждения

изменения, и действие этой упаковки распространяется на близлежащие гены.

Позже был описан аналогичный эффект, но уже на отдаленно расположенные гены [69, 70]. Здесь предполагается похожее объяснение: теломеры влияют на экспрессию генов, расположенных в пространстве рядом с ними, в результате образования хромосомной петли.

Многолетние исследования теломерного эффекта положения пока не выглядят очень убедительными, хотя ряд находок вызывает большой интерес. Например, ген *hTERT* подвержен теломерному эффекту положения, что открывает целый ряд гипотетических механизмов, как длина теломер может поддерживаться при старении и раке [71]. Описано по крайней мере три механизма регуляции экспрессии *hTERT* с помощью образования хроматиновых или теломерных петель [72]. Наконец, нельзя не отметить то, что при укорачивании теломер усиливается экспрессия гена *ISG15* (interferon stimulated gene 15), который способен усиливать воспаление, стимулируя продукцию IFN γ [69]. Таким образом, возникает прямая связь между старением и воспалением, что свидетельствует в пользу теории воспалительного старения (inflammaging).

Появление сигнала повреждения ДНК.

После критического укорачивания теломер возникает сигнал повреждения ДНК. Клетки человека останавливают пролиферацию при средней длине теломер в несколько тысяч нуклеотидов (то есть отнюдь не полном их укорочении) и переходят в особое состояние, которое в англоязычной литературе называют «cell senescence». На русском языке это явление можно называть клеточной сенильностью, чтобы отличать от старения клеток (cell aging).

Вероятно, существует некая минимальная длина теломеры, позволяющая правильно упаковать конец хромосомы так, чтобы он отличался от разрыва ДНК. Еще в 1997 г. — за два года до обнаружения теломерных петель [24] — мы предположили гипотезу о петлевой структуре теломер [73] (рис. 3).

Существует большая гетерогенность по длине теломер не только между клетками, но и в пределах одной клетки. Поэтому критическое укорочение, которое вызывает ответ на повреждение ДНК (DNA damage response, DDR), обычно касается лишь небольшой части теломер. Этого оказывается достаточно для индукции клеточной сенильности [74, 75].

При этом в большинстве исследований длины теломер в основном фигурируют данные о некоей средней длине теломер. Такие измерения делают с помощью разных методов:

Саузерн-блот-анализа рестрикционных фрагментов, ПЦР, цифрового ПЦР, количественного FISH, FISH-цитометрии. Изредка применяют более сложные методы, позволяющие фиксировать длины отдельных, в том числе самых коротких, теломер (STELA, TeSLA) [76–78]. Развитие технологии уже позволяет секвенировать длинные последовательности, в том числе индивидуальные теломеры [79].

Наличие критически укороченных теломер и средняя длина теломер не являются жестко связанными величинами. Также стоит отметить, что в подавляющем большинстве геронтологических исследований измеряют теломеры белых клеток крови, что также вносит дополнительные неясности [80].

Существуют прямые доказательства того, что клеточная сенильность возникает в результате появления сигналов DDR от теломер [81]. При этом сигнал должен быть длительным, что говорит о том, что ДНК не может быть репарируема [82]. Было доказано, что одного двуцепочечного разрыва ДНК (если он не репарирован) достаточно для индукции сенильности [83].

Понятие клеточной сенильности за последние 60 лет меняло свое значение, и до сих пор значение этого термина не устоялось [84]. Высказывают даже мнение о необходимости замены термина [85]. Сначала термин употреблялся только для обозначения клеток, достигших предела Хейфлика, потом его распространили на клетки с повреждением ДНК в целом [86]. Появился термин онкоген-индуцированная сенильность и далее другие, уже не связанные с ДНК. В 2019 г. ведущие ученые договорились о том, что именно стоит считать сенильностью [87], и возникло следующее определение: «Клеточная сенильность — это состояние клетки, вызванное стрессовыми воздействиями и определенными физиологическими процессами, характеризующееся длительной и в целом необратимой остановкой клеточного цикла с изменениями секреции, макромолекулярными повреждениями и измененным метаболизмом». Пытаясь объяснить все разнородные явления, такое определение выглядит слишком общим и не улучшает нашего понимания сути процесса.

Упрощая, можно определить **сенильность как неэффективный ответ клетки на любое нарушение**. Исходя из такого определения становится понятным, почему до сих пор не найдено уникальных (характерных только для сенильности) признаков [88]. Ясно, что и сложное, и упрощенное определение можно применить к любым клеткам, в том числе постмитотическим и раковым.

Сложность определения клеточной сенильности усугубляется еще и тем, что сенильный фенотип зависит от исходного типа клеток и меняется во времени; происходит углубление сенильности, включаются разные механизмы [89, 90]. В последнее время описывают очень интересное явление: усиление активности эндогенных ретротранспозонов в процессе сенильности [91–93]. Скорее всего, сигналом к этому являются эпигенетические изменения [94]. В результате активации ретроэлементов, помимо увеличения генетической изменчивости, происходит активация систем врожденного иммунитета и развивается воспаление [95, 96].

Вначале сенильность является целиком внутриклеточным процессом. В своем развитии он приобретает специфический секреторный фенотип (*senescence associated secretory phenotype, SASP*). Клетка начинает воздействовать на жизнь соседних клеток и далее — всего организма. Каким-то образом в развитии клеточной сенильности начинают участвовать митохондрии, возможно, посредством редокс-регуляции [97, 98].

В сенильных клетках усиливается устойчивость к апоптозу, происходит сдвиг метаболизма в пользу гликолиза, повышается продукция активных форм кислорода. SASP включает в себя DAMPs (*damage associated molecular patterns*), различные провоспалительные цитокины и хемокины, привлекающие иммунные клетки, а также протеазы, изменяющие внеклеточный матрикс и др. [99, 100].

Резкое усиление генетической нестабильности. Теломерные слияния и их последствия. Третий механизм воздействия укорочения теломер на судьбу клетки наиболее сложен и ведет к резкому росту генетической нестабильности. Этот механизм является одним из способов образования бессмертных раковых клеток. Механизм начинает работать только в частично трансформированных клетках, в которых по какой-то причине не срабатывает обычный механизм остановки пролиферации по достижении предела Хейфлика. Такие клетки, несмотря на укорочение теломер, продолжают пролиферацию и могут делиться еще десятки раз до достижения так называемого теломерного или репликативного кризиса. Примерно 30 лет назад было теоретически постулировано существование двух барьеров, которые необходимо преодолеть нормальной клетке для достижения репликативного бессмертия: это клеточная сенильность (M1) и теломерный кризис (M2) [101].

Экспериментальное исследование теломерного кризиса проводят на клетках, в которых подавлена активность p53 или pRb. Например, в работе 2023 г. [102] это делали с помощью введения в нормальные фибробласты генетических конструкций, кодирующих антигены папилломавируса человека E6 и E7 или большой антиген SV40. Такие клетки обладают повышенным пролиферативным потенциалом, в течение которого теломеры продолжают укорачиваться; после этого клетки начинают массово погибать, но продолжают делиться. Исходом эксперимента может стать либо полная гибель клеток, либо появление репликативно бессмертного клона, чаще всего с реактивацией гена *hTERT*. Как показывают последние исследования, клетки в процессе кризиса подвергаются аутофагической гибели [103].

Если лимит Хейфлика преодолен в результате инактивации механизмов остановки клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК, системы исправления повреждений ДНК продолжают работать. При продолжающейся недорепликации идет накопление повреждений ДНК, и в какой-то момент возникают варианты репарации неправильных концов ДНК с помощью теломерных слияний.

Слиянию могут подвергаться либо разные хромосомы, либо сестринские хроматиды. В последующем митозе эти дицентрики либо неправильно сегрегируют, либо разрываются. Возникает последовательность событий, называемая «слияние-мост-разрыв» (рис. 4).

Она может многократно повторяться. В результате таких на первый взгляд простых процессов могут образовываться самые разнообразные мутации [104].

1. Анеуплоидии — нехватка или приобретение хромосомы.
2. Нерцепирующие транслокации в результате индуцированной разрывом репликации.
3. Потеря гетерозиготности (*Loss of Heterozygosity, LOX*) в результате терминальной делеции. Может закрепляться в геноме раковых клеток из-за потери генов опухолевых супрессоров.
4. Общее увеличение пloidности.
5. При слиянии хроматид может происходить локальная амплификация с последующим образованием гомогенно окрашенного района (*HSR*) или двойных минутных хромосом (*DM-хромосом*).
6. Хромотрипсис — десятки перестроек в пределах одного сегмента хромосомы. Образуется, когда при разрыве ядерной оболочки фрагмент хромосомы оказывается

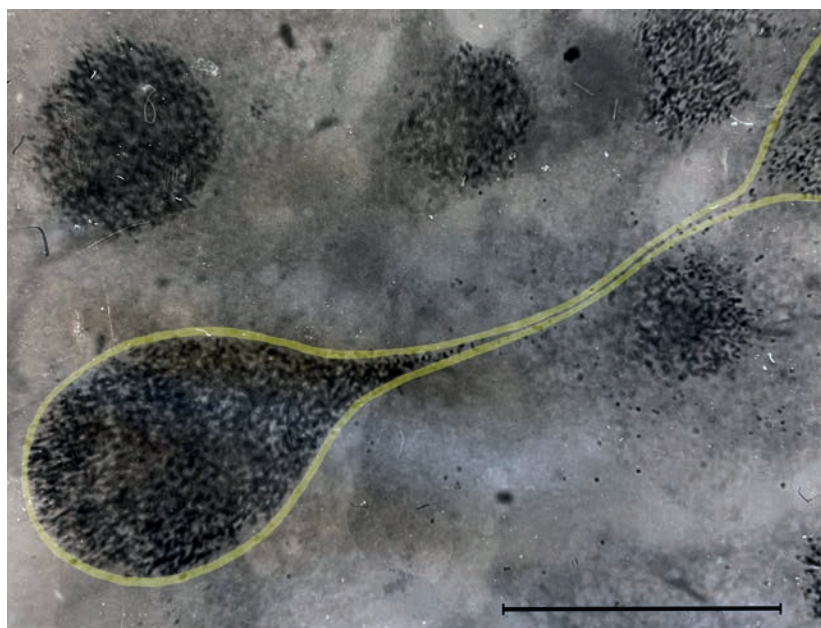


Рис. 4. Хромосомный мост в клетках 3T3Swiss. Клетка (клетки) напоминают сиамских близнецов. Митоз давно кончился (хромосом не видно) и ядра (клетки) начали движение друг от друга, при этом ядро (да и сами клетки) не отделились друг от друга (желтым обведено неразделившееся ядро). ДНК клеток была предварительно помечена ^3H -тимидином. Радиоавтография. Масштабная линейка — 20 мкм. Фото автора

в цитоплазме и сильно фрагментируется под влиянием экзонуклеазы TREX1.

7. Катаегис — редактирование фрагментов ДНК, образованных в процессе хромотрипсиса, за счет дезаминазы АРОВЕСЗ, которая превращает цитозиновые остатки в урацил. Работа этих ферментов в норме ограничивает инфекцию ДНК- и РНК-вирусов.

В процессе разрыва «моста» ДНК в его середине сильно вытягивается, она лишена нуклеосом [105]. После разрыва ядерной оболочки ДНК оказывается мишенью цитоплазматических нуклеаз и дезаминаз. В последние годы стало ясно, что в эти процессы вовлечены компоненты врожденного иммунитета, ответственные за противовирусную защиту. При появлении ДНК в цитоплазме активируется путь cGAS/STING, индуцирующий ZBP1 (Z-ДНК связывающий белок 1), который соединяется с транскриптом TERRA, количество которого растет при дисфункции теломер. Комплексы TERRA/ZBP1 олигомеризуются в виде филаментов на поверхности внешней митохондриальной мембраны, где они способствуют образованию MAVS (митохондриальный антивирусный сигнальный комплекс). Начинается интерфероновый ответ [102]. В конце концов сильно поврежденная ДНК с однонитевыми разрывами включается в состав ядра, что приводит к явлениям хромотрипсиса и катаегиса.

Подробности процессов перестройки хромосом и теломерного кризиса слишком обширны и не являются предметом этого обзора. Хочется подчеркнуть, однако, что при исследовании самых разнообразных раковых клеток с той или иной частотой находят следы вышеописанных событий. Так, проявляется участие теломер с нарушенной функцией в канцерогенезе [106–113].

Итак, мы видим, что укорачивание теломер (отсутствие теломеразной активности) ведет к появлению сенильных клеток, что способствует старению как местно (уменьшается функциональность тканей), так и генерализованно (развитие воспалительного старения во всем организме). Те же процессы способствуют росту генетической изменчивости, являющейся важной частью канцерогенеза. Давно замечено, что несмотря на теломеразную активность, раковые клетки обычно имеют укороченные теломеры [114]. Существует гипотеза, что раковым клеткам выгодно поддерживать короткие теломеры, чтобы обеспечивать повышенный уровень генетической нестабильности.

ТЕЛОМЕРАЗА, ОМОЛОЖЕНИЕ (ОЗДОРОВЛЕНИЕ) И РАК

Поскольку теломераза предотвращает клеточную сенильность, вызванную недорепли-

кацией, а также обеспечивает возможность клеточной пролиферации для поддержания нормального функционирования тканей, уже давно рассматривалось ее использование в терапевтических целях для омоложения (оздоровления). В последние десятилетия идет постепенное замещение понятия удлинения жизни (lifespan) на удлинение здоровой жизни (healthspan) как целевого показателя, на который направляются усилия ученых и медиков. В вопросе использования теломеразы главным аспектом является безопасность.

С одной стороны, экспрессия теломеразы не обязательно ведет к изменениям, связанным с раком [115, 116], и многие нормальные (не раковые) клетки обладают теломеразной активностью. Это клетки развивающегося эмбриона, различные стволовые клетки и предшественники, клетки половой линии у мужчин. В начале века Кальвин Харли, желая подчеркнуть безопасность теломеразы, написал статью под названием «Теломераза — не онкоген» [117].

С другой стороны, активация теломеразы является наиболее общим признаком раковых клеток (около 90%), и в связи с этим, чисто феноменологически, мы ее должны отнести к онкогенам [118]. Активация теломеразы в процессе канцерогенеза происходит разными путями: это мутации промотора *hTERT*, геномные перестройки и амплификация гена. Есть позиции внутри промотора, которые чаще всего подвергаются изменениям [119]. Мутации в промоторе *hTERT* являются самыми частыми некодирующими мутациями в раковых клетках человека [120]. В тканях с медленным самообновлением клеток (опухоли центральной нервной системы, печени и меланоциты) мутации промотора *hTERT* встречаются чаще и появляются раньше, чем в опухолях кишечника и крови [121–123].

Вирус гепатита В (HBV) способен встраиваться в геном рядом с промотором *hTERT* и усиливать его экспрессию [124]. В нейробластомах часто наблюдают геномные перестройки, усиливающие экспрессию *hTERT* [125, 126]. В опухолях яичника и аденокарциномах легких наблюдают амплификации *hTERT* [127].

Помимо функциональной связи теломеразы с раком, а именно частым приобретением раковыми клетками теломеразной активности, описаны различные неканонические активности теломеразы, не связанные с поддержанием теломера, но так или иначе выгодные раковым клеткам [128, 129].

Известно, что раковая клетка должна иметь ряд изменений, одним из которых явля-

ется иммортализация. В стареющем организме имеется немало клеток, в которых уже произошли многие предраковые изменения, и этим клеткам не хватает лишь бессмертия. Экспрессия теломеразы позволяет пройти этот этап и превратить их в настоящие раковые клетки. Следовательно, массовое обретение многими клетками нерегулируемой теломеразной активности явно опасно.

Известно, что для раковых клеток характерна высокая теломеразная активность и злокачественность опухоли коррелирует с уровнем активности теломеразы [130, 131], а уровень активности может различаться в сотни раз [132]. Можно предположить, что если активность теломеразы будет сравнительно низкая или непостоянная, то она будет лишь «исцелять» дисфункциональные, критически укороченные теломеры, тем самым снижая DDR и SASP и уменьшая воспаление, но не обеспечивая возможность долгосрочного роста [133]. Защитный эффект теломеразы в условиях окислительного стресса также, скорее всего, полезен [61, 134–135].

Как можно оценить возможные позитивные результаты активации теломеразы на здоровье? При внедрении гена теломеразы стареющим мышам с помощью адено-ассоциированных вирусов были достигнуты значительные результаты в улучшении биомаркеров, ассоциированных со старением [136]. Аналогичный результат на мышах был достигнут теми же авторами с использованием низкомолекулярного активатора теломеразы TA-65 вместо AAV9 [137].

TA-65 — это натуральный продукт, полученный из традиционного китайского лекарственного растения (астрагала). Экстракты этого растения использовались на протяжении веков без сообщений о побочных эффектах. Дозировку препарата легко контролировать, и он является довольно слабым активатором теломеразы. В испытаниях на людях недавно было показано, что TA-65 улучшает основные маркеры риска сердечно-сосудистых заболеваний — ведущей причины смертности в развитых странах. Уровень TNF плазмы также снижался. Авторы делают вывод, что произошли изменения, связанные с уменьшением воспаления [138]. Также снижение воспаления и нормализация лимфоцитарного профиля были показаны в другом длительном испытании TA-65, проведенном на возрастных пациентах после инфаркта [139].

Снижение воспаления приобретает все большее значение по ходу развития старения [140, 141]. Поэтому воздействия, направ-

ленные на блокировку воспалительного старения, могут быть оправданы.

В последние годы особый интерес вызывает экзосомный путь межклеточной коммуникации. Было показано, что через экзосомы клетки могут передавать транскрипты *hTERT*, которые делают клетки-доноры на время теломеразо-положительными [142, 143].

Помимо двух известных способов поддержания теломер (теломеразо-зависимого и альтернативного), недавно был открыт способ прямой передачи теломер от клетки к клетке в процессе развития иммунного ответа [144]. При контакте с Т-лимфоцитом в антиген-презентирующей клетке происходит деградация шелтерина и отрезание теломер при участии фактора TZAP. После этого теломеры вместе с Rad51 (необходим для рекомбинации) упаковываются в везикулы, которые посредством иммунологического синапса передаются Т-лимфоциту. В результате теломеры Т-лимфоцита удлиняются в среднем на 3000 пар оснований, а у презентирющей клетки — укорачиваются. Возможное освоение прямой передачи теломер в медицине откроет новые возможности для борьбы со старением иммунной системы, повышения эффективности вакцинации, а в будущем — для разработки новых технологий клеточного омоложения, в частности, клеток сосудистой стенки. Также вышедший из моды вопрос о применении теломеразы для лечения патологий, связанных со старением, требует дальнейшего изучения, и, возможно, нас ждет вторая и более успешная волна интереса к этому важнейшему ферменту [80, 145].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История исследований теломеразы, начавшихся с предсказания существования фермента А.М. Оловниковым в 1971 г., продолжается.

Проблема недорепликации, как ее называли ранее, на самом деле, видимо, является

не столько проблемой, сколько механизмом, адаптированным в результате эволюции для контроля судьбы отдельных клеток в организме. На сегодняшний день известны три способа поддержания теломер у человека: теломеразный, альтернативный и прямой перенос теломерной ДНК. Все три способа организм применяет в нормальном развитии. Ограничения, связанные с подавлением теломеразы в развитии, носят превентивный характер и связаны с защитой от рака. В тех случаях, когда эти ограничения мешают нормальному функционированию, организм ограниченно применяет активацию теломеразы (в стволовых клетках и некоторых клетках-предшественниках) — альтернативный способ удлинения теломер (в эмбриогенезе, до имплантации). Когда требуется сверхсрочное увеличение пролиферативного потенциала лимфоцитов, существует способ прямой передачи теломер, обеспечивающий необходимую скорость работы иммунной системы.

В процессе старения организма все большую роль играет возрастание стерильного воспаления. Видна прямая связь между состоянием теломер и активацией иммунной противовирусной защиты. То, что когда-то называли репликомером (укорачивание теломер как счетчик количества пройденных делений), оказалось частью сложного механизма, во многом определяющего состояние нашего здоровья и увеличивающего свое значение с возрастом.

Благодарности. Выражаю благодарность И.А. Оловникову за редакторскую правку рукописи.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muller, H. J. (1938) The remaking of chromosomes, *Coll. Net.*, **8**, 182-195.
2. McClintock, B. (1938) The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases, *Missouri Agric. Exp. Sta. Res. Bull.*, **290**, 1-48.
3. McClintock, B. (1939) The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **25**, 405-416, doi: 10.1073/pnas.25.8.405.
4. McClintock, B. (1941) The stability of broken ends in zea mays, *Genetics*, **26**, 234-282, doi: 10.1093/genetics/26.2.234.
5. Вильсон Э. (1936) Клетка и ее роль в развитии и наследственности, М.-Л. ГИБМЛ, стр. 211-212.

6. Carrel, A. (1912) On the permanent life of tissues outside of the organism, *J. Exp. Med.*, **15**, 516-528, doi: 10.1084/jem.15.5.516.
7. Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **25**, 585-621, doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
8. Hayflick, L. (1998) *Conference: Telomeres and Telomerase: Implications for Cell Immortality, Cancer, and Age Related Disease*, California.
9. Benveniste, G. L. (2013) Alexis Carrel: the good, the bad, the ugly, *ANZ J. Surg.*, **83**, 609-611, doi: 10.1111/ans.12167.
10. Dutkowski, P., de Rougemont, O., and Clavien, P.-A. (2008) Alexis Carrel: genius, innovator and ideologist, *Am. J. Transplant.*, **8**, 1998-2003, doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02364.x.
11. Carrel, A. (1939) *Man, the Unknown*, New York: Harper & Brothers.
12. Оловников А. М. (1971) Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов, *Докл. Акад. Наук*, **201**, 1496-1499.
13. Greider, C. W., and Blackburn, E. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts, *Cell*, **43**, 405-413, doi: 10.1016/0092-8674(85)90170-9.
14. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1996) Telomeres, Telomerase and Cancer, *Sci. Am.*, **274**, 92-97, doi: 10.1038/scientificamerican0296-92.
15. Оловников А. М. (1992) Старение есть результат укорочения «дифферотены» в теломере из-за концевой недорепликации и недорепарации ДНК, *Известия АН СССР. Сер. Биол.*, **4**, 641-643.
16. Olovnikov, A. M. (1995) The role of incomplete terminal repair of chromosomal DNA in the aging of neurons and postmitotic organisms [in Russian], *Biol. Bull.*, **4**, 504-507.
17. Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W., and Lotze, C. (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell. Res.*, **220**, 186-193, doi: 10.1006/excr.1995.1305.
18. Von Zglinicki, T. (2002) Oxidative stress shortens telomeres, *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 339-344, doi: 10.1016/S0968-0004(02)02110-2.
19. Оловников А. М. (2003) Редусомная гипотеза старения и контроля биологического времени в индивидуальном развитии, *Биохимия*, **68**, 7-41.
20. Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy, *J. Theor. Biol.*, **41**, 181-190, doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7.
21. Doksani, Y. (2019) The response to DNA damage at telomeric repeats and its consequences for telomere function, *Genes*, **10**, 318, doi: 10.3390/genes10040318.
22. Runnberg, R., Narayanan, S., Itriago, H., and Cohn, M. (2019) Either Rap1 or Cdc13 can protect telomeric single-stranded 3' overhangs from degradation *in vitro*, *Sci. Rep.*, **9**, 19181, doi: 10.1038/s41598-019-55482-3.
23. Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., and Neidle, S. (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5402-5415, doi: 10.1093/nar/gkl655.
24. Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and De Lange, T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop, *Cell*, **97**, 503-514, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80760-6.
25. De Lange, T. (2018) Shelterin-mediated telomere protection, *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 223-247, doi: 10.1146/annurev-genet-032918-021921.
26. De Lange, T. (2018) What I got wrong about shelterin, *J. Biol. Chem.*, **293**, 10453-10456, doi: 10.1074/jbc.AW118.003234.
27. Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoraiuli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends, *Science*, **318**, 798-801, doi: 10.1126/science.1147182.
28. Porro, A., Feuerhahn, S., Delafontaine, J., Riethman, H., Rougemont, J., and Lingner, J. (2014) Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres, *Nat. Commun.*, **5**, 5379, doi: 10.1038/ncomms6379.
29. Kwapisz, M., and Morillon, A. (2020) Subtelomeric transcription and its regulation, *J. Mol. Biol.*, **432**, 4199-4219, doi: 10.1016/j.jmb.2020.01.026.
30. Feretzaki, M., Nunes, P. R., and Lingner, J. (2019) Expression and differential regulation of human TERRA at several chromosome ends, *RNA*, **25**, 1470-1480, doi: 10.1261/rna.072322.119.
31. Montero, J. J., de Silanes, I., Graña, O., and Blasco, M. A. (2016) Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres, *Nat. Commun.*, **7**, 12534, doi: 10.1038/ncomms12534.
32. Bettin, N., Pegorar, C., and Cusanelli, E. (2019) The emerging roles of TERRA in telomere maintenance and genome stability, *Cells*, **8**, E246, doi: 10.3390/cells8030246.
33. Koskas, S., Decottignies, A., Dufour, S., Pezet, M., Verdel, A., Vourc'h, C., and Faure, V. (2017) Heat shock factor 1 promotes TERRA transcription and telomere protection upon heat stress, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6321-6333, doi: 10.1093/nar/gkx208.
34. Galigniana, N. M., Charó, N. L., Uranga, R., Cabanillas, A. M., and Piwien-Pilipuk, G. (2020) Oxidative stress induces transcription of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) by engaging PKA signaling and cytoskeleton dynamics, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1867**, 118643, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118643.
35. Le Berre, G., Hossard, V., Riou, J.-F., and Guieysse-Peugeot, A.-L. (2019) Repression of TERRA expression by subtelomeric DNA methylation is dependent on NRF1 binding, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, E2791, doi: 10.3390/ijms20112791.

36. Wang, Z., Deng, Z., Dahmane, N., Tsai, K., Wang, P., Williams, D. R., Kossenkoy, A. V., Showe, L. C., Zhang, R., Huang, Q., Conejo-Garcia, J. R., and Lieberman, P. M. (2015) Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) constitutes a nucleoprotein component of extracellular inflammatory exosomes, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **112**, E6293-E6300, doi: 10.1073/pnas.1505962112.
37. Aguado, J., Sola-Carvajal, A., Cancila, V., Revêchon, G., Ong, P. F., Jones-Weinert, C. W., Wallén Arzt, E., Lattanzi, G., Dreesen, O., Tripodo, C., Rossiello, F., Eriksson, M., and d'Adda di Fagagna, F. (2019) Inhibition of DNA damage response at telomeres improves the detrimental phenotypes of Hutchinson–Gilford progeria syndrome, *Nat. Commun.*, **10**, 4990, doi: 10.1038/s41467-019-13018-3.
38. Kroupa, M., Tomasova, K., Kavec, M., Skrobánek, P., Buchler, T., Kumar, R., Vodickova, L., and Vodicka, P. (2022) Telomeric repeat-containing RNA (TERRA): physiological functions and relevance in cancer, *Front. Oncol.*, **12**, 913314, doi: 10.3389/fonc.2022.913314.
39. Chebly, A., Ropio, J., Baldasseroni, L., Prochazkova-Carlotti, M., Idrissi, Y., Ferrer, J., Farra, C., Beylot-Barry, M., Merlio, J.-P., and Chevret, E. (2022) Telomeric repeat-containing RNA (TERRA): a review of the literature and first assessment in cutaneous T-cell lymphomas, *Genes*, **13**, 539, doi: 10.3390/genes13030539.
40. Pérez-Martínez, L., Wagner, T., and Luke, B. (2022) Telomere interacting proteins and TERRA regulation, *Front. Genet.*, **13**, 872636, doi: 10.3389/fgene.2022.872636.
41. Bhargava, R., Lynskey, M. L., and O'Sullivan, R. J. (2022) New twists to the ALternative endings at telomeres, *DNA Repair (Amst)*, **115**, 103342, doi: 10.1016/j.dnarep.2022.103342.
42. Fernandes, R. V., Feretzaki, M., and Lingner, J. (2021) The makings of TERRA R-loops at chromosome ends, *Cell Cycle*, **20**, 1745-1759, doi: 10.1080/15384101.2021.1962638.
43. Smith, E. M., Pendlebury, D. F., and Nandakumar, J. (2020) Structural biology of telomeres and telomerase, *Cell. Mol. Life Sci.*, **77**, 61-79, doi: 10.1007/s00018-019-03369-x.
44. Roake, C. M., and Artandi, S. E. (2020) Regulation of human telomerase in homeostasis and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 384-397, doi: 10.1038/s41580-020-0234-z.
45. Liu, X., Wang, Y., Chang, G., Wang, F., Wang, F., and Geng, X. (2017) Alternative splicing of hTERT Pre-mRNA: a potential strategy for the regulation of telomerase activity, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 567, doi: 10.3390/ijms18030567.
46. Jeung, H. C., Rha, S. Y., Shin, S. J., Ahn, J. B., Park, K. H., Kim, T. S., Kim, J. J., Roh, J. K., and Chung, H. C. (2017) Changes in telomerase activity due to alternative splicing of human telomerase reverse transcriptase in colorectal cancer, *Oncol. Lett.*, **14**, 2385-2392, doi: 10.3892/ol.2017.6438.
47. Ludlow, A. T., Slusher, A. L., and Sayed, M. E. (2019) Insights into telomerase/hTERT alternative splicing regulation using bioinformatics and network analysis in cancer, *Cancers*, **11**, 666, doi: 10.3390/cancers11050666.
48. Ramlee, M. K., Wang, J., Toh, W. X., and Li, S. (2016) Transcription regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene, *Genes*, **7**, 50, doi: 10.3390/genes7080050.
49. Daniel, M., Peek, G. W., and Tollefsbol, T. O. (2012) Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT), *Gene*, **498**, 135-146, doi: 10.1016/j.gene.2012.01.095.
50. Leão, R., Apolónio, J. D., Lee, D., Figueiredo, A., Tabori, U., and Castelo-Branco, P. (2018) Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer, *J. Biomed. Sci.*, **25**, 22, doi: 10.1186/s12929-018-0422-8.
51. Abreu, E., Terns, R. M., and Terns, M. P. (2017) Visualization of human telomerase localization by fluorescence microscopy techniques, *Adv. Struct. Saf. Stud.*, **1587**, 113-125, doi: 10.1007/978-1-4939-6892-3_11.
52. Venteicher, A. S., and Artandi, S. E. (2009) TCAB1: driving telomerase to Cajal bodies, *Cell Cycle*, **8**, 1329-1331, doi: 10.4161/cc.8.9.8288.
53. Nguyen, K. T. T. T., and Wong, J. M. Y. (2020) Telomerase biogenesis and activities from the perspective of its direct interacting partners, *Cancers*, **12**, 1679, doi: 10.3390/cancers12061679.
54. González-Suárez, E., Samper, E., Ramírez, A., Flores, J. M., Martín-Caballero, J., Jorcano, J. L., and Blasco, M. A. (2001) Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes, *EMBO J.*, **20**, 2619-2630, doi: 10.1093/emboj/20.11.2619.
55. Chen, K.-H., Guo, Y., Li, L., Qu, S., Zhao, W., Lu, Q.-T., Mo, Q.-Y., Yu, B.-B., Zhou, L., Lin, G.-X., Sun, Y.-C. and Zhu, X.-D. (2018) Cancer stem cell-like characteristics and telomerase activity of the nasopharyngeal carcinoma radioresistant cell line CNE-2R, *Cancer Med.*, **7**, 4755-4764, doi: 10.1002/cam4.1729.
56. Walter, M., Davies, J. P., and Ioannou, Y. A. (2003) Telomerase immortalization upregulates Rab9 expression and restores LDL cholesterol egress from Niemann–Pick C1 late endosomes, *J. Lipid Res.*, **44**, 243-253, doi: 10.1194/jlr.M200230-JLR200.
57. Bagheri, S., Nosrati, M., Li, S., Fong, S., Torabian, S., Rangel, J., Moore, D. H., Federman, S., Laposa, R. R., Baehner, F. L., Sagebiel, R. W., Cleaver, J. E., Haqq, C., Debs, R. J., Blackburn, E. H., and Kashani-Sabet, M. (2006) Genes and pathways downstream

- of telomerase in melanoma metastasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11306–11311, doi: 10.1073/pnas.0510085103.
58. Liu, Z., Li, Q., Li, K., Chen, L., Li, W., Hou, M., Liu, T., Yang, J., Lindvall, C., Björkholm, M., Jia, J., and Xu, D. (2013) Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial–mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells, *Oncogene*, **32**, 4203–4213, doi: 10.1038/onc.2012.441.
 59. Ghosh, A., Saginc, G., Leow, S. C., Khattar, E., Shin, E. M., Yan, T. D., Wong, M., Zhang, Z., Li, G., Sung, W.-K., Zhou, J., Chng, W. J., Li, S., Liu, E., and Tergaonkar, V. (2012) Telomerase directly regulates NF- κ B-dependent transcription, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 1270–1281, doi: 10.1038/ncb2621.
 60. Chen, K., Chen, L., Li, L., Qu, S., Yu, B., Sun, Y., Wan, F., Chen, X., Liang, R., and Zhu, X. (2020) A positive feedback loop between Wnt/ β -catenin signaling and hTERT regulates the cancer stem cell-like traits in radioresistant nasopharyngeal carcinoma cells, *J. Cell. Biochem.*, **121**, 4612–4622, doi: 10.1002/jcb.29681.
 61. Rosen, J., Jakobs, P., Ale-Agha, N., Altschmied, J., and Haendeler, J. (2020) Non-canonical functions of Telomerase Reverse Transcriptase—Impact on redox homeostasis, *Redox Biol.*, **34**, 101543, doi: 10.1016/j.redox.2020.101543.
 62. Zhang, Q., Wang, H. Y., Woetmann, A., Raghunath, P. N., Odum, N., and Wasik, M. A. (2006) STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes, *Blood*, **108**, 1058–1064, doi: 10.1182/blood-2005-08-007377.
 63. Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W. C., and Masutomi, K. (2009) An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA, *Nat. Cell Biol.*, **461**, 230–235, doi: 10.1038/nature08283.
 64. Ridanpää, M., Van Eenennaam, H., Pelin, K., Chadwick, R., Johnson, C., Yuan, B., Vanvenrooij, W., Pruijn, G., Salmela, R., Rockas, S., Mäkitie, O., Kaitila, I., and de la Chapelle, A. (2001) Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia, *Cell*, **104**, 195–203, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00205-7.
 65. Sharma, N. K., Reyes, A., Green, P., Caron, M. J., Bonini, M. G., Gordon, D. M., Holt, I. J., and Santos, J. H. (2011) Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 712–725, doi: 10.1093/nar/gkr758.
 66. Чернов Д. Н., Егоров Е. Е., Акимов С. С. (1996) Теломеразная активность клеток мыши при спонтанной трансформации, *Докл. Акад. Наук*, **349**, 121–123.
 67. Lue, N. F., Bosoy, D., Moriarty, T. J., Autexier, C., Altman, B., and Leng, S. (2005) Telomerase can act as a template- and RNA-independent terminal transferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9778–9783, doi: 10.1073/pnas.0502252102.
 68. Baur, J. A., Zou, Y., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2001) Telomere position effect in human cells, *Science*, **292**, 2075–2077, doi: 10.1126/science.1062329.
 69. Lou, Z., Wei, J., Riethman, H., Baur, J. A., Voglauer, R., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2009) Telomere length regulates ISG15 expression in human cells, *Aging*, **1**, 608–621, doi: 10.18632/aging.100066.
 70. Stadler, G., Rahimov, F., King, O. D., Chen, J. C., Robin, J. D., Wagner, K. R., Shay, J. W., Emerson, C. P., Jr., and Wright, W. E. (2013) Telomere position effect regulates DUX4 in human facioscapulohumeral muscular dystrophy, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 671–678, doi: 10.1038/nsmb.2571.
 71. Kim, W., Ludlow, A. T., Min, J., Robin, J. D., Stadler, G., Mender, I., Lai, T. P., Zhang, N., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2016) Regulation of the human telomerase gene TERT by Telomere Position Effect-Over Long Distances (TPE-OLD): implications for aging and cancer, *PLoS Biol.*, **14**, e2000016, doi: 10.1371/journal.pbio.2000016.
 72. Sharma, S., and Chowdhury, S. (2022) Emerging mechanisms of telomerase reactivation in cancer, *Trends Cancer*, **8**, 632–641, doi: 10.1016/j.trecan.2022.03.005.
 73. Yegorov, Y. E., Chernov, D. N., Akimov, S. S., Akhmalisheva, A. K., Smirnova, Y. B., Shinkarev, D. B., Semenova, I. V., Yegorova, I. N., and Zelenin, A. V. (1997) Blockade of telomerase function by nucleoside analogs, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 1296–1305.
 74. Harley, C. B. (2008) Telomerase and cancer therapeutics, *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 167–179, doi: 10.1038/nrc2275.
 75. Lansdorp, P. (2022) Telomere length regulation, *Front. Oncol.*, **12**, 943622, doi: 10.3389/fonc.2022.943622.
 76. Montpetit, A. J., Alhareeri, A. A., Montpetit, M., Starkweather, A. R., Elmore, L. W., Filler, K., Mohanraj, L., Burton, C. W., Menzies, V. S., Lyon, D. E., and Jackson-Cook, C. K. (2014) Telomere length: a review of methods for measurement, *Nurs. Res.*, **63**, 289–299, doi: 10.1097/NNR.0000000000000037.
 77. Lai, T.-P., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2018) Comparison of telomere length measurement methods, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **373**, 20160451, doi: 10.1098/rstb.2016.0451.
 78. Lin, J., and Epel, E. (2022) Stress and telomere shortening: insights from cellular mechanisms, *Ageing Res. Rev.*, **73**, 101507, doi: 10.1016/j.arr.2021.101507.
 79. Tham, C. Y., Poon, L., Yan, T., Koh, J. Y. P., Ramlee, M. K., Teoh, V. S. I., Zhang, S., Cai, Y., Hong, Z., Lee, G. S., Liu, J., Song, H. W., Hwang, W. Y. K.,

- Teh, B. T., Tan, P., Xu, L., Koh, A. S., Osato, M., and Li, S. (2023) High-throughput telomere length measurement at nucleotide resolution using the PacBio high fidelity sequencing platform, *Nat. Commun.*, **14**, 281, doi: 10.1038/s41467-023-35823-7.
80. Yegorov, Y. E., Poznyak, A. V., Nikiforov, N. G., Starodubova, A. V., and Orekhov, A. N. (2021) Role of telomeres shortening in atherogenesis: an overview, *Cells*, **10**, 395, doi: 10.3390/cells10020395.
 81. Di Fagagna, D., Reaper, F., Clay-Farrace, P. M., Fiegler, L., Carr, H., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., and Jackson, S. P. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere initiated senescence, *Nature*, **426**, 194-198, doi: 10.1038/nature02118.
 82. Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J. M., Bucci, G., Dobrev, M., Matti, V., Beausejour, C. M., Herbig, U., Longhese, M. P., and d'Adda di Fagagna, F. (2012) Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 355-365, doi: 10.1038/ncb2466.
 83. Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., and Wahl, G. M. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts, *Genes Dev.*, **8**, 2540-2551, doi: 10.1101/gad.8.21.2540.
 84. Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A., and Mosieniak, G. (2018) What is and what is not cell senescence, *Postepy Biochem.*, **64**, 110-118, doi: 10.18388/pb.2018_120.
 85. Gems, D., and Kern, C. C. (2022) Is "cellular senescence" a misnomer? *Geroscience*, **44**, 2461-2469, doi: 10.1007/s11357-022-00652-x.
 86. Nakamura, A. J., Chiang, Y. J., Hathcock, K. S., Horikawa, I., Sedelnikova, O. A., Hodes, R. J., and Bonner, W. M. (2008) Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence, *Epigenet. Chromatin*, **1**, 6, doi: 10.1186/1756-8935-1-6.
 87. Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Sedivy, J., Vougas, K., von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M., and Demaria, M. (2019) Cellular senescence: defining a path forward, *Cell*, **179**, 813-827, doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005.
 88. Yegorov, Y. E., Akimov, S. S., Hass, R., Zelenin, A. V., and Prudovsky, I. A. (1998) Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells, *Exp. Cell Res.*, **243**, 207-211, doi: 10.1006/excr.1998.4169.
 89. Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B. L., and von Zglinicki, T. (2010) Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence, *Mol. Systems Biol.*, **6**, 347, doi: 10.1038/msb.2010.5.
 90. Correia-Melo, C., Marques, F. D. M., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B. M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., Rushton, M. D., Charles, M., Jurk, D., Tait, S. W. G., Czapiewski, R., Greaves, L., Nelson, G., Bohlooly-Y, M., Rodriguez-Cuenca, S., Vidal-Puig, A., Mann, D., Saretzki, G., Quarato, G., Green, D. R., Adams, P. D., von Zglinicki, T., Korolchuk, V. I., and Passos, J. F. (2016) Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype, *EMBO J.*, **35**, 724-742, doi: 10.15252/embj.201592862.
 91. De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A. P., Elias, A. E., and Skvir, N. J., (2019) L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation, *Nature*, **566**, 73-78, doi: 10.1038/s41586-018-0784-9.
 92. Zhao, N., Yin, G., Liu, C., Zhang, W., Shen, Y., Wang, D., Lin, Z., Yang, J., Mao, J., Guo, R., Zhang, Y., Wang, F., Liu, Z., Lu, X., and Liu, L. (2023) Critically short telomeres derepress retrotransposons to promote genome instability in embryonic stem cells, *Cell Discov.*, **9**, 45, doi: 10.1038/s41421-023-00538-y.
 93. Liu, X., Liu, Z., Wu, Z., Ren, J., Fan, Y., et al. (2023) Resurrection of endogenous retroviruses during aging reinforces senescence, *Cell*, **186**, 287-304, doi: 10.1016/j.cell.2022.12.017.
 94. Pal, S., and Tyler, J. K. (2016) Epigenetics and aging, *Sci. Adv.*, **2**, e1600584, doi: 10.1126/sciadv.1600584.
 95. Gorbunova, V., Seluanov, A., Mita, P., McKerrow, W., Fenyö, D., Boeke, J. D., Linker, S. B., Gage, F. H., Kreiling, J. A., Petrashen, A. P., Woodham, T. A., Taylor, J. R., Helfand, S. L., and Sedivy, J. M. (2021) The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases, *Nature*, **596**, 43-53, doi: 10.1038/s41586-021-03542-y.
 96. Miller, K. N., Vettorelli, S. G., Salmonowicz, H., Dasgupta, N., Liu, T., Passos, J. F., and Adams, P. D. (2021) Cytoplasmic DNA: sources, sensing, and role in aging and disease, *Cell*, **184**, 5506-5526, doi: 10.1016/j.cell.2021.09.034.
 97. Chandrasekaran, A., Idelchik, M. P. S., and Melendez, J. A. (2017) Redox control of senescence and age-related disease, *Redox Biol.*, **11**, 91-102, doi: 10.1016/j.redox.2016.11.005.
 98. Martini, H., and Passos, J. F. (2023) Cellular senescence: all roads lead to mitochondria, *FEBS J.*, **290**, 1186-1202, doi: 10.1111/febs.16361.
 99. Kirkland, J. L., and Tchkonja, T. (2017) Cellular senescence: a translational perspective, *EBioMed.*, **21**, 21-28, doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.013.
 100. Kumari, R., and Jat, P. (2021) Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 645593, doi: 10.3389/fcell.2021.645593.
 101. Shay, J. W., Wright, W. E., and Werbin, H. (1993) Toward a molecular understanding of human breast

- cancer: a hypothesis, *Breast Cancer Res. Treat.*, **25**, 83-94, doi: 10.1007/BF00662404.
102. Nassour, J., Aguiar, L. G., Correia, A., Schmidt, T. T., Mainz, L., Przetocka, S., Haggbloom, C., Tadepalle, N., Williams, A., Shokhirev, M. N., Akincilar, S. C., Tergaonkar, V., Shadel, G. S., and Karlseder, J. (2023) Telomere-to-mitochondria signalling by ZBP1 mediates replicative crisis, *Nature*, **614**, 767-773, doi: 10.1038/s41586-023-05710-8.
 103. Nassour, J., Radford, R., Correia, A., Fusté, J. M., Schoell, B., Jauch, A., Shaw, R. J., and Karlseder, J. (2019) Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis, *Nature*, **565**, 659-663, doi: 10.1038/s41586-019-0885-0.
 104. Maciejowski, J., and de Lange, T. (2017) Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 175-186, doi: 10.1038/nrm.2016.171.
 105. Maciejowski, J., Li, Y., Bosco, N., Campbell, P. J., and de Lange, T. (2015) Chromothripsis and kataegis induced by telomere crisis, *Cell*, **163**, 1641-1654, doi: 10.1016/j.cell.2015.11.054.
 106. Lo, A. W. I., Sabatier, L., Fouladi, B., Pottier, G., Ricoul, M., and Murnane, J. P. (2002) DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line, *Neoplasia*, **4**, 531-538, doi: 10.1038/sj.neo.7900267.
 107. Bignell, G. R., Santarius, T., Pole, J. C. M., Butler, A. P., Perry, J., Pleasance, E., Greenman, C., Menzies, A., Taylor, S., Edkins, S., Campbell, P., Quail, M., Plumb, B., Matthews, L., McLay, K., Edwards, P. A. W., Rogers, J., Wooster, R., Futreal, P. A., and Stratton, M. R. (2007) Architectures of somatic genomic rearrangement in human cancer amplicons at sequence-level resolution, *Genome Res.*, **17**, 1296-1303, doi: 10.1101/gr.6522707.
 108. Campbell, P. J., Yachida, S., Mudie, L. J., Stephens, P. J., Pleasance, E. D., Stebbings, L. A., Morsberger, L. A., Latimer, C., McLaren, S., Lin, M.-L., McBride, D. J., Varela, I., Nik-Zainal, S. A., Leroy, C., Jia, M., Menzies, A., Butler, A. P., Teague, J. W., Griffin, C. A., Burton, J., Swerdlow, H., Quail, M. A., Stratton, M. R., Iacobuzio-Donahue, C., and Futreal, P. A. (2010) The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer, *Nature*, **467**, 1109-1113, doi: 10.1038/nature09460.
 109. Lin, T. T., Letsolo, B. T., Jones, R. E., Rowson, J., Pratt, G., Hewamana, S., Fegan, C., Pepper, C., and Baird, D. M. (2010) Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis, *Blood*, **116**, 1899-1907, doi: 10.1182/blood-2010-02-272104.
 110. Tanaka, H., Abe, S., Huda, N., Tu, L., Beam, M. J., Grimes, B., and Gilley, D. (2012) Telomere fusions in early human breast carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 14098-14103, doi: 10.1073/pnas.1120062109.
 111. Davoli, T., and de Lange, T. (2012) Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells, *Cancer Cell*, **21**, 765-776, doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.044.
 112. Li, Y., Schwab, C., Ryan, S., Papaemmanuil, E., Robinson, H. M., Jacobs, P., Moorman, A. V., Dyer, S., Borrow, J., Griffiths, M., Heerema, N. A., Carroll, A. J., Talley, P., Bown, N., Telford, N., Ross, F. M., Gaunt, L., McNally, R. J. Q., Young, B. D., Sinclair, P., Rand, V., Teixeira, M. R., Joseph, O., Robinson, B., Maddison, M., Dastugue, N., Vandenberghe, P., Stephens, P. J., Cheng, J., Loo, P. V., Stratton, M. R., Campbell, P. J., and Harrison, C. J. (2014) Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia, *Nature*, **508**, 102, doi: 10.1038/nature13115.
 113. Waddell, N., Pajic, M., Patch, A. M., Chang, D. K., Kassahn, K. S., Bailey, P., Johns, A. L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M. C. J., Robertson, A. J., Fadlullah, M. Z. H., Bruxner, T. J. C., Christ, A. N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., et al. (2015) Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer, *Nature*, **518**, 495-501, doi: 10.1038/nature14169.
 114. De Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., and Varmus, H. E. (1990) Structure and variability of human chromosome ends, *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 518-527, doi: 10.1128/mcb.10.2.518-527.1990.
 115. Morales, C. P., Holt, S. E., Ouellette, M., Kaur, K. J., Yan, Y., Wilson, K. S., White, M. A., Wright, W. E., and Shay, J. W. (1999) Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase, *Nat. Genet.*, **21**, 115-118, doi: 10.1038/5063.
 116. Yegorov, Y. E., Moldaver, M. V., Vishnyakova, K. S., Terekhov, S. M., Dashinimaev, E. B., Cheglaikov, I. B., Toropygin, I. Y., Yarygin, K. N., Chumakov, P. M., Korochkin, L. I., Antonova, G. A., Rybalkina, E. I., Saburina, I. N., Burnaevskii, N. S., and Zelenin, A. V. (2007) Enhanced control of proliferation in telomerized cells, *Russ. J. Dev. Biol.*, **38**, 76-89.
 117. Harley, C. B. (2002) Telomerase is not an oncogene, *Oncogene*, **21**, 494-502, doi: 10.1038/sj.onc.1205076.
 118. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
 119. Akincilar, S. C., Unal, B., and Tergaonkar, V. (2016) Reactivation of telomerase in cancer, *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 1659-1670, doi: 10.1007/s00018-016-2146-9.
 120. Weinhold, N., Jacobsen, A., Schultz, N., Sander, C., and Lee, W. (2014) Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer, *Nat. Genet.*, **46**, 1160-1165, doi: 10.1038/ng.3101.

121. Killela, P. J., Reitman, Z. J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz Jr, L. A., Friedman, A. H., Friedman, H., Gallia, G. L., Giovannella, B. C., Grollman, A. P., He, T.-C., He, Y., Hruban, R. H., Jallo, G. I., Mandahl, N., Meeker, A. K., Mertens, F., Netto, G. J., et al. (2013) TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self- renewal, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **110**, 6021-6026, doi: 10.1073/pnas.1303607110.
122. Nault, J. C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., Laurent, A., Cherqui, D., Balabaud, C., and Zucman-Rossi, J. (2013) High frequency of telomerase reverse- transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions, *Nat. Commun.*, **4**, 2218, doi: 10.1038/ncomms3218.
123. Shain, A. H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., Rickaby, W., D'Arrigo, C., Robson, A., and Bastian, B. C. (2015) The genetic evolution of melanoma from precursor lesions, *N. Engl. J. Med.*, **373**, 1926-1936, doi: 10.1056/NEJMoa1502583.
124. Kawai- Kitahata, F., Asahina, Y., Tanaka, S., Kakinuma, S., Murakawa, M., Nitta, S., Watanabe, T., Otani, S., Taniguchi, M., Goto, F., Nagata, H., Kaneko, S., Tasaka-Fujita, M., Nishimura-Sakurai, Y., Azuma, S., Itsui, Y., Nakagawa, M., Tanabe, M., Takano, S., Fukasawa, M., Sakamoto, M., Maekawa, S., Enomoto, N., and Watanabe, M. (2016) Comprehensive analyses of mutations and hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma with clinico-pathological features, *J. Gastroenterol.*, **51**, 473-486, doi: 10.1007/s00535-015-1126-4.
125. Valentijn, L. J., Koster, J., Zwijnenburg, D. A., Hasselt, N. E., van Sluis, P., Volckmann, R., van Noesel, M. M., George, R. E., Tytgat, G. A. M., Molenaar, J. J., and Versteeg, R. (2015) TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors, *Nat. Genet.*, **47**, 1411-1414, doi: 10.1038/ng.3438.
126. Peifer, M., Hertwig, F., Roels, F., Dreidax, D., Gartlgruber, M., Menon, R., Krämer, A., Roncaioli, J.L., Sand, F., Heuckmann, J. M., Ikram, F., Schmidt, R., Ackermann, S., Engesser, A., Kahlert, Y., Vogel, W., Altmüller, J., Nürnberg, P., Thierry-Mieg, J., et al. (2015) Telomerase activation by genomic rearrangements in high- risk neuroblastoma, *Nature*, **526**, 700-704, doi: 10.1038/nature14980.
127. Barthel, F. P., Wei, W., Tang, M., Martinez-Ledesma E., Hu, X., Amin, S. B., Akdemir, K. C., Seth, S., Song, X., Wang, Q., Lichtenberg, T., Hu, J., Zhang, J., Zheng, S., and Verhaak, R. G. W. (2017) Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types, *Nat. Genet.*, **49**, 349-357, doi: 10.1038/ng.3781.
128. Koh, C. M., Khattar, E., Leow, S. C., Liu, C. Y., Muller, J., Ang, W. X., Li, Y., Franzoso, G., Li, S., Guccione, E., and Tergaonkar, V. (2015) Telomerase regulates MYC-driven oncogenesis independent of its reverse transcriptase activity, *J. Clin. Invest.*, **125**, 2109-2122, doi: 10.1172/JCI79134.
129. Low, K. C., and Tergaonkar, V. (2013) Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer, *Trends Biochem. Sci.*, **38**, 426-434, doi: 10.1016/j.tibs.2013.07.001.
130. Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Matsuura, Y., Piatyszek, M. A., and Shay, J. W. (1995) Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes, *Nat. Med.*, **1**, 249-255, doi: 10.1038/nm0395-249.
131. Hiyama, E., Kodama, T., Shinbara, K., Iwao, T., Itoh, M., Hiyama, K., Shay, J. W., Matsuura, Y., and Yokoyama, T. (1997) Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors, *Cancer Res.*, **57**, 326-331.
132. Naito, Y., Takagi, T., Handa, O., Ishikawa, T., Matsumoto, N., Yoshida, N., Kato, H., Ando, T., Takemura, T., Itani, K., Hisatomi, H., Tsuchihashi, Y., and Yoshikawa, T. (2001) Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and catalytic subunits in precancerous and cancerous colorectal lesions, *Tumor Biol.*, **22**, 374-382, doi: 10.1159/000050640.
133. Ouellette, M. M., Liao, M., Herbert, B.-S., Johnson, M., Holt, S. E., Liss, H. S., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2000) Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase, *J. Biol. Chem.*, **275**, 10072-10076, doi: 10.1074/jbc.275.14.10072.
134. Marinaccio, J., Micheli, E., Udriou, I., Di Nottia, M., Carrozzo, R., Baranzini, N., Grimaldi, A., Leone, S., Moreno, S., Muzzi, M., and Sgura, A. (2023) TERT extra-telomeric roles: antioxidant activity and mitochondrial protection, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 4450, doi: 10.3390/ijms24054450.
135. Martens, A., Schmid, B., Akintola, O., and Saretzki, G. (2020) Telomerase does not improve DNA repair in mitochondria upon stress but increases MnSOD protein under serum-free conditions, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 27, doi: 10.3390/ijms21010027.
136. De Jesus, B. B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A. M., Ayuso, E., Bosch, F., and Blasco, M. A. (2012) Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer, *EMBO Mol. Med.*, **4**, 691-704, doi: 10.1002/emmm.201200245.
137. De Jesus, B. B., Schneeberger, K., Vera, E., Tejera, A., Harley, C. B., and Blasco, M. A. (2011) The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence, *Aging Cell*, **10**, 604-621, doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00700.x.

138. Fernandez, M. L., Thomas, M. S., Lemos, B. S., DiMarco, D. M., Missimer, A., Melough, M., Chun, O. K., Murillo, A. G., Alyousef, H. M., and Medina-Vera, I. (2018) TA-65, a telomerase activator improves cardiovascular markers in patients with metabolic syndrome, *Curr. Pharm. Des.*, **24**, 1905-1911, doi: 10.2174/1381612824666180316114832.
139. Bawamia, B., Spray, L., Wangsaputra, V. K., Bennaceur, K., Vahabi, S., Stellos, K., Kharatikoo-paei, E., Ogundimu, E., Gale, C. P., Keavney, B., Maier, R., Hancock, H., Richardson, G., Austin, D., and Spyridopoulos, I. (2023) Activation of telomerase by TA-65 enhances immunity and reduces inflammation post myocardial infarction, *Geroscience*, doi: 10.1007/s11357-023-00794-6.
140. Yegorov, Y. E., Poznyak, A. V., Bezsonov, E. E., Zhuravlev, A. D., Nikiforov, N. G., Vishnyakova, K. S., and Orekhov, A. N. (2022) Somatic mutations of hematopoietic cells are an additional mechanism of body aging, conducive to comorbidity and increasing chronification of inflammation, *Biomedicines*, **10**, 782, doi: 10.3390/biomedicines10040782.
141. Yegorov, Y. E. (2022) Telomerase: role in health and aging, *Biomedicines*, **10**, 2957, doi: 10.3390/biomedicines10112957.
142. Gutkin, A., Uziel, O., Beery, E., Nordenberg, J., Pinchasi, M., Goldvaser, H., Henick, S., Goldberg, M., and Lahav, M. (2016) Tumor cells derived exosomes contain hTERT mRNA and transform nonmalignant fibroblasts into telomerase positive cells, *Oncotarget*, **7**, 59173-59188, doi: 10.18632/oncotarget.10384.
143. Likonen, D., Pinchasi, M., Beery, E., Sarsor, Z., Signorini, L. F., Gervits, A., Sharan, R., Lahav, M., Raanani, P., and Uziel, O. (2022) Exosomal telomerase transcripts reprogram the microRNA transcriptome profile of fibroblasts and partially contribute to CAF formation, *Sci. Rep.*, **12**, 16415, doi: 10.1038/s41598-022-20186-8.
144. Lanna, A., Vaz, B., D'Ambra, C., Valvo, S., Vuotto, C., Chiurchiù, V., Devine, O., Sanchez, M., Borsellino, G., Akbar, A. N., De Bardi, M., Gilroy, D. W., Dustin, M. L., Blumer, B., and Karin, M. (2022) An intercellular transfer of telomeres rescues T cells from senescence and promotes long-term immunological memory, *Nat. Cell Biol.*, **24**, 1461-1474, doi: 10.1038/s41556-022-00991-z.
145. Wang, S., Madu, C. O., and Lu, Y. (2019) Telomere and its role in diseases, *Oncomedicine*, **4**, 1-9, doi: 10.7150/oncm.28210.

OLOVNIKOV, TELOMERES AND TELOMERASE. IS IT POSSIBLE TO PROLONG A HEALTHY LIFE?

Review

Y. E. Yegorov

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: yegorov58@gmail.com*

The science of telomeres and telomerase has made tremendous progress in recent decades. In this review, we consider it first in a historical context (the Carrel-Hayflick-Olovnikov-Blackburn chain of discoveries) and then review current knowledge of telomere structure and dynamics in norm and pathology. Central to the review are the consequences of telomere shortening, including telomere position effects, DNA damage signaling, and increased genetic instability. Cell senescence and the role of telomere length in its development are discussed separately. Therapeutic aspects and risks of telomerase and other telomere lengthening methods are also discussed.

Keywords: telomeres, telomerase, aging, carcinogenesis, Olovnikov, telomere crisis, cell senescence, inflammatory aging, genetic instability

НЕСТАБИЛЬНАЯ ДНК НЕЙРОНОВ: СЧЕТЧИК ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ И ДРАЙВЕР ЭВОЛЮЦИИ

Обзор

© 2023 В.Е. Дьяконова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
119334 Москва, Россия; электронная почта: dyakonova.varvara@gmail.com

Поступила в редакцию 17.07.2023

После доработки 17.09.2023

Принята к публикации 20.09.2023

Произошедшее в последнее десятилетие осознание постмитотической нестабильности ДНК нейронов как платы за электрическую активность и высокую пластичность их эпигенома меняет теоретический ландшафт не только нейронауки, но и шире — биологии. Действительно, как предполагал А.М. Оловников, именно ДНК нейронов может быть «инициальным субстратом старения», сейчас накоплено уже много данных, существенно повысивших вероятность этой гипотезы. Обзор посвящен их анализу. Как нейрональная ДНК накапливает повреждения, в каких областях генома, какие факторы способствуют их накоплению и насколько они могут быть связаны со старением и продолжительностью жизни? Кроме того, нестабильность ДНК нейронов, очевидно, сопровождалась поиском в эволюции Metazoa разных способов снижения биологической платы за работу мозга, став своеобразным драйвером этой эволюции. Такие явления, как сон, увеличение числа нейронов в эволюции позвоночных, взрослый нейрогенез, распределенная активность нейронов, соматическая полиплоидия, редактирование РНК у головоногих моллюсков, приобретают новый смысл при рассмотрении их в свете решения компромисса «пластичность—нестабильность нейрональной ДНК». Тема имеет очевидное значение не только для фундаментальной нейронауки, но и для трансляционной медицины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нервная система, ДНК нейрона, постмитотический мутагенез, репарация ДНК, продолжительность жизни, эпигенетика, эволюция нервной системы.

DOI: 10.31857/S0320972523110052, **EDN:** MLCJEG

ВВЕДЕНИЕ

«Совокупность разных фактов свидетельствует о том, что именно головной мозг есть инициальный субстрат старения, а в клетках мозга этим субстратом является его ДНК».

А.М. Оловников (2003 г.)

Алексей Матвеевич Оловников широко известен выдающимися теоретическими достижениями в области механизмов регуляции продолжительности жизни и биологической хронометрии. Он предсказал существование теломер в делящихся клетках, ведущих отсчет клеточных делений, еще до их обнаружения в

эксперименте [1, 2]. Создав теломерную гипотезу старения клетки, А.М. Оловников продолжал интересоваться проблемой биологического времени вплоть до последних лет [3]. В 2003 г. вышла его большая теоретическая работа, посвященная редусомной гипотезе старения [4]. В ней он высказал следующее предположение: «Совокупность разных фактов свидетельствует о том, что именно головной мозг есть инициальный субстрат старения, а в клетках мозга этим субстратом является его ДНК». В 2003 г. экспериментальные данные были еще немногочисленны и разрозненны, однако в последние годы это предположение находит явное подтверждение в работах молекулярных нейробиологов.

Принятые сокращения: индели — вставки (небольшие инсерции или делеции); NMDA — N-methyl-D-aspartate; Rap1 — инициатор процессов репарации двухцепочечных разрывов ДНК; РТА — первичная амплификация, направленная на шаблон; SNV — мутации с заменой одного нуклеотида; Торо IIβ — топоизомераза II.

Цель статьи — анализ литературных данных преимущественно последних десяти лет, проливающих свет на то, как нейрональная ДНК накапливает повреждения, насколько они могут быть связаны со старением и продолжительностью жизни. Будет рассмотрено, какие факторы способствуют увеличению постмитотических повреждений ДНК нейронов и в каких именно областях генома. Эти новые данные о высокой нестабильности нейрональной ДНК меняют наши представления о многих процессах в нервной системе и ее эволюции.

ЕСЛИ НЕ НЕДОРЕПЛИКАЦИЯ, ТО ЧТО?

Одной из проблем «нейронального счетчика» биологического времени в нейронах является их дифференцированность, не предполагающая митозов во взрослой жизни [4, 5]. Следовательно, предложенный ранее А.М. Оловниковым способ «отсчета времени» для делящихся клеток путем укорочения специфической ДНК из-за недорепликации ее концевых участков во время митоза [4] не может использоваться в постмитотическом нейроне. А.М. Оловников был уверен, что «ради работы предполагаемых хрономер (в нейронах. — *Прим. автора*) природа должна была изобрести способ, который мог бы работать даже в отсутствие репликации» [4]. В последней публикации 2022 г. он предложил идею эпигенетического маркирования специализированной темпоральной ДНК [3]. Однако ранее он считал, что этот способ может быть основан на образовании разрывов ДНК (например, при интенсивной транскрипции) и неполной репарации, особенно концевых отделов гипотетической хрономерной ДНК [4]. Лишь через десять лет после выхода этой публикации появились первые экспериментальные данные, свидетельствующие об образовании одно- и двухцепочечных разрывов ДНК с последующей репарацией в нейронах даже при обычной физиологической активности.

НОРМАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИВОДИТ К ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК НЕЙРОНОВ

2013 год еще не оценен нейробиологическим сообществом как год крупнейшего и, возможно, одного из самых неожиданных открытий в нейробиологии, последствия которого в полной мере будут осознаны позже. Группа исследователей, занимавшихся болезнью Альцгеймера на модельной линии мышей, не-

ожиданно обнаружила высокую частоту двухцепочечных разрывов ДНК в разных отделах мозга не только у опытной, но и у контрольной «здоровой» группы животных после двух часов обычной активности в открытом поле [6]. Через 24 часа у контрольных мышей большинство разрывов было репарировано, у животных с болезнью Альцгеймера и число нейронов с фрагментацией ДНК, и степень фрагментации ДНК (оцениваемой по длине «флуоресцентного» хвоста, высвобождаемого в электромагнитном поле ядрами нейронов с поврежденной ДНК) сохранялись достоверно более высокими. Удаление надпочечников и введение пеллеты, поддерживающей уровень кортикостероидов на постоянном физиологическом уровне, не привело к уменьшению двухцепочечных разрывов ДНК. Следовательно, стресс не объясняет их появление после активности животного в открытом поле. При этом не только активное поведение, но и сенсорная стимуляция у здоровых животных приводит к фрагментации ДНК в областях мозга, связанных с сенсорным потоком. Так, латеральная оптическая стимуляция повышала число нейронов с двухцепочечными разрывами в визуальной коре с соответствующей стороны [6]. Наконец, оптогенетическая стимуляция стриатума увеличивала число нейронов с меткой двухцепочечных разрывов [6].

Уже через два года методом полногеномного секвенирования ДНК нового поколения было показано, что сама электрическая активность нейронов, их возбуждение, может быть причиной образования двухцепочечных разрывов [7]. Причем именно повреждение ДНК является связующим звеном между электрической активностью и транскрипцией нейрональных генов раннего ответа (EIG), таких как *Fos*, *Npas4*, *Egr1*. (Примечательно, что ранее экспрессию этих генов использовали как маркер активных нейронов.) Образование двухцепочечных разрывов в промоторных областях генов раннего ответа оказалось достаточным для активации их экспрессии. Предполагается, что ферментом, связывающим электрическую активность и образование двухцепочечных разрывов, может быть топоизомераза II (Торо II β). Именно она катализирует временный разрыв и воссоединение двух цепей ДНК, репарация приводит к деметилированию ДНК промоторных областей и транскрипции генов раннего ответа. Нокаут гена, кодирующего Торо II β , снимает вызванное электрической активностью образование двухцепочечных разрывов и транскрипцию генов раннего ответа [7]. В 2022 г. появилась работа, проливающая свет на механизмы влияния возбуждения на

состояние Торо IIβ [8]. Показано, что приток кальция в ответ на активацию возбуждающих глутаматных рецепторов NMDA-типа (ионотропные рецепторы, связывающие N-метил-D-аспарат) активирует фосфатазу кальцинейрин. Кальцийнейрин дефосфорилирует Торо IIβ по остаткам S1509 и S1511, что стимулирует активность последней по расщеплению ДНК и ведет к образованию двухцепочечных разрывов. При этом взаимодействие кальцинейрина с Торо IIβ при электрической активности нейрона преимущественно локализуется на ядерной периферии в нейронах, там же происходят и разрывы ДНК [8]. Таким образом, в работе сделан еще один важный для концепции А.М. Оловникова вывод о том, что разрывы ДНК и их последствия должны накапливаться в локализованных участках генома. Помимо кальциевого пути образования двухцепочечных разрывов, не следует забывать и про менее специфичное влияние интенсивного метаболизма в нейронах, ведущего к образованию свободных радикалов и активных форм кислорода, которые также остаются признанными факторами нестабильности для нейрональной ДНК [9].

Поиск горячих точек повреждения нейронального генома был осуществлен и в отношении одноцепочечных разрывов ДНК [10, 11]. Оказалось, что постмитотические нейроны человека, выращенные в культуре из плюрипотентных клеток, накапливают неожиданно высокие уровни одноцепочечных разрывов, причем в определенных участках генома. Полногеномное картирование свидетельствует о том, что эти разрывы расположены в энхансерах на динуклеотидах CpG (дезоксигуанозин и дезоксицитидин, соединенные фосфодиэстерной связью) или рядом с ними и участках деметилирования ДНК [10]. Похожие выводы сделаны и в работе 2021 г. [12], в которой показано, что репарация ДНК (следовательно, и исходные повреждения) часто происходит в четко определенных горячих точках, которые соседствуют с важными генами. Эти горячие точки обогащены изоформами гистонов γH2AX и РНК-связывающими белками и связаны с эволюционно консервативными регуляторными элементами генома человека. Все это были ошеломляющие результаты, которые требовали осмысления.

РАЗРЫВЫ ДНК – МЕХАНИЗМ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ИЛИ ПЛАТА ЗА НЕЕ?

2013 год знаменателен для развития обсуждаемой области исследований еще одной,

опубликованной на русском языке, теоретической работой Алексея Крушинского [13] (позже переработанная версия вышла в журнале открытого доступа [14]). В ней на основании информационно-энтропийных представлений Леона Бриллюэна была высказана гипотеза, что за получение новой информации мозг платит не только энергией, но и утратой исходной информации. Сейчас представляется, что эта гипотеза удивительно красиво описывает события, с которыми столкнулись молекулярные нейробиологи при изучении нейрональной ДНК, «инициального субстрата» ума и старения.

В статье Madabhushi et al. [7], впервые связавшей нейрональную активность и транскрипцию ранних нейрональных генов с образованием двухцепочечных разрывов, был сделан эпатажный вывод о том, что нарушение целостности генома мозга – нормальное физиологическое явление, которое к тому же имеет решающее значение для пластических изменений в синапсах, обучения и памяти, поскольку в этих процессах необходимо участие генов раннего ответа. «Не порвешь ДНК – не запомнишь» – эта интерпретация была подхвачена рядом исследователей, которые экспериментально подтверждали необходимость «временной порчи ДНК» для реализации разных видов памяти и обучения [15] либо придерживались этого взгляда в обзорных работах [16]. Некоторые экспериментаторы отнеслись более настороженно к новой парадигме памяти на уровне ДНК: «порвал, репарировал, запомнил» [17–19]. Ведь репарация – процесс не 100%-ной эффективности, и если разрывы ДНК столь часто происходят, значит неизбежно будут накапливаться повреждения генома мозга и в виде недорепарации, и в виде ошибок – мутаций. Накапливаются ли они?

МНОГО ЛИ В ГЕНОМАХ ОТДЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ МУТАЦИЙ И КАК ОНИ РАСПРЕДЕЛЕНЫ?

Секвенирование геномов отдельных нейронов мышей [20] выявило необычно высокую частоту постмитотических мутаций в эволюционно консервативных частях их генома, в экзонах и промоторах генов с самыми высокими уровнями экспрессии. То есть мутации накапливаются тоже в горячих точках и примерно тех же, по которым происходят разрывы. Наиболее частым типом мутации была замена одного нуклеотида (SNV) [20], что может быть следствием ошибки работы ДНК-

Повреждения ДНК в нейронах при физиологической активности или физиологических воздействиях

Вид повреждений ДНК нейрона	Объект	Воздействие	Год	Источник
Двухцепочечные разрывы	мышь, дикий тип	исследовательское поведение в открытом поле	2013	[6]
Двухцепочечные разрывы	мышь, hAPP (модель болезни Альцгеймера)	исследовательское поведение в открытом поле	2013	[6]
Двухцепочечные разрывы	мышь, дикий тип	зрительная стимуляция	2013	[6]
Двухцепочечные разрывы	мышь, Adora2a-Cre	оптическая стимуляция стриатума	2013	[6]
Двухцепочечные разрывы	первичные культуры нейронов мыши	амилоид- β -олигомеры (N-methyl-D-aspartate (NMDA)-зависимый эффект)	2013	[6]
Двухцепочечные разрывы	первичные культуры нейронов мыши	хлорид калия (KCl) или NMDA или биккуллин (повышение возбуждения нейронов)	2015, 2023	[7, 19]
Двухцепочечные разрывы	мышь, срезы гиппокампа	агонист глутаматных рецепторов NMDA	2015, 2022	[7, 8]
Двухцепочечные разрывы	мышь, гиппокамп	реконсолидация памяти	2020	[15]
Двухцепочечные разрывы	рыба <i>Danio rerio</i>	обычная дневная активность	2018	[32, 33]
Двухцепочечные разрывы	<i>Drosophila</i> , личинки и взрослые особи	без воздействия	2020	[75]
Одноцепочечные разрывы	нейроны человека, полученные из плюрипотентных клеток	без воздействия	2021	[10–12]
Мутации (однонуклеотидные замены, индели)	мышь, клонированные нейроны	без воздействия	2016	[20]
Мутации (однонуклеотидные замены, индели)	нейроны человека	без воздействия	2012, 2018, 2022	[21, 23, 24]

полимераз, участвующих в репарации. К сходному выводу пришли и при анализе мутаций в нейронах человека [21, 22, 23]. В работе Luquette et al. [23] использован улучшенный метод амплификации primary template-directed amplification (PTA), позволяющий снизить количество артефактов при обнаружении соматических мутаций при секвенировании ДНК. Были проанализированы данные полногеномного секвенирования пятидесяти двух PTA-амплифицированных одиночных нейронов с использованием SCAN2, нового генотипирования, разработанного авторами для идентификации SNV, а также небольших инсерций и

делеций (indels, инделей). Результаты подтвердили увеличение соматических мутаций в одиночных нейронах человека с возрастом и то, что накапливаются они в функциональных областях генома, таких как энхансеры и промоторы. Кроме того, была пересмотрена предполагаемая скорость этого накопления до 16 SNV в год (ранее ее оценивали несколько выше — до 23 SNV в год [24]). Минимальную скорость накопления инделей оценили как 3 в год на нейрон. Авторы предполагают, что обнаруженные мутации в регуляторных областях генома оказывают значительное влияние на его целостность в нейронах человека [23]. Насколько это

накопление значимо для функционирования мозга и организма в целом? В настоящее время активно исследуется возможная связь между количеством мутаций в геноме нейронов и нейродегенеративными заболеваниями, и данные свидетельствуют о наличии положительной корреляции [18, 22, 24–26].

В таблице собраны основные данные о повреждении ДНК нейронов при нормальной физиологической активности или физиологических воздействиях на организм.

НЕЙРОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СНИЖАЕТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ

Весомым аргументом в пользу того, что за работу нейрона организм расплачивается чем-то действительно значимым, стали данные, полученные в 2019 г. [27], свидетельствующие о прямом влиянии уровня возбуждения нейронов на продолжительность жизни. Начиналась работа с поиска генов, активных во фронтальной коре человека, состояние которых может быть связано с его здоровым долголетием. Был проведен дифференциальный анализ их экспрессии у когнитивно-здоровых людей в двух группах: умерших в возрасте 70–80 и 85–100 лет. Ранее та же группа исследователей обнаружила увеличение экспрессии белка гена *REST* у долгожителей [28]. В работе Zullo et al. [27] выявлена обратная корреляция между уровнем матричной РНК этого белка и мРНК целого ряда генов, связанных с нейрональным возбуждением. Уровень экспрессии этих генов, в промоторных областях которых обнаружен сайт связывания белка-репрессора *REST*, был, соответственно, достоверно ниже у долгожителей [27]. Следующая часть работы проведена на мышах для проверки связи гена *REST* с электрической активностью нейронов. Нейроны мышей с выключенным геном *REST* накапливали больше 2-фтор-2-дезоксид-Д-глюкозы (аналог глюкозы, захват которой усиливается при возбуждении), сами животные чаще проявляли эпилептиформную активность. Полученные результаты намекали на возможную связь между возбуждением и продолжительностью жизни у млекопитающих. Доказали эту связь, используя далекий от млекопитающих модельный объект — нематоду *Caenorhabditis elegans*. У этих животных есть ортолог гена *REST* млекопитающих — *spr-4*, про который ранее было известно, что его продукт защищает клетки от повреждающих воздействий активных форм

кислорода и некоторых других неблагоприятных воздействий. Был использован обширный арсенал средств от фармакологических влияний, меняющих уровень возбуждения в ту или иную сторону, до получения животных с выключенным или, наоборот, гиперактивированным геном *spr-4* (с помощью системы CRISPR-Cas9), а также с активированными или выключенными группами нейронов возбуждающего или тормозного влияния. Результаты однозначно указывали на то, что продолжительность жизни увеличивается при подавлении возбуждения и снижается — при его повышении. Почему? Может показаться удивительным, но авторы этого открытия, опубликованного в журнале «*Nature*», не обсуждают связь возбуждения с нарушением целостности генома и образованием двухцепочечных разрывов! В статье нет ссылок ни на первую работу 2013 г. [6], ни на работу 2015 г. [7], в которой нейрональное возбуждение и двухцепочечные разрывы ДНК вынесены даже в название.

При попытке глубже рассмотреть механизмы влияния нейронального возбуждения на продолжительность жизни представляются возможными несколько вариантов. Первый предполагает прямое влияние накопленных повреждений ДНК. Так, известно, что недорепарация двухцепочечных разрывов может запустить апоптоз нейрона (см., например, обзор Boutros et al. [16]). Возможен и прямой вред накопленных мутаций, снижающих общую жизнестойкость организма [18, 26]. Действительно, была обнаружена обратная корреляция между соматической мутационной нагрузкой и продолжительностью жизни у *Drosophila melanogaster* [29] и у млекопитающих, правда, у последних не в нейронах (которые не оценивали), а в эпителии кишечника [30]. Более того, сам эффект мутации на приспособленность может быть выше, чем предполагалось раньше, поскольку даже синонимичные мутации, считавшиеся ранее в основном нейтральными, оказались «сильно ненейтральными», поскольку меняли уровень экспрессии генов и оказывали влияние на организм [31].

Второй вариант, предполагающий существование нейрональной хроносомы [4], объяснял бы влияние нейронального возбуждения на скорость укорочения ДНК в ней. Критическое укорочение приводит к завершению жизни нейрона, а также, по гипотезе Оловникова [4], и к возможному гормональному влиянию на организм в целом.

Заметив, что митоз в делящихся клетках, а возбуждение — в нейронах являются основными факторами мутагенеза, в 2020 г.

Dyakonova [5] предположила существование косвенного нейронного счетчика мутаций. Поскольку теломеры в делящихся клетках, отсчитывая деления, косвенно определяют и количество накопленных мутаций, то возможно в нейронах существует подобный счетчик возбуждения, который оценивает длительность его истории и определяет продолжительность жизни нейрона. Таким счетчиком мог бы быть ген, экспрессия которого градуально и невосстановимо снижается при возбуждении нейрона, а продукт которого является репрессором апоптоза.

Результаты работы израильской группы Zada et al. [32, 33] свидетельствуют о том, что сами ферменты репарации ДНК могут активировать такие функциональные процессы на организменном уровне, как сон. Так, оказалось, что полимераза *Parg1* — инициатор процессов репарации двухцепочечных разрывов ДНК, накопившихся после дневной активности, вызывает сон и у мальков рыб, и у взрослых мышей. Активность *Parg1* повышается при депривации ото сна, а ингибирование активности *Parg1* снижает ночную динамику движения хромосом и репарацию поврежденных ДНК, накопленных во время дня. Эти данные позволяют предположить, что счетчик потенциально накопленных мутаций может включать и сигналы активности систем репарации.

Конечно, в целом механизмы влияния нейронального возбуждения на продолжительность жизни еще предстоит выяснить, однако участие разрывов нейрональной ДНК в этих механизмах представляется весьма вероятным. Интересно, что А.М. Оловников ссылаясь в своей статье 2003 г. [4] на более старую работу, показавшую, что облучение мозга, ведущее к фрагментации ДНК нейронов, сокращает жизнь личинок дрозофил [34]. К сожалению, в те годы еще не было известно, что нейрональное возбуждение сходным образом влияет и на стабильность ДНК, и на продолжительность жизни. Однако его тезис, что именно «головной мозг есть инициальный субстрат старения, а в клетках мозга этим субстратом является его ДНК», замечательно подтвердился.

Понимание того, что ДНК в дифференцированных нейронах чрезвычайно нестабильна, может существенно изменить многие представления о работе мозга и его эволюции. В следующих разделах будут приведены примеры того, как можно по-новому интерпретировать и некоторые давно известные факты, и недавние открытия, если рассмотреть их с этой точки зрения.

ПЛАТА ЗА УМ: ПЕРЕХОД НА МОЛЕКУЛЯРНЫЙ УРОВЕНЬ ИЗУЧЕНИЯ

Тот факт, что когнитивная активность не только дает колоссальные преимущества, но, по-видимому, имеет и определенную биологическую плату, известен давно. Эта тема обсуждалась применительно к людям; можно вспомнить знаменитый труд полуторавековой давности Чезаре Ломброзо «Гениальность и помешательство» [35], а также более современные исследования (например, Gale et al. [36] и Smith et al. [37]). Сформировалась отдельная область психологии, названная когнитивной эпидемиологией, изучающая взаимосвязь IQ с разными физиологическими, генетическими и социальными факторами у людей [38]. В целом, выявлена положительная корреляция IQ со здоровьем и продолжительностью жизни [38]. Автор объясняет ее прежде всего тем, что больной организм просто не способен обеспечить высокие когнитивные показатели. Очевидно, что и социальные факторы, такие как доступ к более качественным продуктам питания, условиям проживания и медицине, играют не последнюю роль в обеспечении этой положительной связи. С точки зрения предрасположенности к психическим болезням, благополучно выглядит средний и высокий IQ, тогда как низкий и очень высокий демонстрируют более высокую предрасположенность к биполярным расстройствам [36]. В последние годы эта область существенно обогатилась работами генетиков [39, 40]. Показано, что гены, характеризующие людей с выраженными творческими способностями, одновременно являются факторами риска разнообразных патологий [39]. Позже похожая корреляция с предрасположенностью к нейропатологии найдена и для генов, связанных со способностью получать высшее образование у человека [40].

О некоторых негативных последствиях когнитивной активности можно прочесть и в ряде исследований на млекопитающих [13, 14, 41–45]. В начале этого века были получены первые экспериментальные результаты, свидетельствующие о высокой биологической цене обучения и отбора на когнитивные навыки у беспозвоночных, мух [46–50]. У «умных» дрозофил была снижена стрессоустойчивость, плодовитость и продолжительность жизни. Похожую корреляцию между способностью к обучению и неустойчивостью к стрессу нашли у двух разных популяций улиток больших прудовиков [51, 52]. Однако методологические

ограничения и отсутствие понимания, где, на каком уровне искать механизмы связанности этих функций, приостановили развитие интересного и важного направления исследований. Отчасти этому способствовало и простое, ложно успокаивающее объяснение: мозг потребляет много энергии при когнитивной активности, значит другие органы или функциональные системы могут пострадать от ее недостатка [49, 50]. Теперь ситуация изменилась. Последние методы секвенирования генома нейронов, транскриптомного и эпигенетического анализа уже позволяют изучать молекулярную основу «платы за ум».

В предыдущих разделах обсуждалось влияние нейронального возбуждения на образование разрывов ДНК, но, помимо этого, существует еще и эпигенетический субстрат когнитивных функций, который также может повышать предрасположенность генома нейронов к накоплению повреждений.

Тезис, что когнитивные функции основаны на пластичности экспрессии нейронального генома, появился уже более 15 лет назад и сейчас подтверждается экспериментально на позвоночных [53, 54] и беспозвоночных [55, 56]. Открытое состояние хроматина и деметилирование ДНК, как правило, соответствуют более высоким когнитивным уровням [57–61]. В последнее время появились дополнительные данные, свидетельствующие о том, что не только обучение и память, но и новая среда, стимулирующая нейрогенез и обучение, на уровне генома нейронов проявляется в деконденсации хроматина [62]. Такие же эффекты вызывает двигательная активность, также стимулирующая нейрогенез и память, причем даже у потомков первого поколения [63–65]. Наконец, длительное возбуждение, по некоторым данным, также предрасполагает геном нейронов к деметилированию ДНК и/или деконденсации гетерохроматина [66–68]. Теоретически оба процесса снижают защиту ДНК от возможных мутаций, увеличивая также вероятность вставок мобильных элементов. Упомянувшееся выше накопление инделей геномом нейронов (промоторами их генов с возрастом) может быть связано с активностью мобильных элементов (см., например, Dumitrache и McKinnon [69]), а не только с репарацией разрывов ДНК.

Другими словами, за получение новой информации, мышление и пластичность мозг, по-видимому, расплачивается повреждением своей генетической информации. Однако постмитотические повреждения ДНК нейронов — это новая проблема для исследователей (пер-

вые данные получены всего 10 лет назад). В эволюционном отношении она, напротив, давняя — появилась, по-видимому, одновременно с первыми нейронами (примерно 600 млн лет). Очевидно, что так или иначе она решена в ходе эволюции и, возможно, по-разному в разных таксонах. В следующих разделах будут рассмотрены некоторые возможные эволюционные решения задачи: как минимизировать мутационную стоимость пластичности мозга и ее биологических последствий?

ВОЗМОЖНЫЕ ЭВОЛЮЦИОННЫЕ РЕШЕНИЯ СНИЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТЫ ЗА ПЛАСТИЧНОСТЬ МОЗГА

Репаративные системы ДНК в головном мозге.

Достаточно очевидно, что в условиях, когда активность нейронов представляет неотъемлемый риск для стабильности их генома, одним из путей адаптации к нейрональной активности будет усовершенствование систем репарации в мозге. Действительно, нокаут генов репаративной системы, связанной с репарацией только одноцепочечных разрывов ДНК, вызвал множественные ошибки в функционально значимых участках генома, преимущественно в области энхансеров [10]. Авторы предположили, что нарушение этой системы связано с нейродегенеративными заболеваниями человека. Действительно, при любом дефиците репарации ДНК в нейронах должен возрастать риск патологий. Анализ этой взаимосвязи, так же как и изучению нейрональных систем ДНК-репарации, уделяется большое внимание в последнее время. Подробнее познакомиться с текущей ситуацией по этому вопросу можно в обзоре Li et al. [25].

Работа, вышедшая в феврале 2023 г., свидетельствует о том, что нейроны в ходе эволюции приобрели и специализированные механизмы защиты генома, которые позволяют им десятилетиями выдерживать воздействие повреждающих факторов в периоды повышенной активности [19]. Был идентифицирован механизм репарации ДНК, зависящий от активности нейрона, в котором новая форма модификатора хроматина NuA4-TIP60 собирается в активированных нейронах в районах локализации индуцируемого, специфичного для нейронов фактора транскрипции NPAS4. Исследуя картину двухцепочечных разрывов ДНК, вызванных активностью в головном мозге, авторы показали, что NPAS4–NuA4 связывается с поврежденными регуляторными элементами.

Нарушения в новой системе репарации NPAS4–NuA4 приводили к каскаду клеточных дефектов, включая нерегулируемые изменения транскрипции, потерю контроля над ингибированием нейронов и нестабильность генома, кульминацией которых может быть сокращение продолжительности жизни организма. Таким образом, был обнаружен специфический для нейронов комплекс, который напрямую связывает активность нейронов с защитой стабильности генома. Эти результаты хорошо согласуются с гипотезой о том, что одним из важных путей эволюции нервной системы должно быть усовершенствование систем репарации ДНК.

Минимизация синхронности открытых состояний хроматина и электрического возбуждения? Хотя за возбуждением нейронов часто следует повышение экспрессии генов [66–68, 70, 71], для нейрона было бы безопаснее избегать синхронности электрической активности и эпигенетических процессов, характеризующихся открытым состоянием ДНК. Еще в 1966 г. были получены первые данные на нейронах моллюсков, показавшие, что электрическая стимуляция вызывает транзиторное торможение синтеза мРНК с сильным эффектом отдачи (увеличение синтеза выше исходного уровня) после окончания электрической активности [72, 73]. Эти данные рассматривались в рамках гипотезы о перераспределении метаболизма и экономии энергии клеткой при возбуждении. Однако при современном понимании угрозы стабильности ДНК, сопровождающей возбуждение, они приобретают новое значение. Транзиторное выключение экспрессии может рассматриваться как механизм защиты нейрональной ДНК.

Другие уже упомянутые данные свидетельствуют о том, что активное remodelирование хроматина и репарация ДНК мотонейронов рыб происходят во время сна, характеризующегося также выключением электрической активности этих нейронов [32]. Несколько относительно недавних обзоров обобщают текущее состояние в области изучения временной зависимости экспрессии генов от активности нейронов у млекопитающих и модельных беспозвоночных [70, 71, 74], иллюстрируя ее сложный и неоднозначный характер.

Полиплоидия нейронов. Накопление большого количества мутаций ДНК нейронами даже здоровых людей и животных свидетельствует о том, что механизмы репарации все равно недостаточно эффективны, чтобы обеспечить стабильность нейронального генома. В такой ситуации создание «подушки гене-

тической безопасности» могло бы быть еще одним эффективным механизмом снижения биологической платы за работу нервной системы. Поскольку мутация – это случайный процесс, простое увеличение количества копий генома может выполнять роль такой подушки безопасности. При этом увеличить число копий можно по-разному. Если это сделать в пределах одного нейрона, мы столкнемся с известным явлением соматической полиплоидии в нейронах. Можно увеличить число самих нейронов, сделать много нейронов-носителей этих копий. В разных таксонах животных, по-видимому, реализовывались разные варианты этого решения. Так, позвоночные используют преимущественно последний механизм, увеличение числа клеток-носителей, а некоторые первичноротые, например, брюхоногие моллюски, но не только [75, 76] – соматическую полиплоидию.

Гигантские по размеру нейроны, достигающие 1 мм в диаметре, большую часть которых занимает ядро, были известны давно у многих брюхоногих моллюсков [77, 78]. Затем стало понятно, что гигантское ядро заполнено множественными копиями генома [78, 79]. Их число может достигать 600 000 копий (C) [76]. Долгое время считалось, что эти многочисленные копии необходимы для обеспечения метаболизма гигантской клетки и связаны с гигантизмом нейронов. С появлением данных о повреждении ДНК в нейронах логично предположить, что нейрональная полиплоидия отражает реализацию одного из эволюционных решений, позволяющих снизить последствия этих повреждений. Экспериментальные данные в пользу этой гипотезы были получены на представителе другого таксона – насекомых, у которых нейрональная полиплоидия, хотя и встречается, однако выражена значительно слабее [75]. Были подробно описаны некоторые видовые, а также сцепленные с полом и возрастом отличия по количеству полиплоидных нейронов в мозге трех разных видов дрозофил. В среднем доля полиплоидных, главным образом тетраплоидных (4 C), нейронов оценивалась в 10–15% во взрослом мозге. Наибольшее число таких нейронов было обнаружено в оптических долях мозга и показано, что тетраплоидия не является результатом клеточного слияния (cell fusion). Интересно, что именно в оптических областях выявлено и наибольшее число двухцепочечных разрывов ДНК в нейронах. Наконец, используя фармакологический метод (введение этопозида) для образования двухцепочечных разрывов ДНК, обнаружили, что ответом на такое

воздействие стало достоверное увеличение доли полиплоидных нейронов. И, возможно, самое главное — полиплоидные нейроны лучше выживали по сравнению с диплоидными при вызванных повреждениях ДНК [75]. Таким образом, эта работа подтвердила сразу два предположения, касающиеся роли нейрональной полиплоидии. Первое — полиплоидия действительно может защищать клетку при повреждении ДНК, второе — в нейронах существует механизм активации эндорепликации ДНК в ответ на повреждение ДНК.

Очевидно, эти данные заставляют по-новому взглянуть и на явление нейрональной полиплоидии в мозге человека. Ранее уже была выявлена корреляция между нейродегенеративными заболеваниями и увеличением числа полиплоидных нейронов, и какое-то время полиплоидия рассматривалась как возможная причина патологии [80, 81]. Однако сейчас более вероятным представляется взгляд, что полиплоидия возникла в ответ на повреждения ДНК (которые являются, по-видимому, основной причиной нейродегенерации) как попытка реализовать один из защитных механизмов нейрона.

«Альтруистические» нейроны позвоночных и глутамат. Если сравнить эффективность двух решений увеличения копий генома (в пределах одной клетки или путем создания множественных клеточных носителей этих копий), то соматическая полиплоидия представляется сравнительно худшим решением. Во-первых, здоровые копии поврежденного гена в полиплоидной клетке будут выполнять свою защитную функцию только до тех пор, пока мутация не приведет к синтезу «токсичных» продуктов, губительных для функционирования клетки. Во-вторых, она не дает возможность пожертвовать поврежденным нейроном без тяжелых последствий для остального мозга. Как уже упоминалось выше, мозг позвоночных, по-видимому, избрал второй путь. Накопившие мутации и повреждения ДНК нейроны погибают, но их эпигенетические и функциональные клоны сохраняют необходимую информацию, которая остается пригодной для использования. Кроме того, избыточность представляет условия для распределенной активности между нейронами, что снижает мутационную нагрузку на каждую клетку в отдельности и позволяет организму дольше сохранять нейроны. Это предположение хорошо согласуется с многочисленными данными о том, что одна и та же задача выполняется каждый раз несколько разными популяциями нейронов [82, 83].

Если мы рассмотрим эволюцию мозга позвоночных с этой точки зрения, то сможем утверждать, что быстрое увеличение числа нейронов в эволюции позвоночных служило, по-видимому, в первую очередь защите мозга и обеспечению необходимой продолжительности жизни организма. Однако одновременно оно оказалось преадаптацией к развитию когнитивных способностей. С этим предположением хорошо согласуются данные об увеличении размеров мозга человека в эволюции, не сопровождавшемся в течение миллионов лет усложнением орудий труда [84]. А также патогенез некоторых нейродегенеративных заболеваний, например болезни Паркинсона, при которых происходит бессимптомная гибель до 30–70% нейронов в разных областях мозга [85]. Эти данные свидетельствуют об огромной подушке безопасности в человеческом мозге в виде большого числа эпигенетически похожих и взаимозаменяемых нейронов.

Функциональному пересмотру может быть подвержен и взрослый нейрогенез. Раньше его активация рассматривалась как механизм повышения когнитивной активности, способности обучаться и запоминать информацию в новой среде [86]. Теперь его можно рассматривать и как защитный механизм, срабатывающий при ожидании повышенной когнитивной нагрузки.

Появившиеся в последнее время данные свидетельствуют о том, что в эволюции мозга позвоночных увеличение числа нейронов было достигнуто в основном благодаря увеличению доли глутаматных нейронов [87]. Если у грызунов она определяется в 50%, то у человека — достигает уже 80% [87]. Это выглядит парадоксально, поскольку более сложные системы обычно более разнообразны. Если предположить, что дополнительные нейроны нужны были сначала как подушка безопасности, как дополнительный запас хранителей генома, то в этом есть смысл. Почему глутаматергический фенотип мог быть использован для этой цели, было хорошо объяснено в нескольких недавних публикациях Moroz et al. [87–89]. Если пересказать кратко, то потому что развитие глутаматергического фенотипа энергетически дешево и эпигенетически просто (требуется экспрессировать только везикулярный переносчик глутамата, сама глутаминовая кислота присутствует во всех клетках как основной метаболит). Еще одним интересным открытием является то, что позвоночные утратили разнообразие глутаматных рецепторов, по сравнению с другими группами, и сохранили только возбуждающие типы рецепторов [87].

Интересно подумать о том, какие преимущества могли быть при этом получены.

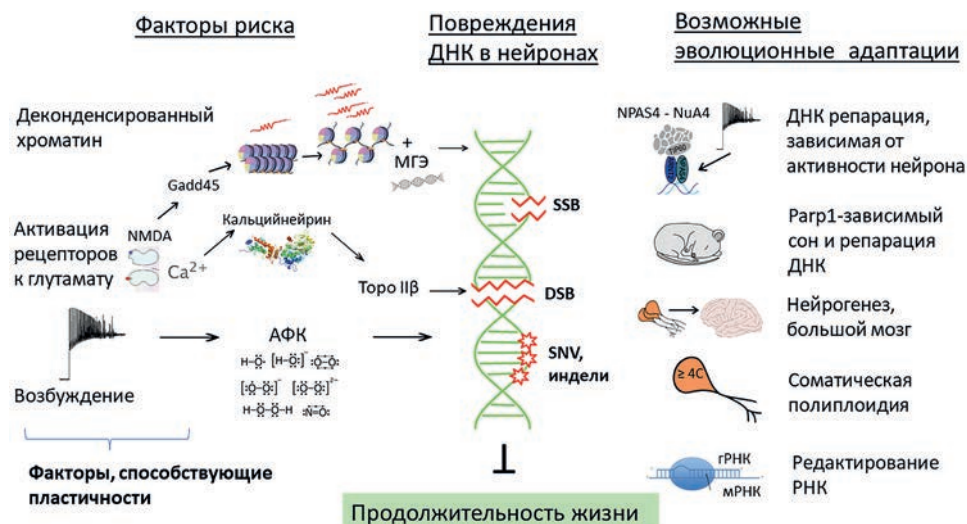
Возбудимость на физиологическом уровне обеспечивает условия для выхода из устойчивых состояний и образования новых ансамблей нейронов. Еще большей пластичности и разнообразия можно добиться при повышении пластичности эпигенома. Действительно, имеются данные о внутриклеточных каскадах, связывающих глутаматные рецепторы NMDA и AMPA с фактором декомпактизации гетерохроматина Gadd45 [90]. То есть возбуждающий глутамат, по-видимому, связан с обеими функциями, повышающими пластичность, на физиологическом и эпигенетическом уровне. В этом может быть еще одно преимущество этого нейронального трансмиссивного фенотипа. Однако глутамат через ионотропные рецепторы стимулирует образование разрывов ДНК и их репарацию [91], а возбуждение, как уже упоминалось, сокращает продолжительность жизни [27]. Если это так, то ставка на глутаматный фенотип нейронов в эволюции позвоночных могла и должна была простимулировать естественный отбор на раскручивание процесса увеличения числа нейронов для снижения биологической платы за повреждение ДНК при глутаматергической сигнализации [92].

Перенос пластичности на уровень РНК у головоногих моллюсков. Нестабильность ДНК в нейронах могла стать причиной еще одного интересного явления, найденного сравнительно недавно у головоногих моллюсков. Речь идет о модификации транскриптов на уровне РНК, которая подвергается масштабному редактированию (или рекодированию) и особенно в нервной системе, где практически все транскрипты подвергаются редактированию [93, 94]. При этом 65% сайтов редактирования, обнаруженных в кодирующих последовательностях, являются несинонимичными. Только один вид редактирования, а именно A-to-I (замена аденозина на инозин), происходит по более чем 70 000 сайтов у головоногих, в отличие от ~1000 сайтов — у дрозофилы и ~3000 — у человека [95]. При этом, в отличие от млекопитающих, у головоногих есть явные признаки отбора на увеличение сайтов редактирования РНК функционально значимых генов [93, 95]. Показано, что редактирование отражается на структуре и функции белков [93]. Для одного случая (рекодирование транскрипта белка калиевого канала) даже найдено биологическое значение в адаптации к разной температуре обитания у осьминогов [96].

Однако самой важной находкой стала демонстрация «защитной роли» редактирования РНК для сохранения стабильности генома. Она послужила названием для статьи «Trade-off between transcriptome plasticity and genome evolution in cephalopods» [93]. Когда оценили распределение мутаций, таких как делеции, синонимичные и несинонимичные однонуклеотидные замены, то оказалось, что меньше всего их накапливают области ДНК, близко расположенные к сайтам редактирования РНК. В целом, у разных видов головоногих от 23 до 41% генома оказалось стабилизировано, эти участки совпали с областями транскрипции редактируемых РНК. Механизмы такого переноса пластичности остаются еще не изученными. Можно предположить, что драйвером к процессу переноса пластичности на уровень РНК могла стать защита именно нестабильной ДНК нейронов. Возможно, это нестандартное решение в сочетании с увеличением числа нейронов обеспечило и выдающуюся когнитивную эволюцию головоногих моллюсков, занимающих первое место среди первичноротых по уровню развития умственных способностей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, произошедшее в последнее десятилетие осознание постмитотической нестабильности ДНК нейронов, как платы за их электрическую активность и высокую пластичность их генома, меняет теоретический ландшафт не только нейронауки, но и шире — биологии. Действительно, как предполагал А.М. Оловников, именно ДНК нейронов может быть счетчиком продолжительности жизни, сейчас накоплено уже много данных, существенно повысивших вероятность этой гипотезы. Кроме того, нестабильность ДНК нейронов, очевидно, сопровождалась поиском разных способов снижения биологической платы за работу мозга в эволюции Metazoa, став своеобразным драйвером этой эволюции. Такие явления, как сон, увеличение числа нейронов в эволюции позвоночных, взрослый нейрогенез, распределенная активность нейронов, соматическая полиплоидия, редактирование РНК, приобретают новый смысл и новое понимание при рассмотрении их в свете решения компромисса «пластичность—нестабильность нейрональной ДНК». Тема имеет очевидное значение не только для фундаментальной нейронауки, но и для трансляционной медицины. Коротко изложенный материал



Основные факторы риска для стабильности ДНК в нейронах, выявленные виды повреждений ДНК и возможные эволюционные адаптации, снижающие биологическую плату за нестабильность нейрональной ДНК. Факторами риска являются высокий энергетический метаболизм нейронов, образование активных форм кислорода (АФК), нейрональное возбуждение, активация глутаматом рецепторов NMDA-типа. Активация NMDA рецепторов ведет к образованию двухцепочечных разрывов ДНК в областях промоторов генов раннего ответа, вызывая их экспрессию и последующую репарацию ДНК. Механизм этого влияния включает повышение концентрации внутриклеточного кальция, активацию кальцийнейрина, фосфорилирующего Торо IIβ. Кроме того, к факторам риска можно отнести изменения состояния хроматина, его деконденсацию, которая повышает уязвимость ДНК к различным мутагенам, в том числе мобильным генетическим элементам (MGEs). Деконденсация хроматина может осуществляться также через глутаматные рецепторы путем активации гетерохроматина Gadd45. Все перечисленное относится к факторам, необходимым для нормального функционирования ЦНС, которые обеспечивают ее пластичность и когнитивные функции. В настоящее время активно исследуется накопление следующих видов повреждений нейрональной ДНК (двух- и одноцепочечные разрывы, одиночные замены нуклеотидов (SNV), инсерции и делеции (индели)) (см. таблицу). Эти повреждения прямо или косвенно могут приводить к нейродегенеративным заболеваниям и, предположительно, определять продолжительность жизни. К числу возможных эволюционных адаптаций, позволяющих снизить плату за нестабильность ДНК в нейронах, можно отнести: репарацию ДНК, зависящую от электрической активности нейрона (NPAS4—NuA4), Ragrp1-зависимую репарацию двухцепочечных разрывов, накопленных во время дневной активности животного, и активирующую сон у позвоночных, нейрогенез и увеличение числа нейронов в ЦНС, соматическую полиплоидию, особенно выраженную у представителей Gastropoda, а также редактирование мРНК и перенос пластичности с ДНК на уровень РНК, выявленный у головоногих моллюсков

представлен на схеме (рисунок), иллюстрирующей основные факторы риска, виды повреждений нейрональной ДНК и возможные эволюционные адаптации, снижающие биологическую плату за нестабильность ДНК.

Конечно, остается еще много вопросов, требующих экспериментальной проверки и являющихся вызовом сегодняшнего дня для молекулярной нейробиологии. Особенно это касается нейробиологии беспозвоночных, объекты которой представляют уникальные экспериментальные возможности. Остается ряд нерешенных актуальных задач, требующий исследования.

(1) Проверка предположения о том, что возбуждение нейронов влияет не только на образование двухцепочечных разрывов, но и на накопление повреждений и мутаций ДНК нейронов. Это может быть сделано с помощью оптогенетических подходов у *C. elegans*, *D. melanogaster* или с помощью электрофизио-

логических стимуляций у брюхоногих моллюсков с их гигантскими нейронами, удобными для идентификации, изоляции и микроэлектродной электрофизиологии. Секвенирование ДНК нейронов у указанных видов можно проводить либо на нейронах с существенными исходными различиями в их электрической активности, либо на одних и тех же нейронах при наличии и отсутствии электрической стимуляции.

(2) Поиск конкретных генетических и эпигенетических изменений, которые predisполагают животных с более высокими когнитивными способностями к более короткой жизни, снижению стрессоустойчивости и плодовитости. Начатые исследования [46–52] желательны продолжить на уровне ДНК нейронов и эпигенетической регуляции генома нейронов. В частности, можно выяснить: проявляют ли гены, связанные с возбуждением нейронов или открытым состоянием хроматина и ДНК,

более высокую экспрессию у «умных» беспозвоночных? Накапливают ли «умные» животные больше мутаций? Являются ли биологические издержки (неустойчивость к стрессу, низкая плодовитость и продолжительность жизни), наблюдаемые у «умных» животных, прямым следствием накопления мутаций?

(3) Поиск хрономер или другого нейронального внутриклеточного субстрата, отвечающего за регуляцию продолжительности жизни, также удобнее выполнить на беспозвоночных.

(4) Неожиданно оказалось, что в свете новых данных о влиянии нейрональной активности на повреждение ДНК нейронов мы не можем дать убедительного объяснения/обоснования пользы когнитивной нагрузки для здоровья мозга, которой придается сейчас столь большое значение. Можно только предполагать нечто сходное с гипоксическими или

ишемическими тренировками, прекондиционированием к когнитивной нагрузке. Но в чем конкретном будут заключаться механизмы этого когнитивного прекондиционирования, нам все еще предстоит узнать.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00318).

Благодарности. Выражаю благодарность А.И. Калмыковой, И.А. Оловникову и И.С. Захарову за советы и замечания при редактировании, а также Д.Д. Воронцову за помощь при подготовке рисунка.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа выполнена без привлечения животных и людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Olovnikov, A. M. (1971) Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **201**, 1496-1499.
- Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon, *J. Theor. Biol.*, **41**, 181-190, doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7.
- Оловников А. М. (2022) Планетарный метроном как регулятор продолжительности жизни и темпа старения: метрономная гипотеза, *Биохимия*, **87**, 2019-2022.
- Оловников А. М. (2003) Редусомная гипотеза старения и контроля биологического времени в индивидуальном развитии, *Биохимия*, **68**, 7-41.
- Dyakonova, V. E. (2020) Neuronal counter of the life span: does it exist? *Russ. J. Dev. Biol.*, **51**, 197-200, doi: 10.1134/S1062360420030066.
- Suberbielle, E., Sanchez, P. E., Kravitz, A. V., Wang, X., Ho, K., Eilertson, K., Devidze, N., Kreitzer, A. C., and Mucke, L. (2013) Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β , *Nat. Neurosci.*, **16**, 613-621, doi: 10.1038/nn.3356.
- Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A. R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T. X., Yamakawa, H., Pao, P. C., Stott, R. T., Gjoneska, E., Nott, A., Cho, S., Kellis, M., and Tsai, L. H. (2015) Activity-induced DNA breaks govern the expression of neuronal early-response genes, *Cell*, **161**, 1592-1605, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.032.
- Delint-Ramirez, I., Konada, L., Heady, L., Rueda, R., Jacome, A. S. V., Marlin, E., Marchioni, C., Segev, A., Kritskiy, O., Yamakawa, S., Reiter, A. H., Tsai, L. H., and Madabhushi, R. (2022) Calcineurin dephosphorylates topoisomerase II β and regulates the formation of neuronal-activity-induced DNA breaks, *Mol. Cell*, **82**, 3794-3809.e8, doi: 10.1016/j.molcel.2022.09.012.
- Shadfar, S., Parakh, S., Jamali, M. S., and Atkin, J. D. (2023) Redox dysregulation as a driver for DNA damage and its relationship to neurodegenerative diseases, *Transl. Neurodegener.*, **12**, 18, doi: 10.1186/s40035-023-00350-4.
- Wu, W., Hill, S. E., Nathan, W. J., Paiano, J., Callen, E., Wang, D., Shinoda, K., van Wietmarschen, N., Colón-Mercado, J. M., Zong, D., De Pace, R., Shih, H. Y., Coon, S., Parsadanian, M., Pavani, R., Hanzlikova, H., Park, S., Jung, S. K., McHugh, P. J., Canela, A., Chen, C., Casellas, R., Caldecott, K. W., Ward, M. E., and Nussenzweig, A. (2021) Neuronal enhancers are hotspots for DNA single-strand break repair, *Nature*, **593**, 440-444, doi: 10.1038/s41586-021-03468-5.
- Dileep, V., and Tsai, L. H. (2021) Neuronal enhancers get a break, *Neuron*, **109**, 1766-1768, doi: 10.1016/j.neuron.2021.05.008.
- Reid, D. A., Reed, P. J., Schlachetzki, J. C. M., Nitulescu, I. I., Chou, G., Tsui, E. C., Jones, J. R., Chandran, S., Lu, A. T., McClain, C. A., Ooi, J. H., Wang, T. W., Lana, A. J., Linker, S. B., Ricciardulli, A. S., Lau, S., Schafer, S. T., Horvath, S., Dixon, J. R., Hah, N., Glass, C. K., and Gage, F. H. (2021) Incorporation of a nucleoside analog maps genome repair sites in postmitotic human neurons, *Science*, **372**, 91-94, doi: 10.1126/science.abb9032.

13. Крушинский А. Л. (2013) Биофизические аспекты рассудочной деятельности, В кн.: «Формирование поведения животных в норме и патологии. к 100-летию со дня рождения Л. В. Крушинского (1911-1984)», Языки славянской культуры (под редакцией И.И. Полетаевой, З.А. Зориной), Москва, стр. 424-436.
14. Крушинский А. Л. (2015) Плата за решение задачи: биофизические предпосылки и возможные эволюционные последствия, *Российский журнал когнитивной науки*, **2**, 52-61.
15. Navabpour, S., Rogers, J., McFadden, T., and Jarome, T. J. (2020) DNA double-strand breaks are a critical regulator of fear memory reconsolidation, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8995, doi: 10.3390/ijms21238995.
16. Weber Boutros, S., Unni, V. K., and Raber, J. (2022) An adaptive role for DNA double-strand breaks in hippocampus-dependent learning and memory, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8352, doi: 10.3390/ijms23158352.
17. Konopka, A., and Atkin, J. D. (2022) The role of DNA damage in neural plasticity in physiology and neurodegeneration, *Front. Cell Neurosci.*, **16**, 836885, doi: 10.3389/fncel.2022.836885.
18. Welch, G., and Tsai, L. H. (2022) Mechanisms of DNA damage-mediated neurotoxicity in neurodegenerative disease, *EMBO Rep.*, **23**, e54217, doi: 10.15252/embr.20215421.
19. Pollina, E. A., Gilliam, D. T., Landau, A. T., Lin, C., Pajarillo, N., Davis, C. P., Harmin, D. A., Yap, E. L., Vogel, I. R., Griffith, E. C., Nagy, M. A., Ling, E., Duffy, E. E., Sabatini, B. L., Weitz, C. J., and Greenberg, M. E. (2023) A NPAS4–NuA4 complex couples synaptic activity to DNA repair, *Nature*, **614**, 732-741, doi: 10.1038/s41586-023-05711-7.
20. Hazen, J. L., Faust, G. G., Rodriguez, A. R., Ferguson, W. C., Shumilina, S., Clark, R. A., Boland, M. J., Martin, G., Chubukov, P., Tsunemoto, R. K., Torkamani, A., Kupriyanov, S., Hall, I. M., and Baldwin, K. K. (2016) The complete genome sequences, unique mutational spectra, and developmental potency of adult neurons revealed by cloning, *Neuron*, **89**, 1223-1236, doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.004.
21. Evrony, G. D., Cai, X., Lee, E., Hills, L. B., Elhosary, P. C., Lehmann, H. S., Parker, J. J., Atabay, K. D., Gilmore, E. C., Poduri, A., Park, P. J., and Walsh, C. A. (2012) Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain, *Cell*, **151**, 483-496, doi: 10.1016/j.cell.2012.09.035.
22. Bizzotto, S., and Walsh, C. A. (2022) Genetic mosaicism in the human brain: from lineage tracing to neuropsychiatric disorders, *Nat. Rev. Neurosci.*, **23**, 275-286, doi: 10.1038/s41583-022-00572-x.
23. Luquette, L. J., Miller, M. B., Zhou, Z., Bohrsen, C. L., Zhao, Y., Jin, H., Gulhan, D., Ganz, J., Bizzotto, S., Kirkham, S., Hochepped, T., Libert, C., Galor, A., Kim, J., Lodato, M. A., Garaycoechea, J. I., Gawad, C., West, J., Walsh, C. A., and Park, P. J. (2022) Single-cell genome sequencing of human neurons identifies somatic point mutation and indel enrichment in regulatory elements, *Nat. Genet.*, **54**, 1564-1571, doi: 10.1038/s41588-022-01180-2.
24. Lodato, M., Rodin, R. E., Bohrsen, C. L., Coulter, M. E., Barton, A. R., Kwon, M., Sherman, M. A., Vitzthum, C. M., Luquette, L. J., Yandava, C. N., Yang, P., Chittenden, T. W., Hatem, N. E., Ryu, S. C., Woodworth, M. B., Park, P. J., and Walsh, C. A. (2018) Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons, *Science*, **359**, 555-559, doi: 10.1126/science.aao4426.
25. Li, X., Cao, G., Liu, X., Tang, T. S., Guo, C., and Liu, H. (2022) Polymerases and DNA repair in neurons: implications in neuronal survival and neurodegenerative diseases, *Front. Cell. Neurosci.*, **16**, 852002, doi: 10.3389/fncel.2022.852002.
26. Scheijen, E. E. M., and Wilson, D. M. 3rd. (2022) Genome integrity and neurological disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4142, doi: 10.3390/ijms23084142.
27. Zullo, J. M., Drake, D., Aron, L., O'Hern, P., Dhamne, S. C., Davidsohn, N., Mao, C. A., Klein, W. H., Rotenberg, A., Bennett, D. A., Church, G. M., Colaiácovo, M. P., and Yankner, B. A. (2019) Regulation of lifespan by neural excitation and REST, *Nature*, **574**, 359-364, doi: 10.1038/s41586-019-1647-8.
28. Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., Yang, T. H., Kim, H. M., Drake, D., Liu, X. S., Bennett, D. A., Colaiácovo, M. P., and Yankner, B. A. (2014) REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease, *Nature*, **507**, 448-454, doi: 10.1038/nature13163.
29. Cruces, M. P., González, E., Pimentel, E., Jiménez, E., and Sánchez, P. (2022) Relationship between lifespan and somatic mutation in *D. melanogaster* after treatment with chlorophyllin, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **93**, 103891, doi: 10.1016/j.etap.2022.103891.
30. Cagan, A., Baez-Ortega, A., Brzozowska, N., Abascal, F., Coorens, T. H. H., Sanders, M. A., Lawson, A. R. J., Harvey, L. M. R., Bhosle, S., Jones, D., Alcantara, R. E., Butler, T. M., Hooks, Y., Roberts, K., Anderson, E., Lunn, S., Flach, E., Spiro, S., Januszczak, I., Wigglesworth, E., Jenkins, H., Dallas, T., Masters, N., Perkins, M. W., Deaville, R., Druce, M., Bogeska, R., Milsom, M. D., Neumann, B., Gorman, F., Constantino-Casas, F., Peachey, L., Bochynska, D., Smith, E. S. J., Gerstung, M., Campbell, P. J., Murchison, E. P., Stratton, M. R., and Martincorena, I. (2022) Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals, *Nature*, **604**, 517-524, doi: 10.1038/s41586-022-04618-z.
31. Shen, X., Song, S., Li, C., and Zhang, J. (2022) Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral, *Nature*, **606**, 725-731, doi: 10.1038/s41586-022-04823-w.

32. Zada, D., Bronshtein, I., Lerer-Goldshtein, T., Garini, Y., and Appelbaum, L. (2019) Sleep increases chromosome dynamics to enable reduction of accumulating DNA damage in single neurons, *Nat. Commun.*, **10**, 895, doi: 10.1038/s41467-019-08806-w.
33. Zada, D., Sela, Y., Matosevich, N., Monsonogo, A., Lerer-Goldshtein, T., Nir, Y., and Appelbaum, L. (2021) Parp1 promotes sleep, which enhances DNA repair in neurons, *Mol. Cell.*, **81**, 4979-4993.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2021.10.026.
34. Акифьев А. П., Потапенко А. И. (2001) Ядерный генетический материал как инициальный субстрат старения животных, *Генетика*, **37**, 1445-1458.
35. Ломброзо Ч. (1892) *Гениальность и помешательство*, Издание Ф. Павленкова, СПб.
36. Gale, C. R., Batty, G. D., McIntosh, A. M., Porteous, D. J., Deary, I. J., and Rasmussen, F. (2013) Is bipolar disorder more common in highly intelligent people? A cohort study of a million men, *Mol. Psychiatry*, **18**, 190-194, doi: 10.1038/mp.2012.26.
37. Smith, D. J., Anderson, J., Zammit, S., Meyer, T. D., Pell, J. P., and Mackay, D. (2015) Childhood IQ and risk of bipolar disorder in adulthood: prospective birth cohort study, *BJPsych. Open*, **1**, 74-80, doi: 10.1192/bjpo.bp.115.000455.
38. Deary, I. J. (2012) Looking for 'system integrity' in cognitive epidemiology, *Gerontology*, **58**, 545-553, doi: 10.1159/000341157.
39. Power, R. A., Steinberg, S., Bjornsdottir, G., Rietveld, C. A., Abdellaoui, A., Nivard, M. M., Johannesson, M., Galesloot, T. E., Hottenga, J. J., Willemsen, G., Cesarini, D., Benjamin, D. J., Magnusson, P. K., Ullén, F., Tiemeier, H., Hofman, A., van Rooij, F. J., Walters, G. B., Sigurdsson, E., Thorgeirsson, T. E., Ingason, A., Helgason, A., Kong, A., Kiemene, L. A., Koellinger, P., Boomsma, D. I., Gudbjartsson, D., Stefansson, H., and Stefansson, K. (2015) Polygenic risk scores for schizophrenia and bipolar disorder predict creativity, *Nature Neuroscience*, **18**, 953-955, doi: 10.1038/nn.4040.
40. Demange, P. A., Malanchini, M., Mallard, T. T., Biroli, P., Cox, S. R., Grotzinger, A. D., Tucker-Drob, E. M., Abdellaoui, A., Arseneault, L., van Bergen, E., Boomsma, D. I., Caspi, A., Corcoran, D. L., Domingue, B. W., Harris, K. M., Ip, H. F., Mitchell, C., Moffitt, T. E., Poulton, R., Prinz, J. A., Sugden, K., Wertz, J., Williams, B. S., de Zeeuw, E. L., Belsky, D. W., Harden, K. P., and Nivard, M. G. (2021) Investigating the genetic architecture of noncognitive skills using GWAS-by-subtraction, *Nat. Genet.*, **53**, 35-44, doi: 10.1038/s41588-020-00754-2.
41. Золотарева Н. Н., Крушинская Н. Л., Дмитриева И. Л. (1987) Сравнительная характеристика метаболизма самцов крыс линии Трайона (Tryon maze dull and Tryon maze bright) и возможность прогнозирования их социального статуса по биохимическим показателям, *Доклады АН СССР*, **292**, 751-755.
42. Семиохина А. Ф., Очинская Е. И., Рубцова Н. Б., Крушинский Л. В. (1976) Новое в изучении экспериментальных неврозов, вызванных перенапряжением высшей нервной деятельности, *Доклады АН СССР*, **231**, 503-505.
43. Хоничева Н. М., Гуляева Н. В., Жданова И. В., Обедин А. Б., Дмитриева И. Л., Крушинская Н. Л. (1986) Тип поведения и активность супероксиддисмутазы в головном мозге у крыс (сравнение 2-х линий крыс), *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **102**, 643-645.
44. Amit, Z., and Smith, B. R. (1992) Differential ethanol intake in Tryon maze-bright and Tryon maze-dull rats: implications for the validity of the animal model of selectively bred rats for high ethanol consumption, *Psychopharmacology*, **108**, 136-140, doi: 10.1007/BF02245298.
45. Дьяконова В. Е. (2015) Сколько стоят когнитивные способности? *Российский журнал когнитивной науки*, **2**, 70-77.
46. Mery, F., and Kawecki, T. J. (2002) Experimental evolution of learning ability in fruit flies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14274-14279, doi: 10.1073/pnas.222371199.
47. Mery, F., and Kawecki, T. J. (2003) A fitness cost of learning ability in *Drosophila melanogaster*, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **270**, 2465-2469, doi: 10.1098/rspb.2003.2548.
48. Mery, F., and Kawecki, T. J. (2005) A cost of long-term memory in *Drosophila*, *Science*, **308**, 1148-1148, doi: 10.1126/science.1111331.
49. Burger, J., Kolss, M., Pont, J., and Kawecki, T. J. (2008) Learning ability and longevity: A symmetrical evolutionary trade-off in *Drosophila*, *Evolution*, **62**, 1294-1304, doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00376.x.
50. Burns, J. G., Foucaud, J., and Mery, F. (2011) Costs of memory: lessons from 'mini' brains, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **278**, 923-929, doi: 10.1098/rsbl.2008.0514.
51. Dalesman, S., and Lukowiak, K. (2012) How stress alters memory in 'smart' snails, *PLoS One*, **7**, e32334, doi: 10.1371/journal.pone.0032334.
52. Hughes, E., Shymansky, T., Swinton, E., Lukowiak, K. S., Swinton, C., Sunada, H., Protheroe, A., Phillips, I., and Lukowiak, K. (2017) Strain-specific differences of the effects of stress on memory in *Lymnaea*, *J. Exp. Biol.*, **220**, 891-899, doi: 10.1242/jeb.149161.
53. Borodina, A. A., and Balaban, P. M. (2020) Epigenetic regulation as a basis for long-term changes in the nervous system: in search of specificity mechanisms, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 994-966, doi: 10.1134/S0006297920090023.
54. Borodina, A. A., Kuznetsova, M. A., Alekseeva, V. S., and Balaban, P. M. (2019) Histone acetylation determines transcription of atypical protein kinases in rat neurons, *Sci. Rep.*, **9**, 4332, doi: 10.1038/s41598-019-40823-z.

55. Shimaji, K., Tomida, S., Yamaguchi, M. (2019) Regulation of animal behavior by epigenetic regulators, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **24**, 1071-1084, doi: 10.2741/4769.
56. Zuzina, A. B., Vinarskaya, A. K., and Balaban, P. M. (2020) Histone deacetylase inhibitors rescue the impaired memory in terrestrial snails, *J. Comp. Physiol. A*, **206**, 639-649, doi: 10.1007/s00359-020-01422-w.
57. Levenson, J. M., and Sweatt, J. (2005) Epigenetic mechanisms in memory formation, *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 108-118, doi: 10.1038/nrn1604.
58. Reolon, G. K., Maurmann, N., Werenicz, A., Garcia, V. A., Schröder, N., Wood, M. A., and Roesler, R. (2011) Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats, *Behav. Brain Res.*, **221**, 329-332, doi: 10.1016/j.bbr.2011.03.033.
59. Benjamin, J. S., Pilarowski, G. O., Carosso, G. A., Zhang, L., Huso, D. L., Goff, L. A., Vernon, H. J., Hansen, K. D., and Bjornsson, H. T. (2017) A ketogenic diet rescues hippocampal memory defects in a mouse model of Kabuki syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 125-130, doi: 10.1073/pnas.1611431114.
60. Bjornsson, H. T., Benjamin, J. S., Zhang, L., Weissman, J., Gerber, E. E., Chen, Y. C., Vaurio, R. G., Potter, M. C., Hansen, K. D., and Dietz, H. C. (2014) Histone deacetylase inhibition rescues structural and functional brain deficits in a mouse model of Kabuki syndrome, *Sci. Transl. Med.*, **6**, 256ra135, doi: 10.1126/scitranslmed.3009278.
61. Sweatt, J. D. (2016) Neural plasticity and behavior – sixty years of conceptual advances, *J. Neurochem.*, **139** (Suppl 2), 179-199, doi: 10.1111/jnc.13580.
62. Espeso-Gil, S., Holik, A. Z., Bonnin, S., Jhanwar, S., Chandrasekaran, S., Pique-Regi, R., Albaigès-Ràfols, J., Maher, M., Permanyer, J., Irimia, M., Friedländer, M. R., Pons-Espinal, M., Akbarian, S., Dierssen, M., Maass, P. G., Hor, C. N., and Ossowski, S. (2021) Environmental enrichment induces epigenomic and genome organization changes relevant for cognition, *Front. Mol. Neurosci.*, **14**, 664912, doi: 10.3389/fnmol.2021.664912.
63. McGreevy, K. R., Tezanos, P., Ferreira-Villar, I., Pallé, A., Moreno-Serrano, M., Esteve-Codina, A., Lamas-Toranzo, I., Bermejo-Álvarez, P., Fernández-Punzano, J., Martín-Montalvo, A., Montalbán, R., Ferrón, S. R., Radford, E. J., Fontán-Lozano, Á., and Trejo, J. L. (2019) Intergenerational transmission of the positive effects of physical exercise on brain and cognition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 10103-10112, doi: 10.1073/pnas.1816781116.
64. Mezheritskiy, M. I., and Dyakonova, V. E. (2022) Direct and inherited epigenetic changes in the nervous system caused by intensive locomotion: possible adaptive significance, *Russ. J. Dev. Biol.*, **53**, 317-331, doi: 10.1134/S1062360422050058.
65. Yang, Y., Lagisz, M., Foo, Y. Z., Noble, D. W. A., Anwer, H., and Nakagawa, S. (2021) Beneficial intergenerational effects of exercise on brain and cognition: a multilevel meta-analysis of mean and variance, *Biol. Rev.*, **96**, 1504-1527, doi: 10.1111/brv.12712.
66. Grassi, D., Franz, H., Vezzali, R., Bovio, P., Heidrich, S., Dehghanian, F., Lagunas, N., Belzung, C., Kriegstein, K., and Vogel, T. (2017) Neuronal activity, tgfb β -signaling and unpredictable chronic stress modulate transcription of gadd45 family members and DNA methylation in the hippocampus, *Cereb. Cortex*, **27**, 4166-4181, doi: 10.1093/cercor/bhx095.
67. Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., Ball, M. P., Jang, M. H., Bonaguidi, M. A., Balazer, J. A., Eaves, H. L., Xie, B., Ford, E., Zhang, K., Ming, G. L., Gao, Y., and Song, H. (2011) Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain, *Nat. Neurosci.*, **14**, 1345-1351, doi: 10.1038/nn.2900.
68. Su, Y., Shin, J., Zhong, C., Wang, S., Roychowdhury, P., Lim, J., Kim, D., Ming, G. L., and Song, H. (2017) Neuronal activity modifies the chromatin accessibility landscape in the adult brain, *Nat. Neurosci.*, **20**, 476-483, doi: 10.1038/nn.4494.
69. Dumitrache, L. C., and McKinnon, P. J. (2022) Out of LINE: Transposons, genome integrity, and neurodegeneration. *Neuron*, **110**, 3217-3219, doi: 10.1016/j.neuron.2022.09.026.
70. Beagan, J. A., Pastuzyn, E. D., Fernandez, L. R., Guo, M. H., Feng, K., Titus, K. R., Chandrasekar, H., Shepherd, J. D., and Phillips-Cremens, J. E. (2020) Three-dimensional genome restructuring across timescales of activity-induced neuronal gene expression, *Nat. Neurosci.*, **23**, 707-717, doi: 10.1038/s41593-020-0634-6.
71. Belgrad, J., and Fields, R. D. (2018) Epigenome interactions with patterned neuronal activity, *Neuroscientist*, **24**, 471-485, doi: 10.1177/1073858418760744.
72. Bocharova, L. S., Borovyagin, V. L., Dyakonova, T. L., Warton, S. S., and Veprintsev, B. N. (1972) Ultrastructure and RNA synthesis in a molluscan giant neuron under electrical stimulation, *Brain Res.*, **36**, 371-84, doi: 10.1016/0006-8993(72)90741-x.
73. D'Yakonova, T. L., Veprintsev, B. N., Chapas, A. F., and Brodskii, V. Y. (1966) Induction of RNA synthesis in neurons by electrical activity, *Fed. Proc. Transl. Suppl.*, **25**, 901-904.
74. Lee, P. R., and Fields, R. D. (2021) Activity-dependent gene expression in neurons, *Neuroscientist*, **27**, 355-366, doi: 10.1177/1073858420943515.
75. Nandakumar, S., Grushko, O., and Buttitta, L. A. (2020) Polyploidy in the adult *Drosophila* brain, *Elife*, **9**, e54385, doi: 10.7554/eLife.54385.
76. Nandakumar, S., Rozich, E., and Buttitta, L. (2021) Cell cycle re-entry in the nervous system: from polyploidy to neurodegeneration, *Front. Cell. Dev.*, **9**, 698661, doi: 10.3389/fcell.2021.698661.

77. Боровягин В. Л., Сахаров Д. А. (1968) *Ультра-структура гигантских нейронов тритонии. Атлас*, Наука, Москва.
78. Сахаров Д. А. (1974) *Генеалогия нейронов*, Наука, Москва.
79. Кирсанова И. А., Анисимов А. П. (2000) Соматическая полиплоидия в нейронах брюхоногих моллюсков. I. Морфологическая характеристика ганглиев и нейронов ЦНС улитки янтарки, *Цитология*, **42**, 733–739.
80. Arendt, T., Brückner, M. K., Mosch, B., and Lösche, A. (2010) Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.*, **177**, 15–20, doi: 10.2353/ajpath.2010.090955.
81. Frade, J. M., and López-Sánchez, N. (2017) Neuronal tetraploidy in Alzheimer and aging, *Aging (Albany NY)*, **9**, 2014–2015, doi: 10.18632/aging.101312.
82. Keinath, A. T., Mosser, C. A., and Brandon, M. P. (2022) The representation of context in mouse hippocampus is preserved despite neural drift, *Nat. Commun.*, **13**, 2415, doi: 10.1038/s41467-022-30198-7.
83. Rule, M. E., and O'Leary, T. (2022) Self-healing codes: How stable neural populations can track continually reconfiguring neural representations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2106692119, doi: 10.1073/pnas.2106692119.
84. Марков А., Наймарк Е. (2022) Эволюция человека, В 3 кн. *Кости, гены и культура*, Издательство АСТ, CORPUS, Москва, 624 с.
85. Угрюмов М. В. (2010) Болезнь Паркинсона: новые представления о патогенезе, диагностике и лечении. В кн. *Болезни движений: медицинские и социальные аспекты* (под ред. У. И. Гусева и А. Б. Гехт), АПКППРО, Москва.
86. Epp, J. R., Silva, M. R., Köhler, S., Josselyn, S. A., and Frankland, P. W. (2016) Neurogenesis-mediated forgetting minimizes proactive interference, *Nat. Commun.*, **7**, 10838, doi: 10.1038/ncomms10838
87. Moroz, L. L., Nikitin, M. A., Poličar, P. G., Kohn, A. B., and Romanova, D. Y. (2021) Evolution of glutamatergic signaling and synapses, *Neuropharmacology*, **199**, 108740, doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108740.
88. Moroz, L. L. (2021) Multiple origins of neurons from secretory cells, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 669087, doi: 10.3389/fcell.2021.669087.
89. Moroz, L. L., Romanova, D. Y., and Kohn, A. B. (2021) Neural versus alternative integrative systems: molecular insights into origins of neurotransmitters, *Philos. Trans. R. Soc. B*, **376**, 20190762, doi: 10.1098/rstb.2019.0762.
90. Sultan, F. A., and Sweatt, J. D. (2013) The role of the gadd45 family in the nervous system: a focus on neurodevelopment, neuronal injury, and cognitive neuroepigenetics, in *Gadd45. Stress Sensor Genes* (Liebermann, D A., Hoffman, B., eds) Springer, pp. 81–121, doi: 10.1007/978-1-4614-8289-5_6.
91. Crowe, S. L., Movsesyan, V. A., Jorgensen, T. J., and Kondratyev, A. (2006) Rapid phosphorylation of histone H2A.X following ionotropic glutamate receptor activation, *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 2351–2361, doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04768.x.
92. Dyakonova, V. E. (2022) Origin and evolution of the nervous system: new data from comparative whole genome studies of multicellular animals, *Russ. J. Dev. Biol.*, **53**, 55–64, doi: 10.1134/S1062360422010088.
93. Liscovitch-Brauer, N., Alon, S., Porath, H. T., Elstein, B., Unger, R., Ziv, T., Admon, A., Levanon, E. Y., Rosenthal, J. J. C., and Eisenberg, E. (2017) Trade-off between transcriptome plasticity and genome evolution in cephalopods, *Cell*, **169**, 191–202.e11, doi: 10.1016/j.cell.2017.03.025.
94. Moldovan, M., Chervontseva, Z., Bazykin, G., and Gelfand, M. S. (2020) Adaptive evolution at mRNA editing sites in soft-bodied cephalopods, *PeerJ*, e10456, doi: 10.7717/peerj.10456.
95. Yablonovitch, A. L., Deng, P., Jacobson, D., and Li, J. B. (2017) The evolution and adaptation of RNA editing, *PLoS Genet.*, **13**, e1007064, doi: 10.1371/journal.pgen.1007064.
96. Garrett, S., and Rosenthal, J. J. C. (2012) RNA editing underlies temperature adaptation in K⁺ channels from polar octopuses, *Science*, **335**, 848–851, doi: 10.1126/science.1212795.

UNSTABLE DNA IN NEURONS: COUNTER OF THE LIFE SPAN AND A DRIVER OF EVOLUTION

Review

V. E. Dyakonova

*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; e-mail: dyakonova.varvara@gmail.com*

The data on postmitotic instability of neuronal DNA, which have been reported in the last decade, are changing the theoretical landscape not only of neuroscience, but more broadly, of biology. A. M. Olovnikov

suggested in 2003 that it is the DNA of neurons that can be the “initial substrate of aging”. The current data significantly increases the likelihood of this hypothesis. How does neuronal DNA accumulate damage, in what regions of the genome, what factors contribute to its accumulation, and how can they be associated with aging and the life span? These questions will be considered in the review. In addition, instability of the neuronal DNA had apparently been accompanied by a search for various ways to reduce the biological costs of brain function in Metazoan evolution. Phenomena such as sleep, an increase in the number of neurons in the vertebrate brain evolution, adult neurogenesis, distributed neuronal activity, somatic polyploidy, RNA editing in cephalopods can be reconsidered in the light of “DNA plasticity-instability trade-off” in neurons. The topic is of obvious importance not only for fundamental neuroscience, but also for translational medicine.

Keywords: nervous system, neuronal DNA, postmitotic mutagenesis, DNA repair, lifespan, epigenetics, evolution of the nervous system

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ГЕРОПРОТЕКТОРЫ – ИЗ ЛАБОРАТОРИИ В КЛИНИКУ

Обзор

© 2023 А.А. Москалев

*Научно-исследовательский институт биологии старения ННГУ им. Н.И. Лобачевского,
603950 Нижний Новгород, Россия; электронная почта: amoskalev@list.ru*

Поступила в редакцию 20.07.2023

После доработки 20.09.2023

Принята к публикации 20.09.2023

Геропротекторы – вещества, которые замедляют процесс старения и могут быть использованы в профилактике возраст-зависимых заболеваний. Геропротекторы могут улучшать функционирование различных систем организма и повышать их гомеостатические возможности. Нами была разработана система критериев геропротектора и предложена их классификация, основанная на механизмах действия на процессы старения. Необходимо, чтобы геропротекторы снижали смертность, улучшали биомаркеры старения человека, которые отражают доклинические стадии развития и риски возраст-зависимых заболеваний, имели минимум побочных эффектов и улучшали качество жизни. Кроме того, существуют подходы, основанные на комбинировании геропротекторов, нацеленных на разные мишени и механизмы старения, чтобы достичь наибольшей эффективности. В настоящее время проводятся многочисленные доклинические исследования для поиска новых молекулярных мишеней и разработки новых подходов к продлению здорового старения, однако количество клинических исследований невелико. Геропротекторы могут стать новым классом профилактических лекарств, так как предотвращают возникновение некоторых заболеваний или замедляют их развитие.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: геропротектор, старение, биомаркер, биологический возраст, критерии.

DOI: 10.31857/S0320972523110064, **EDN:** MLFOQD

ВВЕДЕНИЕ

Геропротекторы – вещества, воздействующие на механизмы старения и замедляющие его. Они могут служить целям профилактики и отсрочки возникновения возраст-зависимых заболеваний и продления активного периода жизни, стать частью современной профилактической и персонализированной медицины [1] и, прежде всего, нарождающейся медицины здорового долголетия [2].

Старение является одной из главных причин многих возрастных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, рак, диабет и нейродегенеративные заболевания. Изучение геропротекторов может пролить свет на основные биологические процессы, которые лежат в основе старения. Это может помочь нам понять, какие молекулярные и клеточные изменения происходят в организме по мере его старения, и какие механизмы можно модулировать для достижения геропротекторного эффекта. Исследование геропротекторов

может помочь нам разработать стратегии для предотвращения или замедления возникновения этих заболеваний. Это имеет огромное значение для улучшения качества жизни людей и снижения бремени на здравоохранение. Однако необходимо отметить, что изучение геропротекторов является сложной задачей. Существуют различные факторы, которые могут влиять на результаты исследований, такие как различия в условиях проведения экспериментов, в генотипах и видах модельных организмов, проблемы короткоживущего контроля и невоспроизводимости данных. Это означает, что необходимо проводить дальнейшие исследования и разработки, чтобы установить эффективность и безопасность потенциальных геропротекторов для человека.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ГЕРОПРОТЕКТОРЫ

Нами была разработана система критериев геропротектора для того, чтобы наиболее

полным образом описывать желаемые свойства и признаки геропротектора и способствовать его внедрению в клиническую практику для профилактики старения. Мы выделили основные (обеспечивающие полезность и безопасность) и дополнительные (ускоряющие трансляцию в практику) критерии [3].

Основные критерии геропротектора. *Геропротектор должен продлевать жизнь.* О том, является ли вещество геропротектором или нет, судят по его способности увеличивать продолжительность жизни модельного организма в условиях эксперимента или уменьшать общую смертность у человека. Наша открытая онлайн база данных (geroprotectors.org), полученных из 2408 литературных источников, включает 259 соединений, которые продлевают жизнь по крайней мере в одной концентрации у одного из 13 модельных организмов от дрожжей до человека [4]. Недавно с нашим участием была создана база данных проекта DrugAge, в которой содержится более 1000 соединений, изученных на их влияние на продолжительность жизни [5].

Геропротектор должен обращать вспять процессы, связанные с возрастными заболеваниями. Клиническое исследование или применение геропротектора в современной медицинской практике невозможно без показаний, связанных с какими-либо сформировавшимися у индивида заболеваниями. Поэтому геропротектор должен помогать при определенных ассоциированных со старением заболеваниях, чтобы иметь шанс войти в практику. Тем не менее геропротекторы можно потенциально отнести к новому классу лекарств — профилактических, поскольку они не только лечат симптомы определенных болезней, а создают предпосылки для того, чтобы некоторые заболевания вовсе не возникали либо развивались медленнее и приходили как можно позже. Геронтолог Владимир Дильман называл старение самой универсальной болезнью [6]. По мнению Михаила Благодосклонного, возраст-зависимые заболевания (сахарный диабет 2-го типа, болезнь Альцгеймера, сердечно-сосудистые заболевания) являются симптомами старения, как дым — признаком огня [7]. Поэтому об эффективности геропротектора можно говорить, если он способен отсрочивать возникновение сразу нескольких возраст-зависимых заболеваний у человека (предотвращать мультиморбидность) и продлевать продолжительность здоровой жизни (возраст до наступления первого хронического заболевания).

Геропротектор должен положительно влиять на биомаркеры старения человека. Биомар-

керы старения — это молекулярные, клеточные, физиологические и психологические параметры организма, которые воспроизводимо количественно или качественно изменяются при старении [8]. Кандидат в геропротекторы должен переводить их в состояние, характерное для более молодого возраста. Критерий геропротектора, связанный с биомаркерами старения, приобретает особую важность в связи с трансляцией результатов в медицинскую практику. Исследования продолжительности жизни человека под действием кандидата в геропротекторы крайне длительные и затратные. Поэтому анализ продолжительности жизни можно проводить на животных, а эффекты на старение человека анализировать по широкому спектру изменений биомаркеров на фоне геропротекторной терапии. В настоящее время все чаще предпринимаются попытки использовать методы оценки биологического возраста в качестве комплексного биомаркера старения человека в рандомизированных плацебо-контролируемых клинических исследованиях. Например, показано изменение толщины комплекса интима—медиа (КИМ) сонной артерии и жесткости артериальной стенки после курса приема препарата комплекса терпенов [9].

Геропротектор не может иметь выраженных побочных эффектов и должен улучшать качество жизни. Поскольку некоторые геропротекторы могут оказывать профилактическое действие лишь при достаточно высоких концентрациях, необходимо, чтобы токсичная и эффективная с точки зрения замедления старения концентрации максимально различались. Некоторые вещества, в определенных дозах продлевающие жизнь модельных животных, имеют побочные эффекты у человека. Достижение геропротекторного эффекта предполагает длительный прием препарата в течение многих лет. Используя данные препараты, придется идти на компромисс между ожидаемыми и побочными эффектами. Поэтому желательно, чтобы количество и выраженность побочных эффектов у кандидатов в геропротекторы была минимальной. Эффективность замедления старения под действием геропротекторов, вероятнее всего, станет заметна лишь через много лет их систематического применения. Поэтому важно, чтобы они улучшали качество жизни человека с самого начала их использования — способствовали устранению проблем с пищеварением, благоприятно влияли на сон, противодействовали развитию депрессии или ухудшению памяти.

Мы применили критерии геропротектора к широкому спектру потенциальных геропротек-

текторов. Критериям геропротектора соответствуют некоторые соединения среди природных терпеноидов [10] и веществ, оказывающих протективное действие на геном [11].

Профессор В.Н. Анисимов классифицировал вещества, которые могут продлить жизнь, на три группы [12]. Первая группа — это геропротекторы, которые одинаково полезны для всех представителей популяции, т.к. могут задержать начало процесса старения. Вторая группа — геропротекторы, которые снижают смертность людей, доживающих до старческого возраста. Они позволяют повысить максимальную продолжительность жизни, замедляя процесс старения популяции. Третья группа — это геропротекторы, которые увеличивают шансы выживания людей, живущих не очень долго, без изменения максимальной продолжительности жизни популяции. Это значит, что они ускоряют процесс старения, но при этом повышают вероятность дожить до старческого возраста.

Старение можно определить как постепенное сокращение возможностей систем организма поддерживать постоянство внутренней среды, ведущее к началу ассоциированных со старением заболеваний и смерти. Поэтому главной стратегией по противодействию старению и износу организма может стать поддержание гомеостатических возможностей на всех уровнях организации живой системы.

Классификация геропротекторов по способности обеспечивать гомеостаз организма [13].
Корректировка последствий нарушения гомеостаза. С возрастом нарушение гомеостаза проявляется в отклонении от здорового уровня таких жизненно важных параметров, как кислотно-щелочной баланс крови, артериальное давление, уровень глюкозы и холестерина в крови. Поэтому препараты, предотвращающие развитие подобных ассоциированных со старением состояний, могут рассматриваться как геропротекторы. К геропротекторам, корректирующим последствия нарушения гомеостаза, можно отнести противодиабетические, антиаритмические, гиполипидемические, сосудистые, антигипертензивные препараты. Действительно, такие препараты, как антидиабетические бигуанидины (метформин) и ингибиторы SGLT2l, способны снижать сердечно-сосудистую смертность, выходя за пределы очерченных для них показаний вторичной профилактики [14, 15]. Прием бисфосфонатов (ингибиторы резорбции кости) также снижает общую смертность пациентов [16]. Выявлено стабильное снижение смертности на фоне приема статинов в возрасте 65 лет и старше [17].

Повышение возможности гомеостатических систем организма. На клеточном уровне ключевую гомеостатирующую роль играют белки стресс-ответа. Недостаток нутриентов, гипоксия, повреждение ДНК, нарушение протеостаза воспринимаются клеткой как стрессы. Активация систем стрессоустойчивости может не только нивелировать повреждения, но и перевести систему на более высокий уровень защиты от новых спонтанных ошибок и повреждений [18]. Индукция механизмов стрессоустойчивости может осуществляться факторами, вызывающими умеренный стресс, не сопровождающийся значительными повреждениями, но способный активизировать защиту. Данное явление получило название «гормезис» [19], а вещества, его вызывающие, были названы горметинами [20].

Нейтрализация агентов во внешней и внутренней среде, вызывающих нарушение гомеостаза. Это широкий круг соединений, например хелаторы переходных металлов Cu и Fe, участвующих в реакциях Фентона, Габера—Вейса и Майяра; перехватчики активных форм кислорода; вещества, разрывающие перекрестные сшивки; препараты, препятствующие агрегации белков (антиамилоидные вещества).

Подавление избыточных гомеостатических реакций, ведущих к еще большей потере гомеостаза. Гиперфункция некоторых гомеостатических реакций в ответ на стресс может иметь даже большее повреждающее действие, чем исходное повреждение. Согласно гипотезе герооконверсии М.В. Благосклонного, после остановки клеточного цикла стареющие клетки продолжают свой рост. «Герооконверсия» приводит к гиперсекреции, гипертрофии и провоспалительному клеточному фенотипу, который зависит от активности фермента киназы mTOR [21]. К подобного рода избыточным гомеостатическим реакциям можно отнести и инфламмейджинг, постулированный Franceschi [22]. К ингибиторам гиперфункции также стоит отнести препараты, нацеленные на специфичные мишени, гиперактивированные при старении — mTORC1, NF- κ B, PARP1, iNOX, COX2, p38, S6K, TGF- β , AT1, IGFR, HIF-1.

В настоящее время количество исследованных мишеней для потенциальных геропротекторов довольно ограничено, а их эффективность в продлении жизни оставляет желать лучшего. Один из возможных подходов для увеличения перечня эффективных мишеней — таргетирование широкого спектра молекулярных, клеточных и системных процессов, ассоциированных со старением и возраст-

Таблица 1. Механизмы действия потенциальных геропротекторов [23]

Механизм	Группа геропротекторов	Примеры
Предотвращение свободнорадикального окисления	поглотители свободных радикалов или антиоксиданты; хелаторы переходных металлов; жирные кислоты, устойчивые к перекисному окислению липидов	витамин С, А, Е, дейтерированные полиненасыщенные жирные кислоты
Поддержание митохондриальной функции	митогорметины и ингибиторы митохондриальной электрон-транспортной цепи; индукторы митофагии; активаторы PPAR γ /PGC-1 α и митопротекции; предшественники NAD ⁺	уролитин А, NMN, NR, NA
Поддержание протеостаза	агенты, препятствующие гликированию, и ингибиторы перекрестных сшивок конечных продуктов гликирования (КПГ); антагонисты рецепторов КПГ RAGE; антиамилоидные соединения; стимуляторы обмена внеклеточного матрикса; индукторы аутофагии; активаторы протеасом; частичные ингибиторы трансляции	спермидин
Сенолитики/сеностатики	вещества, способствующие избирательной элиминации сенесцентных клеток или замедляющие их появление	кверцетин + дазатиниб
Горметины	вещества, вызывающие умеренные повреждения и стимулирующие активизацию защитных механизмов стрессоустойчивости	сульфорафан, куркумин
Супрессоры нестабильности генома	антимутагенные соединения; стабилизаторы теломер; ингибиторы ретротранспозиций	ингибиторы обратной транскриптазы
Эпигенетические регуляторы	ингибиторы HDACs, HATs; активаторы SIRT6	бутират, бета-гидроксibuтират, ресвератрол
Ингибиторы связанных со старением сигнальных путей	ингибиторы mTORC1; ингибиторы PI3K; ингибиторы Ras; ингибиторы Мус; ингибиторы AT1; активаторы AMPK; активаторы Клото	рапамицин, торин 2, вортманнин, LY294002
Противовоспалительные препараты	ингибиторы NF- κ B; активаторы NRF2	ибупрофен, аспирин
Оптимизаторы микробиоты кишечника	пребиотики, метабиотики и энтеросорбенты	пищевые волокна, лигнаны
Антифибротические агенты	ингибиторы сигнальных путей, связанных с фиброзом	ингибиторы TGF- β →ALK5→p-Smad 2,3
Нейротрофические факторы	играют роль в развитии и сохранении структур как центральной, так и периферической нервной системы	миметики BDNF
Факторы, препятствующие нарушению барьерной функции	ингибиторы матричных металлопротеиназ, активаторы синтеза белков плотных контактов	ингибиторы MMP9
Иммуномодуляторы	факторы, способствующие регенерации тимуса и сохранения пула наивных Т-клеток	регуляторы JAK→STAT пути

зависимыми заболеваниями (табл. 1). Однако необходимо отметить, что одно и то же соединение может оказывать свое действие по нескольким путям, и каждый геропротектор не ограничивается одним подклассом.

Для увеличения количества потенциальных эффективных мишеней геропротекции было предложено использовать компьютерные алгоритмы поиска, опирающиеся на сравнение транскриптомных сигнатур старых и молодых клеток [24]. Реализация подобного подхода позволила установить потенциальные геропротекторные свойства у некоторых одобренных FDA лекарств, например пиоглитазона (агониста PPAR γ) [25]. С помощью специальной компьютерной программы, использующей искусственный интеллект, PandaOmics, удалось найти новые цели для создания лекарств, которые могут иметь полезные свойства для борьбы со старением и связанными с ним 14 заболеваниями. В частности, были обнаружены несколько генов-мишеней, которые играют важную роль в процессах воспаления и жесткости внеклеточного матрикса в тканях организма. К таким генам относятся *CASP3*, *VEGFA* и *MMP9* [26].

Еще одним способом повысить эффективность геропротекции является комбинирование в одной интервенции нескольких мишеней, связанных со старением. Сочетание рапамицина и вортманнина увеличило продолжительность жизни дрозодилы до 23,4% [27]. Препараты, влияющие на пути TGF- β и IGF-1, синергетически продлевают жизнь *Caenorhabditis elegans* до 2 раз [28]. Одновременное ингибирование TGF- β и лечение окситоцином усиливают нейрогенез, снижают нейровоспаление, улучшают когнитивные функции, омолаживают печень и мышцы и уменьшают количество p16-экспрессирую-

щих стареющих клеток у старых мышей [29]. Одногодичное лечение пациентов с помощью рекомбинантного гормона роста человека с дегидроэпиандростероном (DHEA) и с метформином меняет средний эпигенетический возраст приблизительно на 1,5 года [30].

Необходимо также рассмотреть проблемы, связанные с применением геропротекторов [31]. Большинство изученных на моделях геропротекторов увеличивают продолжительность жизни незначительно или только у одного пола животных. Старение не признано в качестве заболевания или патологического состояния, что обуславливает небольшое количество клинических испытаний геропротекторных свойств фармпрепаратов, фактически ограничивая их изучением природных соединений в составе биологически активных добавок. Отсутствие общепринятого набора биомаркеров старения человека также затрудняет клинические исследования потенциальных геропротекторов.

Имеющиеся клинические данные довольно ограничены и свидетельствуют лишь о пользе потенциальных геропротекторов в отношении суррогатных биомаркеров здоровья и в основном у пациентов с возраст-зависимыми заболеваниями, а не у здоровых людей (табл. 2).

Поскольку целью применения геропротектора является увеличение здорового периода жизни, в перспективе лечение следует начинать до того, как появятся какие-либо хронические заболевания, тем самым отсрочив начало первого хронического заболевания, связанного с возрастом. В настоящее время мы можем говорить лишь о геросупрессорах, так как они помогают предотвратить или замедлить некоторые проявления старения, но не знаем клинически доказанных примеров, как обратить его вспять.

Таблица 2. Клинические исследования потенциальных геропротекторов

Группа	Показание	Ссылка
Ингибитор mTOR, RTB101	иммунитет к вирусным инфекциям у пожилых людей	[32]
Модулятор AMPK, метформин	сердечно-сосудистые заболевания	[33]
Активатор Nrf2-пути, сульфорафан	облегчение симптомов легкой и умеренной депрессии у пациентов с кардиохирургическими вмешательствами в анамнезе	[34]
Восстановление NAD ⁺	добавка предшественников NAD ⁺ : никотинамид, никотинамид рибозид, никотинамид мононуклеотид оказывают положительный эффект на биомаркеры липидного профиля у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и дислипидемией	[35]
Сенолитики	дазатиниб + кверцетин снижают уровень воспаления в жировой ткани и улучшают системную метаболическую функцию в пожилом возрасте	[36]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на множество известных механизмов профилактики старения, многие классы геропротекторов мало изучены даже на доклиническом уровне. Сделать какие-либо далеко идущие выводы сложно, поскольку недостаточно данных для выполнения необходимых критериев для геропротекторов. Побочные эффекты могут быть более значительными, чем потенциальная выгода в долгосрочной перспективе. Некоторые потенциальные геропротекторы дали многообещающие результаты в исследованиях на лабораторных моделях, но их эффективность должна быть подтверждена в плацебо-контролируемых, слепых, многоцентровых клинических исследованиях с использованием биомаркеров старения человека и данных о смертности.

Целью применения геропротектора является увеличение продолжительности здоровой жизни, и лечение следует начинать до появления хронических заболеваний, чтобы отложить возникновение первого возрастного хронического заболевания. Однако получение разрешения на такое исследование без показаний является сложным, особенно из-за серьезных побочных эффектов некоторых препаратов с доклинически доказанной геропротекторной активностью, например, таких

как ЭДТА и рапамицин. Более перспективно, на наш взгляд, исследовать клинически биологически активные добавки, используя в качестве конечных точек биомаркеры старения и методы оценки биологического возраста.

В настоящее время мы можем говорить не о геропротекторах, а о геросупрессорах, так как мы можем замедлить, но не предотвратить некоторые проявления старения. Однако в будущем возможно появление новых методов борьбы со старением, и мы надеемся на развитие медицины здорового долголетия в нашей стране, подобно недавно созданным клиническим центрам в Сингапуре, Гонконге, Израиле и США.

Благодарности. Автор благодарит сотрудников и коллег, принимавших участие в совместных исследованиях геропротекторов, процитированных в настоящем обзоре литературы.

Финансирование. Исследование профинансировано из средств программы «Приоритет 2030» ННГУ «Здоровое поколение».

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фоменко А. Н., Прошкина Е. Н., Фединцев А. Ю., Цветков В. О., Шапошников М. В., Москалев А. А. (2016) *Потенциальные геропротекторы*, Европейский дом, Санкт-Петербург.
2. Bischof, E., Scheibye-Knudsen, M., Siow, R., and Moskalev, A. (2021) Longevity medicine: upskilling the physicians of tomorrow, *Lancet Healthy Longev.*, **2**, e187-e188, doi: 10.1016/S2666-7568(21)00024-6.
3. Moskalev, A., Chernyagina, E., Tsvetkov, V., Fedintsev, A., Shaposhnikov, M., Krut'ko, V., Zhavoronkov, A., and Kennedy, B. K. (2016) Developing criteria for evaluation of geroprotectors as a key stage toward translation to the clinic, *Aging Cell*, **15**, 407-415, doi: 10.1111/accel.12463.
4. Moskalev, A., Chernyagina, E., de Magalhaes, J. P., Barardo, D., Thoppil, H., Shaposhnikov, M., Budovsky, A., Fraifeld, V. E., Garazha, A., Tsvetkov, V., Bronovitsky, E., Bogomolov, V., Scerbacov, A., Kuryan, O., Gurinovich, R., Jellen, L. C., Kennedy, B., Mamoshina, P., Dobrovolskaya, E., Aliper, A., et al. (2015) Geroprotectors.org: a new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease, *Aging (Albany NY)*, **7**, 616-628, doi: 10.18632/aging.100799.
5. Barardo, D., Thornton, D., Thoppil, H., Walsh, M., Sharifi, S., Ferreira, S., Anzic, A., Fernandes, M., Monteiro, P., Grum, T., Cordeiro, R., De-Souza, E. A., Budovsky, A., Araujo, N., Gruber, J., Petrascheck, M., Fraifeld, V. E., Zhavoronkov, A., Moskalev, A., and de Magalhaes, J. P. (2017) The DrugAge database of aging-related drugs, *Aging Cell*, **16**, 594-597, doi: 10.1111/accel.12585.
6. Дильман В. М. (1986) *Большие биологические часы. Введение в интегральную медицину*, Знание, Москва.
7. Blagosklonny, M. V. (2009) TOR-driven aging: speeding car without brakes, *Cell Cycle*, **8**, 4055-4059, doi: 10.4161/cc.8.24.10310.
8. Moskalev, A. (2020) The challenges of estimating biological age, *Elife*, **9**, e54969, doi: 10.7554/eLife.54969.
9. Maganova, F., Voevoda, M., Popov, V., and Moskalev, A. (2023) A prospective randomized comparative placebo-controlled double-blind study in two groups to assess the effect of the use of biologically

- active additives with Siberian fir terpenes for the biological age of a person, *Front. Pharmacol.*, **14**, 1150504, doi: 10.3389/fphar.2023.1150504.
10. Proshkina, E., Plyusnin, S., Babak, T., Lashmanova, E., Maganova, F., Koval, L., Platonova, E., Shaposhnikov, M., and Moskalev, A. (2020) Terpenoids as potential geroprotectors, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 529, doi: 10.3390/antiox9060529.
 11. Proshkina, E., Shaposhnikov, M., and Moskalev, A. (2020) Genome-protecting compounds as potential geroprotectors, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4484, doi: 10.3390/ijms21124484.
 12. Anisimov, V. N. (2001) Life span extension and cancer risk: myths and reality, *Exp. Gerontol.*, **36**, 1101-1136, doi: 10.1016/s0531-5565(01)00114-0.
 13. Moskalev, A., Chernyagina, E., Kudryavtseva, A., and Shaposhnikov, M. (2017) Geroprotectors: a unified concept and screening approaches, *Aging Dis.*, **8**, 354-363, doi: 10.14336/AD.2016.1022.
 14. Araldi, E., Jutzeler, C. R., and Ristow, M. (2023) Effects of antidiabetic drugs on mortality risks in individuals with type 2 diabetes: A prospective cohort study of UK Biobank participants, *medRxiv*, doi: 10.1101/2023.05.19.23290214.
 15. Roussel, R., Travert, F., Pasquet, B., Wilson, P. W., Smith, S. C., Jr., Goto, S., Ravaud, P., Marre, M., Porath, A., Bhatt, D. L., Steg, P. G., and Reduction of Atherothrombosis for Continued Health Registry, I. (2010) Metformin use and mortality among patients with diabetes and atherothrombosis, *Arch. Intern. Med.*, **170**, 1892-1899, doi: 10.1001/archinternmed.2010.409.
 16. Bergman, J., Nordstrom, A., Hommel, A., Kivipelto, M., and Nordstrom, P. (2019) Bisphosphonates and mortality: confounding in observational studies? *Osteoporos. Int.*, **30**, 1973-1982, doi: 10.1007/s00198-019-05097-1.
 17. Gitsels, L. A., Bakbergenuly, I., Steel, N., and Kulinskaya, E. (2021) Do statins reduce mortality in older people? Findings from a longitudinal study using primary care records, *Fam. Med. Community Health*, **9**, e000780, doi: 10.1136/fmch-2020-000780.
 18. Moskalev, A. A., Aliper, A. M., Smit-McBride, Z., Buzdin, A., and Zhavoronkov, A. (2014) Genetics and epigenetics of aging and longevity, *Cell Cycle*, **13**, 1063-1077, doi: 10.4161/cc.28433.
 19. Calabrese, E. J. (2013) Hormesis: toxicological foundations and role in aging research, *Exp. Gerontol.*, **48**, 99-102, doi: 10.1016/j.exger.2012.02.004.
 20. Rattan, S. I. (2012) Rationale and methods of discovering hormetins as drugs for healthy ageing, *Expert Opin. Drug Discov.*, **7**, 439-448, doi: 10.1517/17460441.2012.677430.
 21. Blagosklonny, M. V. (2014) Geroconversion: irreversible step to cellular senescence, *Cell Cycle*, **13**, 3628-3635, doi: 10.4161/15384101.2014.985507.
 22. Franceschi, C. (2007) Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr. Rev.*, **65**, S173-S176, doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00358.x.
 23. Moskalev, A., Guvatova, Z., Lopes, I. A., Beckett, C. W., Kennedy, B. K., De Magalhaes, J. P., and Makarov, A. A. (2022) Targeting aging mechanisms: pharmacological perspectives, *Trends Endocrinol. Metab.*, **33**, 266-280, doi: 10.1016/j.tem.2022.01.007.
 24. Zhavoronkov, A., Buzdin, A. A., Garazha, A. V., Borisov, N. M., and Moskalev, A. A. (2014) Signaling pathway cloud regulation for in silico screening and ranking of the potential geroprotective drugs, *Front. Genet.*, **5**, 49, doi: 10.3389/fgene.2014.00049.
 25. Yang, J., Peng, S., Zhang, B., Houten, S., Schadt, E., Zhu, J., Suh, Y., and Tu, Z. (2020) Human geroprotector discovery by targeting the converging subnetworks of aging and age-related diseases, *Geroscience*, **42**, 353-372, doi: 10.1007/s11357-019-00106-x.
 26. Pun, F. W., Leung, G. H. D., Leung, H. W., Liu, B. H. M., Long, X., Ozerov, I. V., Wang, J., Ren, F., Aliper, A., Izumchenko, E., Moskalev, A., de Magalhaes, J. P., and Zhavoronkov, A. (2022) Hallmarks of aging-based dual-purpose disease and age-associated targets predicted using PandaOmics AI-powered discovery engine, *Aging (Albany NY)*, **14**, 2475-2506, doi: 10.18632/aging.203960.
 27. Danilov, A., Shaposhnikov, M., Plyusnina, E., Kogan, V., Fedichev, P., and Moskalev, A. (2013) Selective anticancer agents suppress aging in *Drosophila*, *Oncotarget*, **4**, 1507-1526, doi: 10.18632/oncotarget.1272.
 28. Admasu, T. D., Chaithanya Batchu, K., Barardo, D., Ng, L. F., Lam, V. Y. M., Xiao, L., Cazenave-Gassiot, A., Wenk, M. R., Tolwinski, N. S., and Gruber, J. (2018) Drug synergy slows aging and improves healthspan through IGF and SREBP lipid signaling, *Dev. Cell*, **47**, 67-79.e65, doi: 10.1016/j.devcel.2018.09.001.
 29. Mehdi-pour, M., Etienne, J., Chen, C. C., Gathwala, R., Rehman, M., Kato, C., Liu, C., Liu, Y., Zuo, Y., Conboy, M. J., and Conboy, I. M. (2019) Rejuvenation of brain, liver and muscle by simultaneous pharmacological modulation of two signaling determinants, that change in opposite directions with age, *Aging (Albany NY)*, **11**, 5628-5645, doi: 10.18632/aging.102148.
 30. Fahy, G. M., Brooke, R. T., Watson, J. P., Good, Z., Vasana-wala, S. S., Maecker, H., Leipold, M. D., Lin, D. T. S., Kobor, M. S., and Horvath, S. (2019) Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans, *Aging Cell*, **18**, e13028, doi: 10.1111/accel.13028.
 31. Moskalev, A. (2020) Is anti-ageing drug discovery becoming a reality, *Expert Opin. Drug Discov.*, **15**, 135-138, doi: 10.1080/17460441.2020.1702965.
 32. Mannick, J. B., Teo, G., Bernardo, P., Quinn, D., Russell, K., Klickstein, L., Marshall, W., and Shergill, S. (2021) Targeting the biology of ageing with mTOR inhibitors to improve immune function in older

- adults: phase 2b and phase 3 randomised trials, *Lancet Healthy Longev.*, **2**, e250-e262, doi: 10.1016/S2666-7568(21)00062-3.
33. Dihoum, A., Rena, G., Pearson, E. R., Lang, C. C., and Mordi, I. R. (2023) Metformin: evidence from preclinical and clinical studies for potential novel applications in cardiovascular disease, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **32**, 291-299, doi: 10.1080/13543784.2023.2196010.
 34. Ghazizadeh-Hashemi, F., Bagheri, S., Ashraf-Ganjouei, A., Moradi, K., Shahmansouri, N., Mehroooya, M., Noorbala, A. A., and Akhondzadeh, S. (2021) Efficacy and safety of sulforaphane for treatment of mild to moderate depression in patients with history of cardiac interventions: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *Psychiatry Clin. Neurosci.*, **75**, 250-255, doi: 10.1111/pcn.13276.
 35. Zhong, O., Wang, J., Tan, Y., Lei, X., and Tang, Z. (2022) Effects of NAD⁺ precursor supplementation on glucose and lipid metabolism in humans: a meta-analysis, *Nutr. Metab. (Lond)*, **19**, 20, doi: 10.1186/s12986-022-00653-9.
 36. Islam, M. T., Tuday, E., Allen, S., Kim, J., Trott, D. W., Holland, W. L., Donato, A. J., and Lesniewski, L. A. (2023) Senolytic drugs, dasatinib and quercetin, attenuate adipose tissue inflammation, and ameliorate metabolic function in old age, *Aging Cell*, **22**, e13767, doi: 10.1111/ace1.13767.

POTENTIAL GEROPROTECTORS – FROM THE BANCH TO THE CLINIC

Review

A. A Moskalev

*Institute of biogerontology of Lobachevsky University,
603950 Nizhny Novgorod, Russia; e-mail: amoskalev@list.ru*

Geroprotectors are substances that slow down the aging process and can be used in the prevention of age-related diseases. Geroprotectors can improve the functioning of various organ systems and enhance their homeostatic capabilities. We have developed a system of criteria for geroprotectors and proposed their classification based on the mechanisms of action on the aging processes. It is necessary for geroprotectors to reduce mortality, improve human aging biomarkers, have minimal side effects, and enhance quality of life. Additionally, there are approaches based on combining geroprotectors targeted at different targets and mechanisms of aging to achieve maximum effectiveness. Currently, numerous preclinical studies are being conducted to identify new molecular targets and develop new approaches to extend healthy aging, although the number of clinical trials is limited. Geroprotectors have the potential to become a new class of preventive medicines as they prevent the onset of certain diseases or slow down their progression.

Keywords: geroprotector, aging, biomarker, biological age, criteria

РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ И ТЕЛОМЕРЫ

Обзор

© 2023 А.И. Калмыкова*, О.А. Соколова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
119334 Москва, Россия; электронная почта: allakalm@idbras.ru

Поступила в редакцию 19.06.2023

После доработки 24.07.2023

Принята к публикации 12.08.2023

Мобильные элементы (МЭ) составляют десятки процентов генома эукариот, являясь основным источником нестабильности генома. Системы клеточной защиты подавляют экспансию МЭ на всех стадиях их жизненного цикла. Белки подсемейств Piwi и Piwi-взаимодействующие короткие РНК (piРНК) являются ключевыми элементами защитной системы, которая контролирует активность МЭ в гонадах многоклеточных животных, предотвращая наследуемые транспозиции и дефекты развития. В данном обзоре мы обсуждаем разнообразие регуляторных механизмов, с помощью которых короткие РНК подавляют активность МЭ. Тем не менее активные МЭ присутствуют в геномах, что свидетельствует об ограниченных возможностях этих механизмов защиты. Появляется всё больше данных, которые свидетельствуют о том, что повышенная активность МЭ совпадает в развитии с удлинением теломер и эпигенетическим перепрограммированием генома у разных видов. У плодовой мухи *Drosophila* теломеры состоят из ретротранспозонов, а защитный механизм с участием piРНК также необходим для поддержания теломер и контроля их длины. Следовательно, работа защитных механизмов в данном случае должна быть тонко сбалансирована, чтобы не только подавлять активность МЭ, но и поддерживать оптимальную длину и стабильность теломер. Структурно-функциональная связь гомеостаза теломер с ретротранспозоном LINE1 у человека указывает на тесную взаимосвязь эгоистичных МЭ с жизненно важными функциями генома. Такая связь, по-видимому, является наследием ретротранспозонного происхождения теломер и позволяет сохранять активные МЭ в геноме. Своеобразной платой за такую «услугу» является поддержание теломер и выполнение других жизненно важных функций, приобретённых МЭ в процессе их одомашнивания в геноме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретротранспозоны, теломеры, теломераза, полиплоидия, Piwi, piРНК, зародышевая линия, хроматин, LINE1, *Drosophila*.

DOI: 10.31857/S0320972523110076, **EDN:** MLIDFQ

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему моменту накоплен достаточный массив данных, который указывает на то, что регуляция активности мобильных элементов (МЭ) и важные клеточные процессы тесно связаны, и именно эта связь обеспечивает выживание в геноме МЭ, несмотря на мощные системы подавления их активности. Каков механизм этого глобального геномного компромисса? МЭ служат богатым источником эволюционных преобразований в геноме, предоставляя энхансеры, промоторы, экзоны, сайты сплайсинга, архитектурные элемен-

ты и участвуя в ключевых механизмах развития и иммунного ответа [1–4]. МЭ вносят вклад в формирование таких важных структур хромосом, как центромеры и локус генов рибосомной РНК [5–8]. В данном обзоре мы рассмотрим один из ярких примеров вклада ретротранспозонов в эволюцию генома, связанных с происхождением и поддержанием теломер.

Теломеры — концевые участки линейных хромосом — находятся в центре внимания множества исследователей уже больше 50 лет, с 1971 г., когда было опубликовано блестящее предсказание Алексея Матвеевича Оловникова

Принятые сокращения: МЭ — мобильные элементы; piРНК — Piwi-interacting RNA, Piwi-взаимодействующие короткие РНК; siРНК — Small interfering RNA, малые интерферирующие РНК.

* Адресат для корреспонденции.

об «Ахиллесовой пяте двойной спирали» — о недорепликации концов хромосом [9, 10]. Им же было предположено существование специализированной ДНК-полимеразы, которая обеспечивает удлинение теломерной ДНК. Такой фермент, названный теломеразой, был обнаружен гораздо позже и оказался обратной транскриптазой, находящейся в комплексе с РНК-матрицей [11]. Предполагается, что концы первичных линейных хромосом могли защищаться и поддерживаться за счёт присоединений ретроэлементов, а теломеразный рибонуклеопroteinный комплекс можно рассматривать как возникший в процессе эволюции специализированный ретроэлемент, присоединяющийся на концы хромосом [12]. Действительно, филогенетический анализ обратной транскриптазы выявил, что теломераза и ретротранспозоны произошли от общего предкового ретроэлемента [13–15]. Хотя у большинства организмов теломеры поддерживаются теломеразой, это не единственный способ удлинения теломер. Среди современных видов животных есть такие, теломеры которых поддерживаются за счёт присоединений ретротранспозонов — это многие виды насекомых, и в особенности семейство *Drosophilidae*. Считается, что у *Drosophila* теломераза была утрачена, а в поддержании теломер участвуют специализированные теломерные ретротранспозоны. У шелкопряда смешанный тип теломер, в поддержании которых участвует низкоактивная теломераза и специализированные теломерные ретроэлементы. У многих видов животных, использующих теломеразу, включая человека, ретроэлементы также присоединяются к теломере в определённых условиях [16, 17], используя двунитевой обрыв на конце хромосомы как удобную мишень для ретротранспозиций. В то же время у комаров не обнаружено ни теломеразы, ни теломерных ретроэлементов, а удлинение теломер, по-видимому, происходит за счёт рекомбинации коротких повторов сателлитной природы, обнаруженных в теломерах [18, 19].

Теломеры, поддерживающиеся за счёт мобильных элементов, хоть и отличаются от теломер, которые поддерживаются с помощью теломеразы, тем не менее напоминают нам о ретротранспозонном прошлом теломер. Исследование регуляции теломер дрозофилы, состоящих из ретротранспозонов, выявляет удивительное сходство, если не идентичность, механизмов поддержания теломер и контроля активности МЭ. Это сходство приводит нас к выводу о существовании тесной функциональной связи между ретротранспозонами и тело-

мерами в геноме, которая, как показывают недавние исследования, присутствует не только у дрозофилы, но и у млекопитающих.

ПОЧЕМУ ТЕЛОМЕРАЗА УТРАЧЕНА У МНОГИХ ВИДОВ НАСЕКОМЫХ И ДРОЗОФИЛЫ?

Известно много видов растений и животных, у которых в процессе эволюции теломераза была утрачена, а для удлинения теломер используются другие механизмы. У двукрылых ген теломеразы был потерян около 270 млн лет назад [20]. Однако, несмотря на отсутствие теломеразы, представители отряда *Diptera* являются одними из наиболее многочисленных и процветающих видов животных. Ген, кодирующий теломеразу, не был найден в геномах видов *Drosophila*, а удлинение их теломер происходит за счёт транспозиций мобильных элементов. Наиболее изученными являются теломерные ретроэлементы *Drosophila melanogaster*. Они представлены тремя семействами ретротранспозонов типа LINE (Long Interspersed Nuclear Elements) — *HeT-A*, *TART* и *TAHRE* [21, 22]. В то же время у бабочки *Bombyx mori* (тутового шелкопряда) присутствует низкоактивная теломераза, а теломерная ниша активно заполняется специализированными теломерными ретротранспозонами *SART* и *TRAS* [23]. С чем связана такая обратная эволюция и отказ от теломеразы, остаётся загадкой.

Алексей Матвеевич Оловников особенно живо интересовался исключениями из правил, ища объяснение тому или иному загадочному явлению природы. В данной главе хотелось бы привести его оригинальные рассуждения по поводу утраты теломеразы у дрозофилы, которые он высказывал в личной переписке: «Известно, что хромосомы личиночных слюнных желез *D. melanogaster* подвергаются многим раундам эндорепликации. Вдобавок имеет место соматический синапсис гомологичных хромосом. Однако строго точная боковая конъюгация сестринских хроматид, плотно соединённых между собой по длине, с неизбежностью должна создавать в теломерной зоне чисто механическое препятствие для формирования теломеразной теломеры. Такая теломера должна иметь теломерную петлю — трёхмерную структуру. Сотни конъюгированных хроматидных концов, плотно объединённых в едином политенном пучке хроматид, создавали бы непреодолимые стерические препятствия друг для друга при формировании своего 3D теломерного комплекса. Поэтому дрозофилы,

применив политенизацию, были вынуждены отказаться от услуг теломеразы. В отличие от указанной ситуации, процесс формирования G-квадруплекса, защищающего конец ретро-транспозона на конце каждой хроматиды, не требует формирования теломерной петли и благодаря этому легко совместим с боковой конъюгацией хроматид. Можно предположить, что именно политенизация могла послужить ключевой причиной выбора у дрозофилы альтернативного способа защиты своих теломер. Сама же политенизация хромосом в клетках слюнных желез у личинок дрозофил, как известно, необходима, в частности, для продукции большого количества клейкого вещества перед окукливанием. Плотная укладка хроматид, по-видимому, не используется теми организмами, которые нуждаются в повышении копийности генов, но обладают при этом теломеразными теломерами. Например, у инфузорий, имеющих полиплоидный макронуклеус и теломеразу, хромосомы фрагментированы. Допустима также следующая альтернатива: если теломеры, в отличие от остальной части политенизированных хроматид, не конъюгированы (значит, свободны от упомянутого стерического препятствия), то это расширяет возможности применения теломеразного способа защиты теломер. Поэтому могут существовать виды, у которых на той или иной стадии развития используются политенные хромосомы и теломераза-подобные белки, но концы хромосом не спарены. Такие неспаренные концы хромосом наблюдались, например, в специализированных политенных клетках и на концах мейотических пахитенных хромосом у бобового растения *Vigna unguiculata*, использующего теломеразу [24, 25]. Тенденция к расслаиванию концов хромосом на олиготеновые пучки наблюдается в политенных хромосомах некоторых других видов [26]» (из письма от А.М. Оловникова А.И. Калмыковой, сентябрь 2017 г.).

Действительно, недавно появилось сообщение, что теломерные ретротранспозоны не только у представителей рода *Drosophila*, но и у других видов имеют тенденцию к формированию G-квадруплексов — вторичных структур, образуемых последовательностями ДНК, обогащёнными гуаниновыми остатками [27]. Такие структуры могут защищать концы линейных хромосом при отсутствии теломерной петли, характерной для теломер, поддерживаемых с помощью теломеразы. Существование альтернативных способов поддержания теломер даёт уникальную возможность исследовать возникновение функциональных аналогий в

природе. Изучение теломер дрозофилы дало нам возможность посмотреть с новой точки зрения на защитные механизмы регуляции МЭ и их участие в функционировании теломер. Наиболее ярким примером является участие механизма РНК-интерференции и коротких РНК типа piРНК (Piwi-interacting RNA, Piwi-взаимодействующие короткие РНК) в контроле длины теломер дрозофилы в зародышевой линии.

ПУТЬ С УЧАСТИЕМ piРНК: ИСТОЧНИКИ И МИШЕНИ piРНК

МЭ обнаружены во всех исследованных организмах и представлены несколькими классами и многочисленными семействами [28]. МЭ занимают почти половину генома человека и 20% генома *D. melanogaster* [29] и являются основным источником мутаций, в том числе тех, которые вызывают рак и нарушения развития [30, 31]. Существует множество различных стратегий для ограничения активности МЭ в соматических клетках и предотвращения наследуемых транспозиций в клетках зародышевой линии. Особое внимание уделяется регуляции транскрипции МЭ для подавления первичной стадии их размножения. Транскрипционный сайленсинг достигается двумя основными механизмами, ведущими к формированию неактивной структуры хроматина. Первый и наиболее консервативный механизм компактизации хроматина связан с модификациями гистонов, особенно метилированием лизина 9 гистона 3 (H3K9me), с последующим связыванием и распространением гетерохроматинового белка 1 (HP1) [32]. Вторым мощным механизмом репрессии транскрипции является метилирование ДНК, осуществляемое цитозин-5'-метилтрансферазами [33]. Как модификации гистонов, так и метилирование ДНК нацелены в геноме в значительной степени на МЭ, вызывая репрессию их транскрипции. Главный вопрос заключается в том, как рекрутировать эти универсальные механизмы именно к МЭ? В соматических клетках позвоночных важную роль в метилировании ДНК и гистонов на последовательностях эндогенных ретровирусов играют белки семейства KRAB-ZFP (KRAB-containing zinc finger proteins) [34, 35].

Наиболее консервативной, практически универсальной для множества видов растений и животных системой распознавания «своей-чужой» является РНК-интерференция. Пути с участием белков семейства Argonaute и связан-

ных с ними коротких РНК считают иммунитетом на уровне нуклеиновых кислот, т.к. эти механизмы способны сиквенс-специфически распознать и элиминировать чужеродные нуклеиновые кислоты, принадлежащие вирусам, МЭ, трансгенам. Защита соматических клеток от вирусов осуществляется с помощью РНК-интерференции, белков Argonaute и малых интерферирующих РНК (small interfering RNA, siРНК) длиной в 21 нуклеотид. В гонадах животных действует особая система защиты от МЭ и вирусов, которая обеспечивается белками подсемейства Piwi семейства Argonaute и ассоциированными с ними короткими РНК — piРНК — длиной 24–30 нуклеотидов [36, 37]. Важная особенность этой системы состоит в том, что комплекс Piwi–piРНК способен сиквенс-специфично индуцировать модификации хроматина МЭ, т.е. вызывать транскрипционный сайленсинг. Ядерные белки Piwi в комплексе с piРНК индуцируют формирование неактивного хроматина, используя комплементарность piРНК и новообразованной мРНК МЭ. Это многостадийный процесс, требующий взаимодействия нескольких линкерных и вспомогательных белков, их посттрансляционных модификаций, приводящих к конформационным изменениям, затем к сборке и стабилизации белкового комплекса хроматина, управляемого Piwi–piРНК, и, наконец, на последнем этапе — к рекрутированию универсальных факторов гетерохроматина к МЭ [36, 38]. Такая тонкая регуляция требуется для того, чтобы выключить именно МЭ и предотвратить ошибочную репрессию клеточных генов.

Механизм сайленсинга, опосредованный piРНК, представляет собой многоступенчатый процесс. Основными стадиями этого процесса являются образование длинных одноцепочечных РНК-предшественников в ядре, их процессинг в зрелые piРНК в цитоплазме и piРНК-опосредованный сайленсинг, который может происходить как в ядре (транскрипционный сайленсинг), так и в цитоплазме (посттранскрипционный сайленсинг).

Для выполнения своих функций зрелые piРНК должны комплементарно взаимодействовать с кодирующими транскриптами МЭ, т.е. они должны быть антисмысловыми по отношению к мРНК МЭ. Действительно, значительная доля piРНК в гонадах комплементарна МЭ, т.е. образуется не из мРНК МЭ. Причина и источник образования таких РНК в геноме неочевидны и обеспечиваются особыми механизмами. Считается, что piРНК образуются из длинных одноцепочечных РНК эндогенного

происхождения, называемых piРНК-предшественниками (pre-piРНК) [39, 40]. Наши знания по этому вопросу в основном были получены на модели оогенеза дрозофилы и привели к представлению о том, что piРНК-предшественники и их мишени кодируются разными геномными локусами (рис. 1, а). Нужно сразу отметить, что этот механизм не является универсальным. Это представление возникло на основе секвенирования библиотек коротких РНК, которые выявили скопления уникально картирующихся piРНК в прицентромерном гетерохроматине. Такие районы, являющиеся источником piРНК, были названы piРНК-кластерами [39]. Эти протяжённые области генома размером до 200 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов), обогащённые разрушенными копиями МЭ, кодируют необычные длинные транскрипты, из которых образуются зрелые piРНК, узнающие эухроматиновые активные копии МЭ. Это удивительный пример функционального применения участков генома, рассматриваемых ранее как «мусорная» ДНК. У дрозофилы описаны два типа piРНК-кластеров, одноцепочечные и двухцепочечные, которые транскрибируются в одном или двух направлениях, соответственно, но все они продуцируют антисмысловые piРНК-предшественники. Как они таковыми получаются, легче понять для одноцепочечных piРНК-кластеров, в которых все разрушенные копии МЭ находятся в инвертированном положении по отношению к направлению транскрипции pre-piРНК. Самый известный одноцепочечный piРНК-кластер — это геномный локус *flamenco* *D. melanogaster*, работающий в фолликулярных клетках яичника. Он содержит множество разрушенных копий МЭ на геномной минус-цепи по отношению к направлению транскрипции. Таким образом, зрелые piРНК, образованные из длинных транскриптов локуса *flamenco*, комплементарны мРНК МЭ и запускают их сайленсинг [39, 41]. Такие локусы генерируют piРНК против эндогенных ретровирусов, относящихся к семейству *Gypsy*. Такой сценарий образования piРНК-кластеров повторяется в эволюции. Однонитевые piРНК-кластеры, схожие с локусом *flamenco*, обнаружены у различных видов рода *Drosophila* и комаров [42–44]. Более того, у мышей было обнаружено два одноцепочечных piРНК-кластера, похожих на локус *flamenco*, которые продуцируют короткие piРНК против эндогенных ретровирусов во время сперматогенеза [45].

Второй тип перицентромерных piРНК-кластеров — это двухцепочечные кластеры, которые обеспечивают основную защиту про-

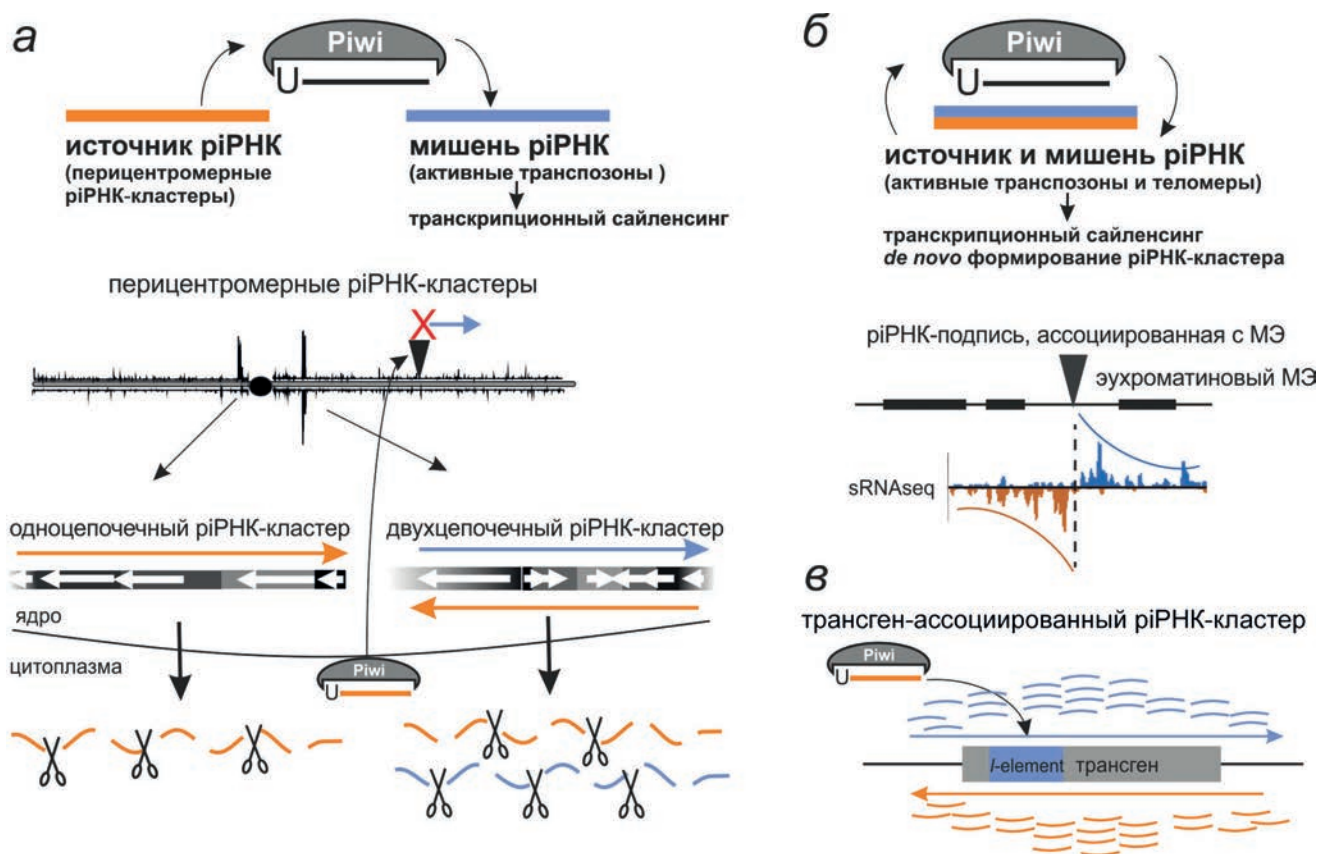


Рис. 1. В каких участках генома образуются предшественники piRNA? *а* – Гетерохроматические перичесентромерные кластеры piRNA являются источниками piRNA, которые нацелены на активные МЭ. Схематично показано картирование коротких РНК на хромосому. Показан принцип работы двух типов piRNA-кластеров – одно- и двухцепочечных. Образующийся комплекс Piwi–piRNA распознаёт и сайленсирует активные копии МЭ (чёрный треугольник). *б* – Активные копии МЭ формируют piRNA-кластеры. Схематически показана piRNA-«подпись» для кластеров piRNA, ассоциированных с МЭ. sRNAseq – сиквенсы коротких РНК. *в* – Трансенная модель демонстрирует, как активные МЭ в эухроматине становятся кластерами piRNA. Piwi в комплексе с эндогенной piRNA к *I-element* распознаёт РНК в комплементарном трансенном локусе, затем образуются транскрипты с обеих геномных цепей, а из них – короткие РНК

тив МЭ в клетках зародышевой линии дрозофилы. Эти локусы содержат сильно разрушенные копии МЭ, расположенные в случайных ориентациях. Двухцепочечные piRNA-кластеры транскрибируются в двух направлениях, что приводит к образованию длинных некодирующих предшественников piRNA из обеих геномных цепей [46]. Эти транскрипты экспортируются в цитоплазму, где процессируются с образованием зрелых piRNA. Процессинг piRNA является наиболее консервативным этапом piRNA-пути у разных видов. Внешняя митохондриальная мембрана и околоядерный компартмент служат платформой для процессинга piRNA, который происходит в результате действия цитоплазматических белков подсемейства Piwi, заряженных piRNA, и специализированных рибонуклеаз. Мишенями разрезания являются как транскрипты МЭ, так и piRNA-предшественники из кластеров, а в результате последовательного расщепления

смысловых и антисмысловых транскриптов МЭ образуются piRNA обеих ориентаций. Этот механизм, названный «пинг-понг», обнаружен в гонадах всех изученных видов животных и приводит не только к разрезанию мРНК МЭ (посттранскрипционному сайленсингу), но и продукции новых piRNA. Механизмы образования и амплификации piRNA, а также факторы их процессинга подробно описаны в недавних всеобъемлющих обзорах [36, 37, 47].

Считается, что двухцепочечные piRNA-кластеры – хранилища информации в геноме о ранее происходивших инвазиях МЭ и своеобразные ловушки для МЭ, т.к. их попадание туда приведёт к образованию piRNA и подавлению активности родственных копий в геноме [48]. Однако двухцепочечные piRNA-кластеры оказались видоспецифичными для *Drosophila* и некоторых видов членистоногих, т.к. они не были обнаружены у подавляющего числа изученных видов животных, включая

млекопитающих. Остаётся открытым вопрос: существует ли консервативный механизм образования рiРНК-предшественников, антисмысловых по отношению к МЭ. Например, у млекопитающих, несмотря на наличие огромного количества разрушенных копий МЭ в геноме, смысловые и антисмысловые рiРНК образуются из индивидуальных копий эволюционно молодых активных ретротранспозонов [45].

Действительно, рiРНК-путь, нацеленный на подавление распространения МЭ в геноме, должен быть в первую очередь направлен на активные копии МЭ. Более детальный анализ библиотек коротких РНК из яичников дрозофилы выявил, что не только гетерохроматиновые рiРНК-кластеры, но и полноразмерные эухроматиновые копии МЭ генерируют короткие РНК — как рiРНК, так и siРНК. Это говорит о том, что в местах недавних вставок МЭ происходит формирование новых локальных двухцепочечных рiРНК-кластеров [49], что напоминает сценарий образования рiРНК из активных копий LINE1 у человека [45]. Отличительной особенностью таких МЭ-ассоциированных рiРНК-кластеров является рiРНК-«подпись» — асимметричный профиль распределения коротких РНК до и после встройки МЭ, возникающий в результате сквозной транскрипции предшественников рiРНК в прилежащие к МЭ участки генома (рис. 1, б). Такая «подпись» очень характерна и может быть использована для предсказания неаннотированных встроек МЭ в геноме. Более того, распространение продукции коротких РНК за пределы МЭ может затрагивать соседние гены, подавляя их экспрессию [49]. Таким образом, активные МЭ служат не только мишенями рiРНК-системы, вызывающей компактизацию хроматина, но и источником коротких РНК, т.к. могут обеспечить продукцию siРНК и рiРНК *de novo*. Теломерные ретротранспозоны дрозофилы, расположенные в виде tandemных повторов в теломере, являются также источником и мишенью рiРНК, что обеспечивает регуляцию экспрессии теломерных ретротранспозонов по типу обратной связи, что будет обсуждаться более подробно в следующей главе.

Механизм, который лежит в основе формирования новых рiРНК-кластеров, ассоциированных с МЭ, и в особенности механизм генерации двунаправленной транскрипции, до конца неясен. Антисмысловые промоторы известны лишь для единичных представителей МЭ и являются, скорее, исключением. Например, антисмысловой промотор ретротранспозона человека LINE1 и образуемые с него транскрипты участвуют в siРНК-опосредован-

ном механизме супрессии транспозиций LINE1 [50, 51]. В случае узнавания комплексом Piwi–рiРНК комплементарных транскриптов, по-видимому, индуцируется необычный тип конвергентной транскрипции геномных локусов, содержащих активные копии МЭ. Этот процесс зависит от геномного контекста встройки; встречная транскрипция в локусе инсерции МЭ способствует формированию рiРНК-кластера [52]. Транскрипты, образующиеся с обеих геномных цепей, затем процессируются с образованием зрелых pi/siРНК. Такой сценарий имеет очевидное биологическое значение, заключающееся в амплификации защитных рiРНК, которые направлены против наиболее агрессивных транскрипционно активных копий МЭ. Исследование трансгенов, содержащих фрагмент ДНК, на который нацелены эндогенные рiРНК, позволило значительно продвинуться в понимании механизма формирования рiРНК-кластеров *de novo* [53–55]. Было показано, что трансгенные конструкции на основе МЭ — *I-element* — могут становиться новыми рiРНК-кластерами. Формирование таких рiРНК-кластеров *de novo* сопровождается возникновением низкого уровня транскрипции с минус-цепи и образованием смысловых и антисмысловых pi- и siРНК как из всего трансгена, так и из прилегающих геномных последовательностей на расстоянии от 1 до 10 т.п.н. от трансгена [56, 57] (рис. 1, в).

Сценарий, при котором активный МЭ является источником рiРНК, должен давать селективные преимущества и быть эволюционно выгодным. Вопрос о том, почему в ходе эволюции у *Drosophila* и других членистоногих сохранились протяжённые гетерохроматиновые рiРНК-кластеры, обслуживаемые особым транскрипционным аппаратом, остаётся открытым. Недавно появились данные о том, что удаление наиболее протяжённых перicen-тральных рiРНК-кластеров у *D. melanogaster* не приводит к дерепрессии МЭ [58]. Это указывает на то, что гетерохроматиновые рiРНК-кластеры не играют решающей роли в сайленсинге МЭ в стабильной лабораторной линии. С большой вероятностью эту функцию успешно выполняют МЭ-ассоциированные рiРНК-кластеры, которые формируются с помощью рiРНК, унаследованных от матери через цитоплазму ооцита [59].

По-видимому, ответ нужно искать в особенностях среды обитания разных видов. Природные популяции членистоногих подвергаются горизонтальному переносу МЭ, включая реинвазию родственных МЭ, ранее утраченных в геноме [60, 61]. Память о прежних инва-

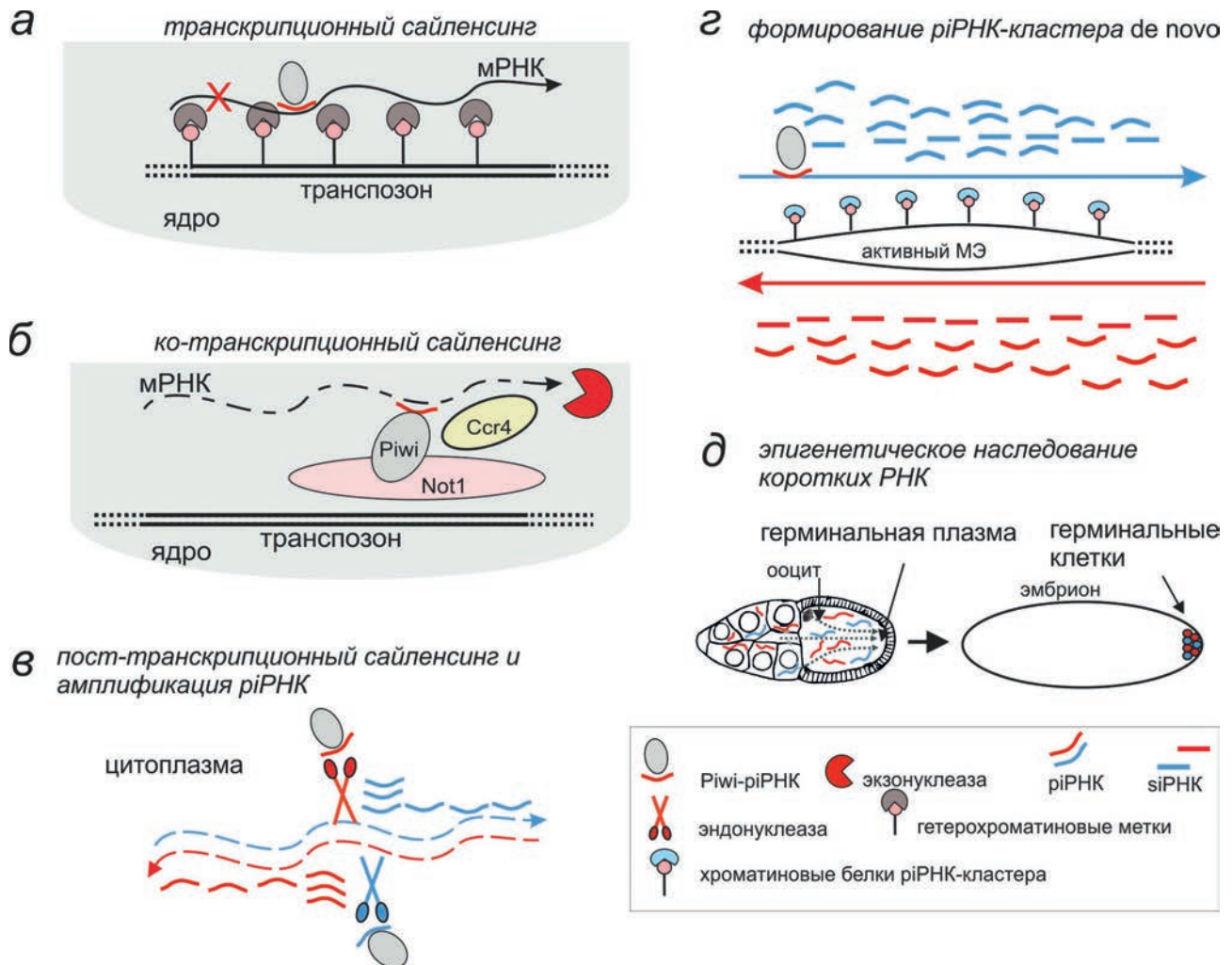


Рис. 2. Система с участием piRNA представляет собой многоуровневый механизм. У *Drosophila* piRNA могут индуцировать следующие процессы: (а) транскрипционную репрессию и компактизацию хроматина, (б) ко-транскрипционную деградацию новообразованной РНК в ядре с участием деаденилазного ядерного комплекса Ccr4-Not, (в) посттранскрипционную деградацию РНК, сопровождающуюся амплификацией piRNA, в цитоплазме, (г) продукцию piRNA de novo на активных МЭ за счёт активации антисмысловой транскрипции, (д) передачу материнских piRNA в комплексе с белками подсемейства Piwi потомству через герминальную плазму ооцита

зиях МЭ, хранящаяся в виде их фрагментов в составе piRNA-кластеров, может спасти популяцию при повторном заражении родственными МЭ за счёт наличия комплементарных piRNA и активации piRNA-опосредованного сайленсинга [39, 52, 57, 59, 62].

Идея о том, что активные копии МЭ служат первичными мишенями piRNA-пути, подтверждается недавно открытым механизмом ко-транскрипционной деградации транскриптов МЭ [63]. Несмотря на формирование гетерохроматина в локусах, содержащих активные копии МЭ, они тем не менее способны транскрибироваться в клетках зародышевой линии. Избыток транскриптов МЭ в ядрах клеток зародышевой линии дрозофилы удаляется за счёт активности ядерного комплекса Ccr4-Not, который обладает деаде-

нильной активностью [64]. Он привлекается ко-транскрипционно к транскриптам мобильных элементов за счёт взаимодействия с ядерным комплексом Piwi-piRNA. Скорее всего, за счёт деаденилазной активности комплекса Ccr4-Not происходит удаление поли(А)-хвоста на 3'-конце мРНК МЭ. Такие транскрипты могут распознаваться ядерной системой контроля качества РНК как aberrантные и подвергаться экзонуклеазному расщеплению. Примечательно, что мишенями ядерного комплекса Ccr4-Not в основном являются активные полноразмерные копии МЭ и теломерные ретротранспозоны [63].

Подводя итоги этого краткого обзора системы контроля МЭ с помощью piRNA, можно сказать, что piRNA могут индуцировать несколько важных процессов, которые направ-

лены на подавление активности МЭ (рис. 2). piРНК индуцируют транскрипционный сайленсинг в ядре, приводящий к сборке гетерохроматина в локусах МЭ [65–67]. Эта система также работает на ко-транскрипционном уровне, вызывая деградацию транскриптов МЭ в сайтах транскрипции с помощью ядерных нуклеаз [63]. piРНК-система осуществляет пост-транскрипционное расщепление транскриптов МЭ в цитоплазме, что сопровождается амплификацией piРНК и их последующим наследованием через цитоплазму ооцита [39, 59, 68–71]. Важно, что piРНК могут инициировать образование *de novo* piРНК-кластеров на полноразмерных эухроматиновых встройках МЭ, стимулируя антисмысловую транскрипцию МЭ и всплеск продукции piРНК против наиболее активных МЭ [49]. Более того, быстрая эволюция белков, участвующих в piРНК-пути, обеспечивает высокую адаптивность этой системы к новым мишеням [72–74]. Несмотря на огромный потенциал piРНК и других систем защиты от МЭ, паразитические МЭ успешно обходят их, продолжая размножаться, вызывая вредные мутации, заболевания и нарушения развития.

Таким образом, создаётся парадоксальная ситуация, при которой для подавления активности МЭ требуется его активность, за счёт которой работает piРНК-система. По всей видимости, далекая от 100% эффективность этой и других систем защиты позволяет МЭ размножаться в допустимых пределах, поставляя материал для эволюции генома и позитивного отбора, а также позволяя работать некоторым жизненно важным системам, например, теломерам. Подробнее на этом явлении остановимся ниже.

РОЛЬ КОРОТКИХ piРНК В РЕГУЛЯЦИИ ТЕЛОМЕР *Drosophila*

Нарушение piРНК-системы у дрозофилы приводит не только к активации МЭ, но и к чрезмерному удлинению теломер за счёт увеличения частоты присоединения ретротранспозонов к теломерам [75]. Это происходит потому, что в клетках зародышевой линии истощается пул коротких piРНК, специфичных к теломерным ретротранспозонам. Действительно, система piРНК не делает различий между теломерными и паразитическими ретротранспозонами и процессирует транскрипты теломерных ретротранспозонов с образованием piРНК в клетках зародышевой линии. Уменьшение количества таких piРНК, напри-

мер, при мутации генов, участвующих в этом пути, приводит к накоплению транскриптов теломерных МЭ, которые, в свою очередь, являются интермедиатами удлинения теломер. Теломеры дрозофилы образованы специализированными МЭ, которые не встречаются в других геномных локусах. Тандемные кластеры теломерных ретротранспозонов являются как источником piРНК, так и их мишенью, что представляет собой уникальный пример саморегулируемого piРНК-кластера. Теломерные ретротранспозоны дрозофилы обладают двунаправленными промоторами, что обеспечивает при расположении теломерных копий «голова-к-хвосту» образование как смысловых, так и антисмысловых транскриптов, из которых затем процессируют теломерные piРНК [76–79]. *Drosophila* не является единственным примером такой регуляции – белки Piwi также участвуют в регуляции транспозиций теломерных ретротранспозонов SART и TRAS у тутового шелкопряда *Bombyx mori* [80].

Типичным свойством теломер является их гетерохроматиновое состояние. В клетках зародышевой линии дрозофилы гетерохроматиновые факторы привлекаются к теломерным ретротранспозонам с участием piРНК-системы [81]. При нарушении работы piРНК-системы на теломерных повторах происходит снижение количества основного белка гетерохроматина HP1 и гистоновой модификации H3K9me3. С таким глобальным изменением структуры теломерного хроматина связано смещение теломерных кластеров хромосом от периферии ядра, наблюдаемое в герминальных клетках яичников у piРНК мутантов дрозофилы [81]. Транскрипция наиболее представленного теломерного повтора дрозофилы – ретротранспозона *HeT-A* – также регулируется в ядре на ко-транскрипционном уровне с помощью привлечения деаденилазного комплекса Csr4-Not [63]. С помощью методов конфокальной микроскопии обнаружено формирование околотеомерных телец, содержащих белковый комплекс Csr4-Not, белок Piwi и факторы ядерного экспорта РНК [63]. Интересно параллель с биогенезом теломеразной РНК человека, в котором также принимают участие неканонические деаденилазы Csr4 и Caf1, сконцентрированные в ядерных тельцах Кахала [82]. Таким образом, piРНК-система и деаденилаза Csr4-Not участвуют как в подавлении активности паразитических МЭ, так и в регуляции функций теломер дрозофилы.

piРНК-система является негативным регулятором длины теломер у дрозофилы, т.е. чем активнее она работает, тем реже происходят

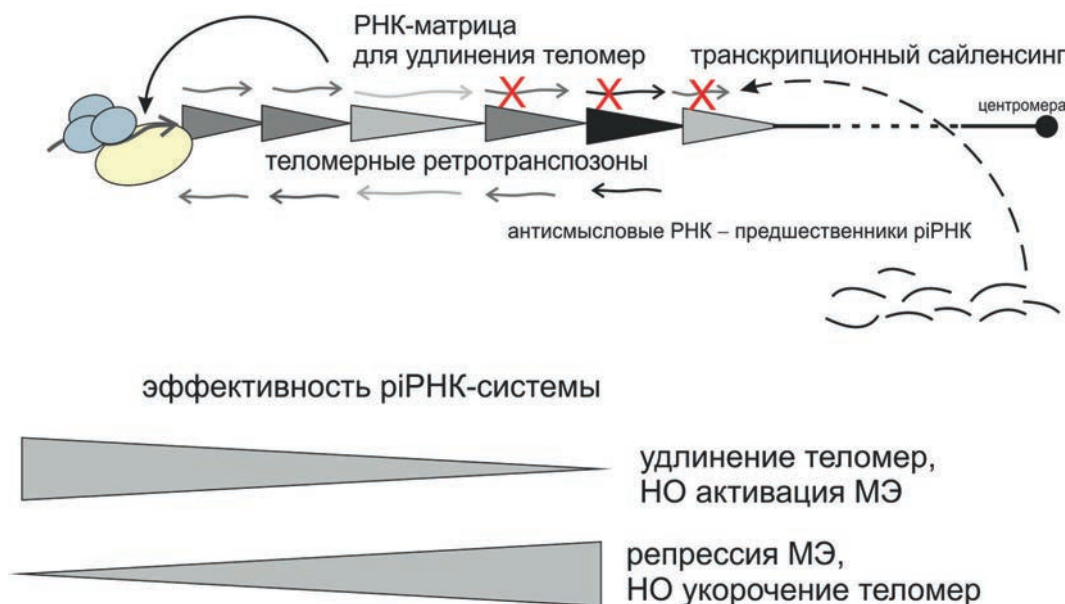
Drosophila melanogaster

Рис. 3. Механизмы, регулирующие поддержание теломер и контроль МЭ, тесно связаны. Система piРНК контролирует как активность паразитических МЭ, так и частоту присоединения теломерных ретроэлементов на концы хромосом в зародышевой линии дрозофилы

удлинения теломер. Сложная система обратной связи регулирует уровень теломерных транскриптов, теломерных piРНК, состояние теломерного хроматина, чтобы обеспечить необходимую для нормального развития частоту присоединений теломерных ретроэлементов к концам хромосом. Эту сложную систему контроля длины теломер ещё больше усложняет то, что механизм с участием piРНК должен успешно подавлять активность МЭ. Действительно, нарушение piРНК-системы приводит не только к повышенной частоте теломерных присоединений, но и к активации МЭ и стерильности [75]. Противоположную ситуацию, т.е. активацию piРНК-системы и чрезмерное укорочение теломер, удалось наблюдать на одной из природных линий дрозофилы. Дело в том, что из-за высокой вариабельности белков, участвующих в piРНК-пути, среди природных популяций дрозофил наблюдается различная эффективность процессинга piРНК, что определяет разную степень защиты генома от инвазии новых МЭ [83]. У мух, обладающих наиболее эффективным процессингом piРНК, отсутствовали полноразмерные копии основного структурного элемента теломер – ретро-транспозона *HeT-A*. Такая линия обладала сниженной фертильностью и жизнеспособностью. Вполне вероятно, что высокоэффективная работа piРНК-системы, приводящая к мощной репрессии МЭ, также должна вызы-

вать критическое укорочение теломер. На основе этих данных, пока ещё фрагментарных, хочется предположить, что защитная piРНК-система не может бесконечно повышать свою эффективность и успешно удалять из генома МЭ, а, скорее, должна быть хорошо сбалансирована, чтобы защитить геном от неконтролируемого размножения МЭ и обеспечить надлежащее поддержание длины теломер (рис. 3).

КОГДА И ПОЧЕМУ ПРОИСХОДИТ АКТИВАЦИЯ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В РАЗВИТИИ?

Для понимания механизмов регуляции МЭ стоит посмотреть, на каких этапах жизненного цикла происходит их активация в ходе нормального развития (рис. 4, а, б, в). Кратковременная активация МЭ наблюдается на ранних стадиях гаметогенеза у различных видов [84]. У *Drosophila* существует короткий интервал на ранних стадиях оогенеза, когда снижается уровень ядерного белка Piwi и происходит активация транскрипции МЭ [85]. Транскрипты МЭ, образующиеся на этой стадии, процессируются в цитоплазме с образованием коротких piРНК с помощью других белков подсемейства Piwi. Когда экспрессия Piwi выходит вновь на высокий уровень, piРНК МЭ обеспечивают подавление их собственной транскрипции

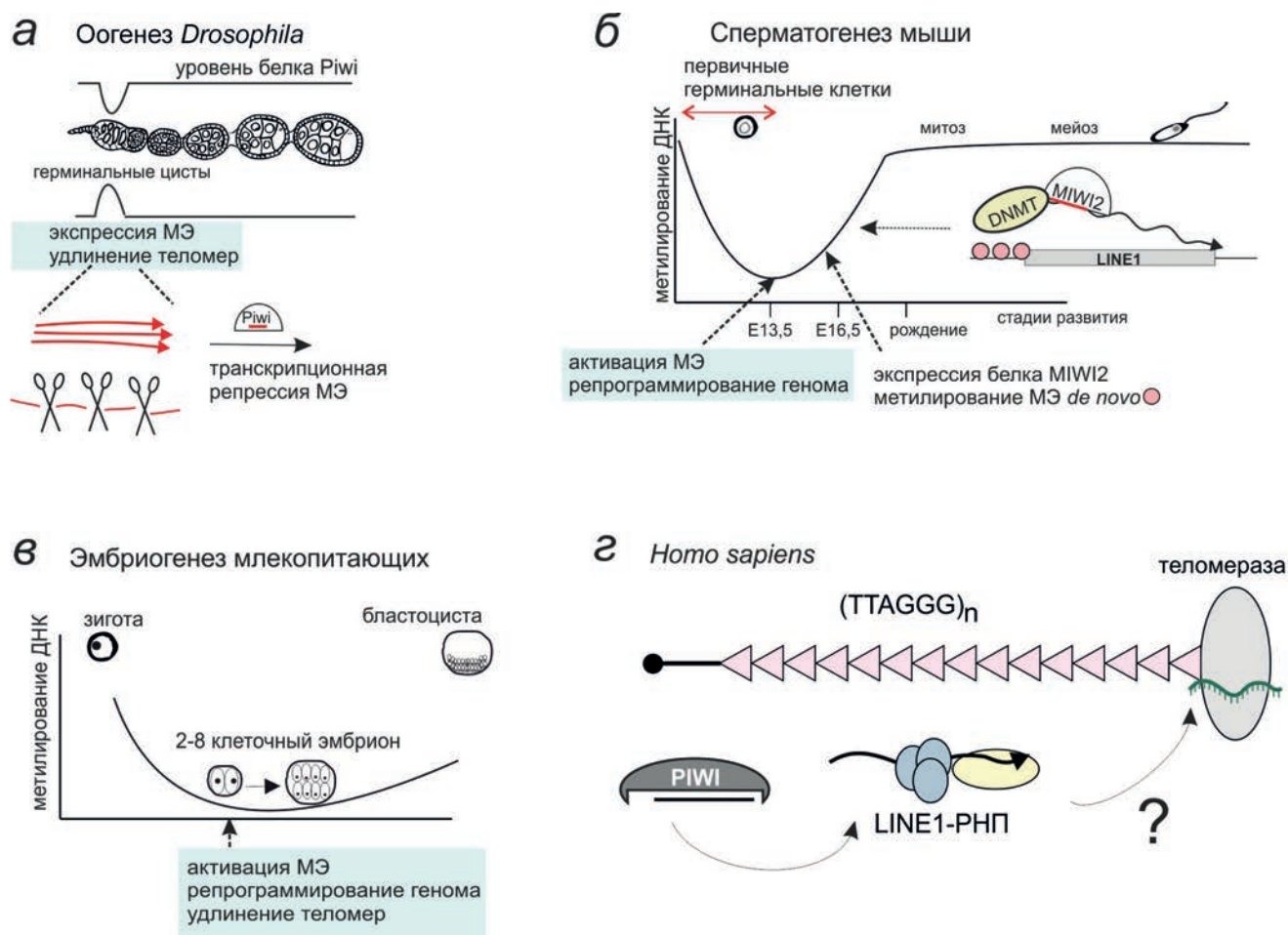


Рис. 4. Стадии развития, на которых происходит активация МЭ. *а* – В оогенезе дрозофилы активация МЭ и теломерных ретротранспозонов происходит в герминальных цистах, когда снижается уровень белка Piwi. На этой стадии образуются piРНК, которые запускают транскрипционный сайленсинг на последующих стадиях оогенеза. Предполагается, что на этой же стадии происходит удлинение теломер за счёт ретротранспозиций теломерных ретроэлементов. *б* – Глобальное деметилирование ДНК в первичных зародышевых клетках во время сперматогенеза у мышей сопровождается активацией МЭ. Затем устанавливается piРНК-опосредованное *de novo* ДНК-метилование эволюционно молодых активных копий LINE1. *в* – Мобилизация МЭ и удлинение теломер наблюдаются также во время первых зиготических делений в эмбриогенезе млекопитающих. *з* – Репрессия LINE1 с помощью piРНК может опосредованно влиять на его теломерные функции в герминальных клетках млекопитающих (гипотеза)

на более поздних стадиях оогенеза [86]. На ранних стадиях оогенеза, где отсутствует белок Piwi, также наблюдали активацию транскрипции теломерных ретроэлементов *HeT-A* и *TART*, которая приводила к образованию интермедиатов удлинения теломер [66, 87, 88]. Такими интермедиатами у *D. melanogaster* являются сферические рибонуклеопротеиновые (РНП) частицы, состоящие из белка Gag, кодируемого ретротранспозоном *HeT-A*, заполненные РНК *HeT-A* и способные направленно локализоваться на теломере [89, 90]. Впервые такие *HeT-A*-сферы были обнаружены в активно пролиферирующих клетках мозга у личинок, а их появление на теломерах совпадало с репликацией теломер [89]. Основной структурный компонент теломер дрозофилы, *HeT-A*, является неавтономным, а обратная транскрип-

таза предоставляется другими теломерными ретроэлементами – *TART* и/или *TANRE*. Действительно, ревертаза *TART* была обнаружена также в составе *HeT-A*-сфер в нейробластах [91]. Такие РНП, вероятно, и осуществляют ретротранспозиции теломерных элементов на концы хромосом, удлиняя теломеры дрозофилы. В норме транскрипция теломерных ретротранспозонов *HeT-A* и *TART* наблюдается в герминальных цистах яичника, а при нарушении системы piРНК появляются сферические частицы, состоящие из РНК и белка Gag, кодируемых *HeT-A* [87]. По-видимому, удлинение теломер происходит на тех же стадиях, на которых активируются МЭ. Наиболее вероятно, что это связано с ослаблением piРНК-защиты и накоплением транскриптов теломерных элементов, а также с глобальной декомпактизацией

гетерохроматина и большей доступностью концов хромосом в дробящихся клетках-предшественниках гамет. Действительно, нарушения таких факторов гетерохроматина, как HP1, деметилазы гистонов Lsd1 и её кофактора Ova, метилтрансферазы dSetdB1 и Suvar3-9, приводят как к активации МЭ, так и накоплению транскриптов теломерных повторов [92–98], а у мутантов по гену *Su(var)2-5*, кодирующему HP1, и к удлинению теломер [98]. Похожий сценарий можно наблюдать у других животных. У млекопитающих активация экспрессии эволюционно молодых подсемейств ретроэлемента LINE1 происходит в примордиальных клетках мужской зародышевой линии в период пренатального развития и совпадает с глобальным деметилированием геномной ДНК [99]. У мышей на более поздних стадиях сперматогенеза появление белка подсемейства Piwi, MILI2, запускает продукцию piРНК, рекрутирование ДНК-метилазы и установление piРНК-опосредованного *de novo* метилирования ДНК на последовательностях LINE1 [100].

В развитии млекопитающих происходит две волны деметилирования и реметилирования ДНК — в первичных герминальных клетках и на ранней стадии эмбриогенеза [101]. Считается, что глобальное деметилирование генома в первичных зародышевых клетках гонад во время пренатального развития млекопитающих необходимо для перепрограммирования эпигенома и установления паттерна метилирования ДНК *de novo*, в том числе на последовательностях активных ретротранспозонов [102, 103]. Деметилирование ДНК также необходимо для удлинения теломер на ранней эмбриональной стадии, что сопровождается повышенным уровнем транскрипции многих ретротранспозонов на этой стадии развития [104–106]. Важную роль в поддержании деметилированного состояния ДНК и депрессии гетерохроматина в культивируемых эмбриональных стволовых клетках, индуцированных плюрипотентных стволовых клетках и 2-клеточных эмбрионах играет транскрипционный фактор Zscan4 (Zinc finger and SCAN domain containing 4) [107]. Zscan4 активирует экспрессию генов, участвующих в гомологичной рекомбинации, что стимулирует рекомбинационный механизм удлинения теломер в эмбриональных стволовых клетках, 2-клеточных эмбрионах и опухолевых клетках типа ALT (alternative lengthening of telomeres), использующих рекомбинацию для удлинения теломер [105, 106, 108]. В преимплантационных эмбрионах наблюдается также активация ретротранспозона LINE1 и эндогенных ретрови-

русов [109–112]. Интересно, что ингибирование LINE1 приводит к нарушению экспрессии факторов плюрипотентности, в том числе Zscan4, и блокирует удлинение теломер в эмбриональных стволовых клетках [113]. В свою очередь, РНК LINE1 играет роль репрессора транскрипции гена *Dux*, что необходимо для выхода клеток из состояния 2С и продолжения развития [114]. Также обнаружено, что промоторы генов ранней дифференцировки содержат регуляторные участки эндогенных ретровирусов и регулируются кодируемыми ими белками [115]. Таким образом, активация МЭ происходит во время коротких периодов развития, связанных с перепрограммированием генома и удлинением теломер у млекопитающих. Более того, эти процессы взаимосвязаны тонкой регуляторной сетью, правильный баланс которой необходим для нормального развития.

В процессе естественного старения, как и при синдромах преждевременного старения, наблюдаются сходные для МЭ и теломерных повторов декомпактизация хроматина и активация экспрессии, приводящие к повреждениям ДНК и клеточной гибели [116, 117], что ещё раз подчёркивает общность эпигенетической регуляции теломер и МЭ на разных этапах развития.

УЧАСТИЕ LINE1 В ПОДДЕРЖАНИИ ТЕЛОМЕР МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Сходство механизмов контроля МЭ и регуляции теломер кажется очевидным для дрозофилы, где теломеры поддерживаются за счёт присоединений ретротранспозонов к концам хромосом. У большинства организмов теломеры поддерживаются за счёт активности теломеразы — узкоспециализированной обратной транскриптазы, компоненты которой кодируются обычными генами. Накапливается всё больше данных, которые говорят об участии ретротранспозонов в функционировании теломер у млекопитающих. При дисфункции компонентов защитного теломерного комплекса — шелтерина — ретротранспозон LINE1 способен присоединяться с помощью обратной транскрипции к теломере в клетках человека и становиться структурной частью теломерной ДНК [17]. Кроме того, LINE1 также способен играть роль в функционировании теломер. В раковых клетках человека на фоне нокдауна LINE1 наблюдалось снижение экспрессии белков шелтерина, падение активности теломеразы и укорочение теломер [118]. Как уже упоминалось, ингибирование активности LINE1 у 2-клеточных эмбрионов мышей блокирует

удлинение теломер и перепрограммирование генома [113]. Более того, РНП-частицы, состоящие из РНК и белков, кодируемых LINE1, были обнаружены непосредственно на концах теломер в раковых клетках человека и в 2-клеточных эмбрионах мыши. Наконец, LINE1-РНП были выявлены в комплексе с РНК, содержащей теломерные повторы (TERRA) [113, 119]. Похоже, что LINE1 является активным участником биогенеза теломер, хотя остаются открытыми вопросы о том, как LINE1 туда попадает и какие компоненты теломер он распознаёт. Учитывая существенную роль LINE1 в функционировании теломер, можно предположить наличие опосредованной связи между рiРНК-системой, регулирующей экспрессию LINE1 в герминальных клетках, и теломерами у видов, использующих теломеразу (рис. 4, з).

Изложенные данные обнаруживают удивительное сходство во временных интервалах и в механизмах, регулирующих поддержание теломер и контроль МЭ в геноме у млекопитающих. Изучение такой связи открывает новые перспективы в возможностях регуляции теломер в развитии, старении и в опухолевых клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отношения между геномом хозяина и МЭ часто определяют как геномный конфликт, и механизмы, лежащие в основе этого конфликта, сложны и противоречивы [120]. В те годы, когда ещё не были известны молекулярные механизмы контроля МЭ, анализ популяционной динамики МЭ выявил, что существует баланс между скоростью размножения МЭ и механизмами, которые ограничивают этот процесс, что приводит к поддержанию стабильного числа копий МЭ в геноме [121]. По-видимому, чрезмерное подавление активности МЭ не даёт селективного преимущества хозяину, что подтверждено современными методами анализа геномных данных природных популяций дрозофилы. Так, например, количество рiРНК не коррелирует с транспозиционной активностью МЭ, т.е. рiРНК-система неоптимально адаптирована к защите генома от МЭ [122].

Усовершенствование быстро адаптируемой рiРНК-системы, вероятно, ограничено её участием в ключевых регуляторных функциях, что создаёт конфликт между МЭ и геномом. Можно предположить, что механизмы, приводящие к уменьшению числа копий эгоистичных МЭ, отрицательно влияют на критические клеточные функции, выполняемые одомашненными МЭ, и именно эта связь обеспечивает выживание эгоистичных МЭ в геноме. Каков механизм этого геномного компромисса? Мы думаем, что часть ответа можно найти в ретротранспозонном происхождении теломер и теломеразы. Активация МЭ в развитии совпадает с перепрограммированием генома, стиранием эпигенетических меток и удлинением теломер. У *Drosophila* двойственная роль рiРНК-системы в поддержании целостности теломер и репрессии МЭ обусловлена природой теломер, которые образованы ретротранспозонами. Однако теломеразу также можно рассматривать как специализированный ретроэлемент, который унаследовал функциональную связь с ретротранспозонами, населяющими геном. Таким образом, мы приходим к выводу, что защитные механизмы могут лишь частично подавить активность эгоистичных МЭ, будучи сбалансированы для выполнения жизненно важных функций, например, связанных с поддержанием теломер. Однако нет худа без добра — растущий объём данных указывает на огромный вклад одомашненных МЭ в разнообразие регуляторных механизмов, которые в конечном итоге приносят эволюционные преимущества геному хозяина.

Вклад авторов. А.И. Калмыкова — концепция и написание текста статьи; О.А. Соколова — написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00025, рук. О.А. Соколова).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fueyo, R., Judd, J., Feschotte, C., and Wysocka, J. (2022) Roles of transposable elements in the regulation of mammalian transcription, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 481-497, doi: 10.1038/s41580-022-00457-y.
2. Modzelewski, A. J., Gan Chong, J., Wang, T., and He, L. (2022) Mammalian genome innovation through transposon domestication, *Nat. Cell Biol.*, **24**, 1332-1340, doi: 10.1038/s41556-022-00970-4.

3. Almojil, D., Bourgeois, Y., Falis, M., Hariyani, I., Wilcox, J., and Boissinot, S. (2021) The structural, functional and evolutionary impact of transposable elements in eukaryotes, *Genes (Basel)*, **12**, 918, doi: 10.3390/genes12060918.
4. Nishihara, H. (2020) Transposable elements as genetic accelerators of evolution: contribution to genome size, gene regulatory network rewiring and morphological innovation, *Genes Genet. Syst.*, **94**, 269-281, doi: 10.1266/ggs.19-00029.
5. Hartley, G., and O'Neill, R. J. (2019) Centromere repeats: hidden gems of the genome, *Genes (Basel)*, **10**, 223, doi: 10.3390/genes10030223.
6. Chang, C. H., Chavan, A., Palladino, J., Wei, X., Martins, N. M. C., Santinello, B., Chen, C. C., Erceg, J., Beliveau, B. J., Wu, C. T., Larracuenta, A. M., and Mellone, B. G. (2019) Islands of retroelements are major components of *Drosophila* centromeres, *PLoS Biol.*, **17**, e3000241, doi: 10.1371/journal.pbio.3000241.
7. Chueh, A. C., Northrop, E. L., Brettingham-Moore, K. H., Choo, K. H., and Wong, L. H. (2009) LINE retrotransposon RNA is an essential structural and functional epigenetic component of a core neocentromeric chromatin, *PLoS Genet.*, **5**, e1000354, doi: 10.1371/journal.pgen.1000354.
8. Nelson, J. O., Slicko, A., and Yamashita, Y. M. (2023) The retrotransposon R2 maintains *Drosophila* ribosomal DNA repeats, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2221613120, doi: 10.1073/pnas.2221613120.
9. Olovnikov, A. M. (1971) Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides [in Russian], *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **201**, 1496-1499.
10. Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon, *J. Theor. Biol.*, **41**, 181-190, doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7.
11. Blackburn, E. H. (1992) Telomerases, *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 113-129, doi: 10.1146/annurev.bi.61.070192.000553.
12. Garavis, M., Gonzalez, C., and Villasante, A. (2013) On the origin of the eukaryotic chromosome: the role of noncanonical DNA structures in telomere evolution, *Genome Biol. Evol.*, **5**, 1142-1150, doi: 10.1093/gbe/evt079.
13. Gladyshev, E. A., and Arkhipova, I. R. (2007) Telomere-associated endonuclease-deficient *Penelope*-like retroelements in diverse eukaryotes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9352-9357, doi: 10.1073/pnas.0702741104.
14. Nakamura, T. M., and Cech, T. R. (1998) Reversing time: origin of telomerase, *Cell*, **92**, 587-590, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81123-x.
15. Eickbush, T. H. (1997) Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science*, **277**, 911-912, doi: 10.1126/science.277.5328.911.
16. Kordyukova, M., Olovnikov, I., and Kalmykova, A. (2018) Transposon control mechanisms in telomere biology, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **49**, 56-62, doi: 10.1016/j.gde.2018.03.002.
17. Morrish, T. A., Garcia-Perez, J. L., Stamato, T. D., Taccioli, G. E., Sekiguchi, J., and Moran, J. V. (2007) Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres, *Nature*, **446**, 208-212, doi: 10.1038/nature05560.
18. Roth, C. W., Kobeski, F., Walter, M. F., and Biessmann, H. (1997) Chromosome end elongation by recombination in the mosquito *Anopheles gambiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5176-5183, doi: 10.1128/MCB.17.9.5176.
19. Compton, A., Liang, J., Chen, C., Lukyanchikova, V., Qi, Y., Potters, M., Settlege, R., Miller, D., Deschamps, S., Mao, C., Llaca, V., Sharakhov, I. V., and Tu, Z. (2020) The beginning of the end: a chromosomal assembly of the new world malaria mosquito ends with a novel telomere, *G3 (Bethesda)*, **10**, 3811-3819, doi: 10.1534/g3.120.401654.
20. Mason, J. M., Randall, T. A., and Capkova Frydrychova, R. (2016) Telomerase lost? *Chromosoma*, **125**, 65-73, doi: 10.1007/s00412-015-0528-7.
21. Pardue, M. L., and DeBaryshe, P. G. (2008) *Drosophila* telomeres: a variation on the telomerase theme, *Fly*, **2**, 101-110, doi: 10.4161/fly.6393.
22. Casacuberta, E. (2017) *Drosophila*: retrotransposons making up telomeres, *Viruses*, **9**, 192, doi: 10.3390/v9070192.
23. Fujiwara, H., Osanai, M., Matsumoto, T., and Kojima, K. K. (2005) Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*, *Chromosome Res.*, **13**, 455-467, doi: 10.1007/s10577-005-0990-9.
24. Guerra, M., Kenton, A., and Bennett, M. D. (1996) rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization, *Ann. Botany*, **78**, 157-161, doi: 10.1006/anbo.1996.0108.
25. Iwata-Otsubo, A., Lin, J. Y., Gill, N., and Jackson, S. A. (2016) Highly distinct chromosomal structures in cowpea (*Vigna unguiculata*), as revealed by molecular cytogenetic analysis, *Chromosome Res.*, **24**, 197-216, doi: 10.1007/s10577-015-9515-3.
26. Zhimulev, I. F. (1996) Morphology and structure of polytene chromosomes, *Adv. Genet.*, **34**, 1-497, doi: 10.1016/s0065-2660(08)60533-7.
27. Jedlicka, P., Tokan, V., Kejnovska, I., Hobza, R., and Kejnovsky, E. (2023) Telomeric retrotransposons show propensity to form G-quadruplexes in various eukaryotic species, *Mob. DNA*, **14**, 3, doi: 10.1186/s13100-023-00291-9.
28. Wells, J. N., and Feschotte, C. (2020) A field guide to eukaryotic transposable elements, *Annu. Rev. Genet.*, **54**, 539-561, doi: 10.1146/annurev-genet-040620-022145.

29. Merel, V., Boulesteix, M., Fablet, M., and Vieira, C. (2020) Transposable elements in *Drosophila*, *Mob. DNA*, **11**, 23, doi: 10.1186/s13100-020-00213-z.
30. Anwar, S. L., Wulaningsih, W., and Lehmann, U. (2017) Transposable elements in human cancer: causes and consequences of deregulation, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 974, doi: 10.3390/ijms18050974.
31. Huang, C. R., Burns, K. H., and Boeke, J. D. (2012) Active transposition in genomes, *Annu. Rev. Genet.*, **46**, 651-675, doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155616.
32. Lomberk, G., Wallrath, L., and Urrutia, R. (2006) The heterochromatin protein 1 family, *Genome Biol.*, **7**, 228, doi: 10.1186/gb-2006-7-7-228.
33. Lyko, F. (2018) The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation, *Nat. Rev. Genet.*, **19**, 81-92, doi: 10.1038/nrg.2017.80.
34. Ecco, G., Cassano, M., Kauzlaric, A., Duc, J., Coluccio, A., Offner, S., Imbeault, M., Rowe, H. M., Turelli, P., and Trono, D. (2016) Transposable elements and their KRAB-ZFP controllers regulate gene expression in adult tissues, *Dev. Cell*, **36**, 611-623, doi: 10.1016/j.devcel.2016.02.024.
35. Yang, P., Wang, Y., and Macfarlan, T. S. (2017) The role of KRAB-ZFPs in transposable element repression and mammalian evolution, *Trends Genet.*, **33**, 871-881, doi: 10.1016/j.tig.2017.08.006.
36. Czech, B., Munafo, M., Ciabrelli, F., Eastwood, E. L., Fabry, M. H., Kneuss, E., and Hannon, G. J. (2018) piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing, *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 131-157, doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031441.
37. Ozata, D. M., Gainetdinov, I., Zoch, A., O'Carroll, D., and Zamore, P. D. (2019) PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions, *Nat. Rev. Genet.*, **20**, 89-108, doi: 10.1038/s41576-018-0073-3.
38. Andreev, V. I., Yu, C., Wang, J., Schnabl, J., Tirian, L., Gehre, M., Handler, D., Duchek, P., Novatchkova, M., Baumgartner, L., Meixner, K., Sienski, G., Patel, D. J., and Brennecke, J. (2022) Panoramix SUMOylation on chromatin connects the piRNA pathway to the cellular heterochromatin machinery, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **29**, 130-142, doi: 10.1038/s41594-022-00721-x.
39. Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G. J. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*, *Cell*, **128**, 1089-1103, doi: 10.1016/j.cell.2007.01.043.
40. Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M. J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes, *Nature*, **442**, 203-207, doi: 10.1038/nature04916.
41. Sarot, E., Payen-Groschene, G., Bucheton, A., and Pelisson, A. (2004) Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene, *Genetics*, **166**, 1313-1321, doi: 10.1534/genetics.166.3.1313.
42. Aguiar, E., de Almeida, J. P. P., Queiroz, L. R., Oliveira, L. S., Olmo, R. P., de Faria, I., Imler, J. L., Gruber, A., Matthews, B. J., and Marques, J. T. (2020) A single unidirectional piRNA cluster similar to the *flamenco* locus is the major source of EVE-derived transcription and small RNAs in *Aedes aegypti* mosquitoes, *RNA*, **26**, 581-594, doi: 10.1261/rna.073965.119.
43. Rozhkov, N. V., Zelentsova, E. S., Shostak, N. G., and Evgen'ev, M. B. (2011) Expression of *Drosophila virilis* retroelements and role of small RNAs in their intrastrain transposition, *PLoS One*, **6**, e21883, doi: 10.1371/journal.pone.0021883.
44. Van Lopik, J., Alizada, A., Trapotsi, M. A., Hannon, G. J., Bornelöv, S., and Czech Nicholson, B. (2023) Unistrand piRNA clusters are an evolutionarily conserved mechanism to suppress endogenous retroviruses across the *Drosophila* genus, *Nat Commun.*, **14**, 7337, doi: 10.1038/s41467-023-42787-1.
45. Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K. F., Bestor, T., and Hannon, G. J. (2008) A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice, *Mol. Cell*, **31**, 785-799, doi: 10.1016/j.molcel.2008.09.003.
46. Andersen, P. R., Tirian, L., Vunjak, M., and Brennecke, J. (2017) A heterochromatin-dependent transcription machinery drives piRNA expression, *Nature*, **549**, 54-59, doi: 10.1038/nature23482.
47. Sato, K., and Siomi, M. C. (2020) The piRNA pathway in *Drosophila* ovarian germ and somatic cells, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **96**, 32-42, doi: 10.2183/pjab.96.003.
48. Khurana, J. S., Wang, J., Xu, J., Koppetsch, B. S., Thomson, T. C., Nowosielska, A., Li, C., Zamore, P. D., Weng, Z., and Theurkauf, W. E. (2011) Adaptation to P element transposon invasion in *Drosophila melanogaster*, *Cell*, **147**, 1551-1563, doi: 10.1016/j.cell.2011.11.042.
49. Shpiz, S., Ryazansky, S., Olovnikov, I., Abramov, Y., and Kalmykova, A. (2014) Euchromatic transposon insertions trigger production of novel Pi- and endo-siRNAs at the target sites in the *Drosophila* germline, *PLoS Genet.*, **10**, e1004138, doi: 10.1371/journal.pgen.1004138.
50. Speck, M. (2001) Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 1973-1985, doi: 10.1128/MCB.21.6.1973-1985.2001.
51. Yang, N., and Kazazian, H. H., Jr. (2006) L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 763-771, doi: 10.1038/nsmb1141.

52. Komarov, P. A., Sokolova, O., Akulenko, N., Brassat, E., Jensen, S., and Kalmykova, A. (2020) Epigenetic requirements for triggering heterochromatinization and Piwi-interacting RNA production from transgenes in the *Drosophila* germline, *Cells*, **9**, 922, doi: 10.3390/cells9040922.
53. De Vanssay, A., Bouge, A. L., Boivin, A., Hermant, C., Teyssset, L., Delmarre, V., Antoniewski, C., and Ronsseray, S. (2012) Paramutation in *Drosophila* linked to emergence of a piRNA-producing locus, *Nature*, **490**, 112-115, doi: 10.1038/nature11416.
54. Josse, T., Teyssset, L., Todeschini, A. L., Sidor, C. M., Anxolabehere, D., and Ronsseray, S. (2007) Telomeric trans-silencing: an epigenetic repression combining RNA silencing and heterochromatin formation, *PLoS Genet.*, **3**, 1633-1643, doi: 10.1371/journal.pgen.0030158.
55. Muerdter, F., Olovnikov, I., Molaro, A., Rozhkov, N. V., Czech, B., Gordon, A., Hannon, G. J., and Aravin, A. A. (2012) Production of artificial piRNAs in flies and mice, *RNA*, **18**, 42-52, doi: 10.1261/rna.029769.111.
56. Akulenko, N., Ryazansky, S., Morgunova, V., Komarov, P. A., Olovnikov, I., Vauray, C., Jensen, S., and Kalmykova, A. (2018) Transcriptional and chromatin changes accompanying de novo formation of transgenic piRNA clusters, *RNA*, **24**, 574-584, doi: 10.1261/rna.062851.117.
57. Olovnikov, I., Ryazansky, S., Shpiz, S., Lavrov, S., Abramov, Y., Vauray, C., Jensen, S., and Kalmykova, A. (2013) De novo piRNA cluster formation in the *Drosophila* germ line triggered by transgenes containing a transcribed transposon fragment, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5757-5768, doi: 10.1093/nar/gkt310.
58. Gebert, D., Neubert, L. K., Lloyd, C., Gui, J., Lehmann, R., and Teixeira, F. K. (2021) Large *Drosophila* germline piRNA clusters are evolutionarily labile and dispensable for transposon regulation, *Mol. Cell*, **81**, 3965-3978, doi: 10.1016/j.molcel.2021.07.011.
59. Brennecke, J., Malone, C. D., Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Stark, A., and Hannon, G. J. (2008) An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing, *Science*, **322**, 1387-1392, doi: 10.1126/science.1165171.
60. Blumenstiel, J. P. (2019) Birth, school, work, death, and resurrection: the life stages and dynamics of transposable element proliferation, *Genes (Basel)*, **10**, 336, doi: 10.3390/genes10050336.
61. Wallau, G. L., Vieira, C., and Loreto, E. L. S. (2018) Genetic exchange in eukaryotes through horizontal transfer: connected by the mobilome, *Mob. DNA*, **9**, 6, doi: 10.1186/s13100-018-0112-9.
62. Jensen, S., Gassama, M. P., and Heidmann, T. (1999) Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing, *Nat. Genet.*, **21**, 209-212, doi: 10.1038/5997.
63. Kordyukova, M., Sokolova, O., Morgunova, V., Ryazansky, S., Akulenko, N., Glukhov, S., and Kalmykova, A. (2020) Nuclear Ccr4-Not mediates the degradation of telomeric and transposon transcripts at chromatin in the *Drosophila* germline, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 141-156, doi: 10.1093/nar/gkz1072.
64. Collart, M. A., and Panasenko, O. O. (2012) The Ccr4-Not complex, *Gene*, **492**, 42-53, doi: 10.1016/j.gene.2011.09.033.
65. Rozhkov, N. V., Hammell, M., and Hannon, G. J. (2013) Multiple roles for Piwi in silencing *Drosophila* transposons, *Genes Dev.*, **27**, 400-412, doi: 10.1101/gad.209767.112.
66. Shpiz, S., Olovnikov, I., Sergeeva, A., Lavrov, S., Abramov, Y., Savitsky, M., and Kalmykova, A. (2011) Mechanism of the piRNA-mediated silencing of *Drosophila* telomeric retrotransposons, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8703-8711, doi: 10.1093/nar/gkr552.
67. Sienski, G., Donertas, D., and Brennecke, J. (2012) Transcriptional silencing of transposons by piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression, *Cell*, **151**, 964-980, doi: 10.1016/j.cell.2012.10.040.
68. Akkouche, A., Mugat, B., Barckmann, B., Varela-Chavez, C., Li, B., Raffel, R., Pelisson, A., and Chambeyron, S. (2017) Piwi is required during *Drosophila* embryogenesis to license dual-strand piRNA clusters for transposon repression in adult ovaries, *Mol. Cell*, **66**, 411-419, doi: 10.1016/j.molcel.2017.03.017.
69. Gunawardane, L. S., Saito, K., Nishida, K. M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M. C. (2007) A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*, *Science*, **315**, 1587-1590, doi: 10.1126/science.1140494.
70. Han, B. W., Wang, W., Li, C., Weng, Z., and Zamore, P. D. (2015) Noncoding RNA. piRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production, *Science*, **348**, 817-821, doi: 10.1126/science.aaa1264.
71. Mohn, F., Handler, D., and Brennecke, J. (2015) Non-coding RNA. piRNA-guided slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phased piRNA biogenesis, *Science*, **348**, 812-817, doi: 10.1126/science.aaa1039.
72. Lewis, S. H., Salmela, H., and Obbard, D. J. (2016) Duplication and diversification of dipteran argonaute genes, and the evolutionary divergence of Piwi and aubergine, *Genome Biol. Evol.*, **8**, 507-518, doi: 10.1093/gbe/evw018.
73. Parhad, S. S., Tu, S., Weng, Z., and Theurkauf, W. E. (2017) Adaptive evolution leads to cross-species incompatibility in the piRNA transposon silencing machinery, *Dev. Cell*, **43**, 60-70 e65, doi: 10.1016/j.devcel.2017.08.012.
74. Vermaak, D., Henikoff, S., and Malik, H. S. (2005) Positive selection drives the evolution of *rhino*, a member of the heterochromatin protein 1 family

- in *Drosophila*, *PLoS Genet.*, **1**, 96-108, doi: 10.1371/journal.pgen.0010009.
75. Savitsky, M., Kwon, D., Georgiev, P., Kalmykova, A., and Gvozdev, V. (2006) Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline, *Genes Dev.*, **20**, 345-354, doi: 10.1101/gad.370206.
 76. Danilevskaya, O. N., Traverse, K. L., Hogan, N. C., DeBaryshe, P. G., and Pardue, M. L. (1999) The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 873-881, doi: 10.1128/MCB.19.1.873.
 77. Maxwell, P. H., Belote, J. M., and Levis, R. W. (2006) Identification of multiple transcription initiation, polyadenylation, and splice sites in the *Drosophila melanogaster* TART family of telomeric retrotransposons, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5498-5507, doi: 10.1093/nar/gkl709.
 78. Radion, E., Ryazansky, S., Akulenko, N., Rozovsky, Y., Kwon, D., Morgunova, V., Olovnikov, I., and Kalmykova, A. (2017) Telomeric retrotransposon *HeT-A* contains a bidirectional promoter that initiates divergent transcription of piRNA precursors in *Drosophila* germline, *J. Mol. Biol.*, **429**, 3280-3289, doi: 10.1016/j.jmb.2016.12.002.
 79. Shpiz, S., Kwon, D., Rozovsky, Y., and Kalmykova, A. (2009) rasiRNA pathway controls antisense expression of *Drosophila* telomeric retrotransposons in the nucleus, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 268-278, doi: 10.1093/nar/gkn960.
 80. Tatsuke, T., Sakashita, K., Masaki, Y., Lee, J. M., Kawaguchi, Y., and Kusakabe, T. (2010) The telomere-specific non-LTR retrotransposons SART1 and TRAS1 are suppressed by Piwi subfamily proteins in the silkworm, *Bombyx mori*, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **15**, 118-133, doi: 10.2478/s11658-009-0038-9.
 81. Radion, E., Morgunova, V., Ryazansky, S., Akulenko, N., Lavrov, S., Abramov, Y., Komarov, P. A., Glukhov, S. I., Olovnikov, I., and Kalmykova, A. (2018) Key role of piRNAs in telomeric chromatin maintenance and telomere nuclear positioning in *Drosophila* germline, *Epigenetics Chromatin*, **11**, 40, doi: 10.1186/s13072-018-0210-4.
 82. Wagner, E., Clement, S. L., and Lykke-Andersen, J. (2007) An unconventional human Ccr4-Caf1 deadenylase complex in nuclear Cajal bodies, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 1686-1695, doi: 10.1128/MCB.01483-06.
 83. Ryazansky, S., Radion, E., Mironova, A., Akulenko, N., Abramov, Y., Morgunova, V., Kordyukova, M. Y., Olovnikov, I., and Kalmykova, A. (2017) Natural variation of piRNA expression affects immunity to transposable elements, *PLoS Genet.*, **13**, e1006731, doi: 10.1371/journal.pgen.1006731.
 84. Maupetit-Mehouas, S., and Vauray, C. (2020) Transposon reactivation in the germline may be useful for both transposons and their host genomes, *Cells*, **9**, 1172, doi: 10.3390/cells9051172.
 85. Dufourt, J., Dennis, C., Boivin, A., Gueguen, N., Theron, E., Goriaux, C., Pouchin, P., Ronsseay, S., Brasset, E., and Vauray, C. (2014) Spatio-temporal requirements for transposable element piRNA-mediated silencing during *Drosophila* oogenesis, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 2512-2524, doi: 10.1093/nar/gkt1184.
 86. Theron, E., Maupetit-Mehouas, S., Pouchin, P., Baudet, L., Brasset, E., and Vauray, C. (2018) The interplay between the Argonaute proteins Piwi and Aub within *Drosophila* germline is critical for oogenesis, piRNA biogenesis and TE silencing, *Nucleic acids Res.*, **46**, 10052-10065, doi: 10.1093/nar/gky695.
 87. Kordyukova, M., Morgunova, V., Olovnikov, I., Komarov, P. A., Mironova, A., Olenkina, O. M., and Kalmykova, A. (2018) Subcellular localization and Egl-mediated transport of telomeric retrotransposon *HeT-A* ribonucleoprotein particles in the *Drosophila* germline and early embryogenesis, *PLoS One*, **13**, e0201787, doi: 10.1371/journal.pone.0201787.
 88. Sokolova, O., Morgunova, V., Sizova, T. V., Komarov, P. A., Olenkina, O. M., Babaev, D. S., Mikhaleva, E. A., Kwon, D. A., Erokhin, M., and Kalmykova, A. (2023) The insulator BEAF32 controls the spatial-temporal expression profile of the telomeric retrotransposon *TART* in the *Drosophila* germline, *Development*, **150**, dev201678, doi: 10.1242/dev.201678.
 89. Zhang, L., Beaucher, M., Cheng, Y., and Rong, Y. S. (2014) Coordination of transposon expression with DNA replication in the targeting of telomeric retrotransposons in *Drosophila*, *EMBO J.*, **33**, 1148-1158, doi: 10.1002/embj.201386940.
 90. Rashkova, S., Karam, S. E., Kellum, R., and Pardue, M. L. (2002) Gag proteins of the two *Drosophila* telomeric retrotransposons are targeted to chromosome ends, *J. Cell Biol.*, **159**, 397-402, doi: 10.1083/jcb.200205039.
 91. Lopez-Panades, E., Gavis, E. R., and Casacuberta, E. (2015) Specific localization of the *Drosophila* telomere transposon proteins and RNAs, give insight in their behavior, control and telomere biology in this organism, *PLoS One*, **10**, e0128573, doi: 10.1371/journal.pone.0128573.
 92. Lepesant, J. M. J., Iampietro, C., Galeota, E., Auge, B., Aguirrenbengoa, M., Merce, C., Chaubet, C., Rocher, V., Haenlin, M., Waltzer, L., Pelizzola, M., and Di Stefano, L. (2020) A dual role of dLsd1 in oogenesis: regulating developmental genes and repressing transposons, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 1206-1224, doi: 10.1093/nar/gkz1142.
 93. Yang, F., Quan, Z., Huang, H., He, M., Liu, X., Cai, T., and Xi, R. (2019) Ovaries absent links dLsd1 to HP1a for local H3K4 demethylation required for heterochromatic gene silencing, *Elife*, **8**, e40806, doi: 10.7554/eLife.40806.
 94. Sienski, G., Batki, J., Senti, K. A., Donertas, D., Tirian, L., Meixner, K., and Brennecke, J. (2015) Silencio/CG9754 connects the Piwi-piRNA complex

- to the cellular heterochromatin machinery, *Genes Dev.*, **29**, 2258-2271, doi: 10.1101/gad.271908.115.
95. Penke, T. J., McKay, D. J., Strahl, B. D., Matera, A. G., and Duronio, R. J. (2016) Direct interrogation of the role of H3K9 in metazoan heterochromatin function, *Genes Dev.*, **30**, 1866-1880, doi: 10.1101/gad.286278.116.
 96. Teo, R. Y. W., Anand, A., Sridhar, V., Okamura, K., and Kai, T. (2018) Heterochromatin protein 1a functions for piRNA biogenesis predominantly from pericentric and telomeric regions in *Drosophila*, *Nat. Commun.*, **9**, 1735, doi: 10.1038/s41467-018-03908-3.
 97. Wang, S. H., and Elgin, S. C. (2011) *Drosophila* Piwi functions downstream of piRNA production mediating a chromatin-based transposon silencing mechanism in female germ line, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 21164-21169, doi: 10.1073/pnas.1107892109.
 98. Savitsky, M., Kravchuk, O., Melnikova, L., and Georgiev, P. (2002) Heterochromatin protein 1 is involved in control of telomere elongation in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 3204-3218, doi: 10.1128/MCB.22.9.3204-3218.2002.
 99. Molaro, A., Falcioni, I., Hodges, E., Aravin, A. A., Marran, K., Rafii, S., McCombie, W. R., Smith, A. D., and Hannon, G. J. (2014) Two waves of de novo methylation during mouse germ cell development, *Genes Dev.*, **28**, 1544-1549, doi: 10.1101/gad.244350.114.
 100. Zoch, A., Auchynnikava, T., Berrens, R. V., Kabayama, Y., Schopp, T., Heep, M., Vasiliauskaite, L., Perez-Rico, Y. A., Cook, A. G., Shkumatava, A., Rappsilber, J., Allshire, R. C., and O'Carroll, D. (2020) SPOCD1 is an essential executor of piRNA-directed *de novo* DNA methylation, *Nature*, **584**, 635-639, doi: 10.1038/s41586-020-2557-5.
 101. Zeng, Y., and Chen, T. (2019) DNA methylation reprogramming during mammalian development, *Genes (Basel)*, **10**, 257, doi: 10.3390/genes10040257.
 102. Shirane, K., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yamaji, M., Satoh, J., Ito, S., Watanabe, A., Hayashi, K., Saitou, M., and Sasaki, H. (2016) Global landscape and regulatory principles of DNA methylation reprogramming for germ cell specification by mouse pluripotent stem cells, *Dev. Cell*, **39**, 87-103, doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.008.
 103. Kohlrausch, F. B., Berteli, T. S., Wang, F., Navarro, P. A., and Keefe, D. L. (2022) Control of LINE-1 expression maintains genome integrity in germline and early embryo development, *Reprod. Sci.*, **29**, 328-340, doi: 10.1007/s43032-021-00461-1.
 104. Akiyama, T., Xin, L., Oda, M., Sharov, A. A., Amano, M., Piao, Y., Cadet, J. S., Dudekula, D. B., Qian, Y., Wang, W., Ko, S. B., and Ko, M. S. (2015) Transient bursts of Zscan4 expression are accompanied by the rapid derepression of heterochromatin in mouse embryonic stem cells, *DNA Res.*, **22**, 307-318, doi: 10.1093/dnares/dsv013.
 105. Dan, J., Rousseau, P., Hardikar, S., Veland, N., Wong, J., Autexier, C., and Chen, T. (2017) Zscan4 inhibits maintenance DNA methylation to facilitate telomere elongation in mouse embryonic stem cells, *Cell Rep.*, **20**, 1936-1949, doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.070.
 106. Zalzman, M., Falco, G., Sharova, L. V., Nishiyama, A., Thomas, M., Lee, S. L., Stagg, C. A., Hoang, H. G., Yang, H. T., Indig, F. E., Wersto, R. P., and Ko, M. S. (2010) Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells, *Nature*, **464**, 858-863, doi: 10.1038/nature08882.
 107. Thool, M., Sundaravadivelu, P. K., Sudhagar, S., and Thummer, R. P. (2022) A comprehensive review on the role of ZSCAN4 in embryonic development, stem cells, and cancer, *Stem Cell Rev. Rep.*, **18**, 2740-2756, doi: 10.1007/s12015-022-10412-1.
 108. Dan, J., Zhou, Z., Wang, F., Wang, H., Guo, R., Keefe, D. L., and Liu, L. (2022) Zscan4 contributes to telomere maintenance in telomerase-deficient late generation mouse ESCs and human ALT cancer cells, *Cells*, **11**, 456, doi: 10.3390/cells11030456.
 109. Peaston, A. E., Evsikov, A. V., Graber, J. H., de Vries, W. N., Holbrook, A. E., Solter, D., and Knowles, B. B. (2004) Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos, *Dev. Cell.*, **7**, 597-606, doi: 10.1016/j.devcel.2004.09.004.
 110. Kigami, D., Minami, N., Takayama, H., and Imai, H. (2003) MuERV-L is one of the earliest transcribed genes in mouse one-cell embryos, *Biol. Reprod.*, **68**, 651-654, doi: 10.1095/biolreprod.102.007906.
 111. Fadloun, A., Le Gras, S., Jost, B., Ziegler-Birling, C., Takahashi, H., Gorab, E., Carninci, P., and Torres-Padilla, M. E. (2013) Chromatin signatures and retrotransposon profiling in mouse embryos reveal regulation of LINE-1 by RNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 332-338, doi: 10.1038/nsmb.2495.
 112. Eckersley-Maslin, M. A., Svensson, V., Krueger, C., Stubbs, T. M., Giehr, P., Krueger, F., Miragaia, R. J., Kyriakopoulos, C., Berrens, R. V., Milagre, I., Walter, J., Teichmann, S. A., and Reik, W. (2016) MERVL/Zscan4 network activation results in transient genome-wide DNA demethylation of mESCs, *Cell Rep.*, **17**, 179-192, doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.087.
 113. Wang, F., Chamani, I. J., Luo, D., Chan, K., Navarro, P. A., and Keefe, D. L. (2021) Inhibition of LINE-1 retrotransposition represses telomere reprogramming during mouse 2-cell embryo development, *J. Assist. Reprod. Genet.*, **38**, 3145-3153, doi: 10.1007/s10815-021-02331-w.
 114. Percharde, M., Lin, C. J., Yin, Y., Guan, J., Peixoto, G. A., Bulut-Karslioglu, A., Biechele, S., Huang, B., Shen, X., and Ramalho-Santos, M. (2018) A LINE1-nucleolin partnership regulates early development and ESC identity, *Cell*, **174**, 391-405, doi: 10.1016/j.cell.2018.05.043.
 115. Macfarlan, T. S., Gifford, W. D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H. M., Bonanomi, D., Firth, A.,

- Singer, O., Trono, D., and Pfaff, S. L. (2012) Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity, *Nature*, **487**, 57-63, doi: 10.1038/nature11244.
116. Ghosh, S., and Zhou, Z. (2014) Genetics of aging, progeria and lamin disorders, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **26**, 41-46, doi: 10.1016/j.gde.2014.05.003.
117. Gorbunova, V., Seluanov, A., Mita, P., McKerrow, W., Fenyo, D., Boeke, J. D., Linker, S. B., Gage, F. H., Kreiling, J. A., Petrashen, A. P., Woodham, T. A., Taylor, J. R., Helfand, S. L., and Sedivy, J. M. (2021) The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases, *Nature*, **596**, 43-53, doi: 10.1038/s41586-021-03542-y.
118. Aschacher, T., Wolf, B., Enzmann, F., Kienzl, P., Messner, B., Sampl, S., Svoboda, M., Mechtcheriakova, D., Holzmann, K., and Bergmann, M. (2016) LINE-1 induces hTERT and ensures telomere maintenance in tumour cell lines, *Oncogene*, **35**, 94-104, doi: 10.1038/onc.2015.65.
119. Aschacher, T., Wolf, B., Aschacher, O., Enzmann, F., Laszlo, V., Messner, B., Turkcan, A., Weis, S., Spiegel-Kreinecker, S., Holzmann, K., Laufer, G., Ehrlich, M., and Bergmann, M. (2020) Long interspersed element-1 ribonucleoprotein particles protect telomeric ends in alternative lengthening of telomeres dependent cells, *Neoplasia*, **22**, 61-75, doi: 10.1016/j.neo.2019.11.002.
120. Cosby, R. L., Chang, N. C., and Feschotte, C. (2019) Host-transposon interactions: conflict, cooperation, and cooption, *Genes Dev.*, **33**, 1098-1116, doi: 10.1101/gad.327312.119.
121. Charlesworth, B., and Langley, C. H. (1989) The population genetics of *Drosophila* transposable elements, *Annu. Rev. Genet.*, **23**, 251-287, doi: 10.1146/annurev.ge.23.120189.001343.
122. Kelleher, E. S., and Barbash, D. A. (2013) Analysis of piRNA-mediated silencing of active TEs in *Drosophila melanogaster* suggests limits on the evolution of host genome defense, *Mol. Biol. Evol.*, **30**, 1816-1829, doi: 10.1093/molbev/mst081.

RETROTRANSPOSONS AND TELOMERES

Review

A. I. Kalmykova* and O. A. Sokolova

*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; e-mail: allakalm@idbras.ru*

Transposable elements (TEs) comprise a significant part of eukaryotic genomes being a major source of genome instability and mutagenesis. Cellular defense systems suppress the TE expansion at all stages of their life cycle. Piwi proteins and Piwi-interacting RNAs (piRNAs) are key elements of the anti-transposon defense system, which control TE activity in metazoan gonads preventing inheritable transpositions and developmental defects. In this review, we discuss various regulatory mechanisms by which small RNAs combat TE activity. However, active transposons persist, suggesting these powerful anti-transposon defense mechanisms have a limited capacity. A growing body of evidence suggests that increased TE activity coincides with genome reprogramming and telomere lengthening in different species. In the *Drosophila* fruit fly, whose telomeres consist only of retrotransposons, a piRNA-mediated mechanism is required for telomere maintenance and their length control. Therefore, the efficacy of protective mechanisms must be finely balanced in order not only to suppress the activity of transposons, but also to maintain the proper length and stability of telomeres. Structural and functional relationship between the telomere homeostasis and LINE1 retrotransposon in human cells indicates a close link between selfish TEs and the vital structure of the genome, telomeres. This relationship, which permits the retention of active TEs in the genome, is reportedly a legacy of the retrotransposon origin of telomeres. The maintenance of telomeres and the execution of other crucial roles that TEs acquired during the process of their domestication in the genome serve as a type of payment for such a "service."

Keywords: retrotransposons, telomeres, telomerase, polyploidy, Piwi, piRNA, germline, chromatin, LINE1, *Drosophila*

МОБИЛЬНЫЕ И НЕМОБИЛЬНЫЕ: МНОГООБРАЗИЕ ОБРАТНЫХ ТРАНСКРИПТАЗ И ИХ РЕКРУТИРОВАНИЕ ГЕНОМ О ХОЗЯИНА

Обзор

© 2023 И.Р. Архипова*, И.А. Юшенова

*Josephine Bay Paul Center for Comparative Molecular Biology and Evolution, Marine Biological Laboratory,
Woods Hole, MA 02543 USA; e-mail: iarkhipova@mbl.edu, iyushenova@mbl.edu*

Поступила в редакцию 13.09.2023

После доработки 18.09.2023

Принята к публикации 20.09.2023

Обратные транскриптазы (reverse transcriptase, RT), или РНК-зависимые ДНК-полимеразы — это необычные ферменты, которые впервые дали возможность пересмотреть общепринятое представление об одностороннем потоке генетической информации в клетке от ДНК к РНК и белку. RT были впервые обнаружены в ретровирусах позвоночных, а впоследствии — повторно обнаружены у большинства эукариот, бактерий и архей (что, по сути, охватывает все надцарства живых организмов). В ретровирусах RT обеспечивают возможность копировать РНК-геном в ДНК для последующего включения в геном хозяина, что важно для репликации и выживания. В клеточных организмах большинство последовательностей RT происходит от ретротранспозонов — типа самореплицирующихся генетических элементов, которые полагаются на обратную транскрипцию для копирования и вставки своих последовательностей в новые места генома. Однако некоторые ретроэлементы могут быть «одомашнены» и в конечном итоге стать ценным дополнением к общему репертуару клеточных ферментов. Они могут быть полезными и при этом либо вспомогательными — например, как элементы, генерирующие разнообразие (diversity-generating elements) — либо даже незаменимыми, как теломеразные RT. В настоящее время обнаруживают всё большее количество «одомашненных» генетических элементов, несущих гены RT. Можно утверждать, что «одомашненные» RT и обратная транскрипция в целом более широко распространены в клеточных организмах, чем считалось ранее, и что многие важные клеточные функции, такие как поддержание стабильности концов хромосом, могли возникнуть из изначально «эгоистичного» процесса преобразования РНК в ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: обратная транскрипция, РНК-зависимая ДНК-полимераза, теломеразная обратная транскриптаза.

DOI: 10.31857/S0320972523110088, **EDN:** MLIDVY

ВВЕДЕНИЕ

На заре молекулярной биологии, когда ещё мало что было известно о молекулярной природе биологических явлений, авторы многочисленных теоретических работ пытались предвидеть будущие открытия и обоснованно предсказать молекулярные механизмы, объясняющие фундаментальные генетические принципы. Примечательно, что лишь относительно малая часть таких работ выдержала испытание временем и экспериментальную проверку, последовавшую в предстоящие годы. Среди

таких дальновидных работ заслуженное место занимает теоретическое предсказание Алексея Оловникова о недорепликации концов ДНК в линейных хромосомах и существовании специализированного фермента, способного решить эту проблему [1, 2]. Хотя одновременно открытие проблемы репликации концов ДНК было также сделано в статье Джеймса Уотсона [3], внимание в ней было уделено в основном фаговой ДНК, не указывалось на необходимость специализированной полимеразы, а вместо этого акцент был смещён на нуклеазы, процессирующие концы ДНК.

Принятые сокращения: RT — reverse transcriptase, обратная транскриптаза.

* Адресат для корреспонденции.

За открытие теломеразы — специализированной полимеразы, которая может добавлять простые повторяющиеся последовательности к концам линейных хромосом, чтобы компенсировать потерю концевой ДНК после каждого цикла репликации — была присуждена Нобелевская премия, но путь к нему был долгим и непростым. В первоначальном сообщении Грейдер и Блэкберн найденный в *Tetrahymena* фермент обозначался как концевая трансфераза [4], поскольку его обнаруженная активность заключалась в добавлении tandemных повторов к теломерным праймерам без очевидной матрицы. Однако впоследствии соответствующая матричная РНК была выявлена как неотъемлемый компонент рибонуклеопротеинового холофермента, что послужило экспериментальным доказательством РНК-зависимого синтеза ДНК [5], хотя по-прежнему считалось, что классифицировать теломеразный фермент как настоящую обратную транскриптазу преждевременно.

Процесс синтеза ДНК с использованием РНК в качестве матрицы в целом обозначается термином «обратная транскрипция», а соответствующий фермент, способный осуществлять эту реакцию, носит название «обратная транскриптаза» (reverse transcriptase, RT), также известная как «ревертаза» в русскоязычной литературе. Его экспериментальному открытию Теминым и Балтимором более 50 лет назад [6, 7] (которое также было отмечено Нобелевской премией) аналогичным образом предшествовала концепция синтеза ДНК на матрице вирусной ДНК Говарда Темина, известная как «гипотеза провируса» [8]. Мало кто догадывался, что, помимо открытия обратного потока генетической информации от вирусной РНК к ДНК, этой гипотезой также были созданы предпосылки для открытия самореплицирующихся подвижных генетических элементов и для последующего осознания того, что некоторые дополнительные или даже незаменимые функции клетки-хозяина

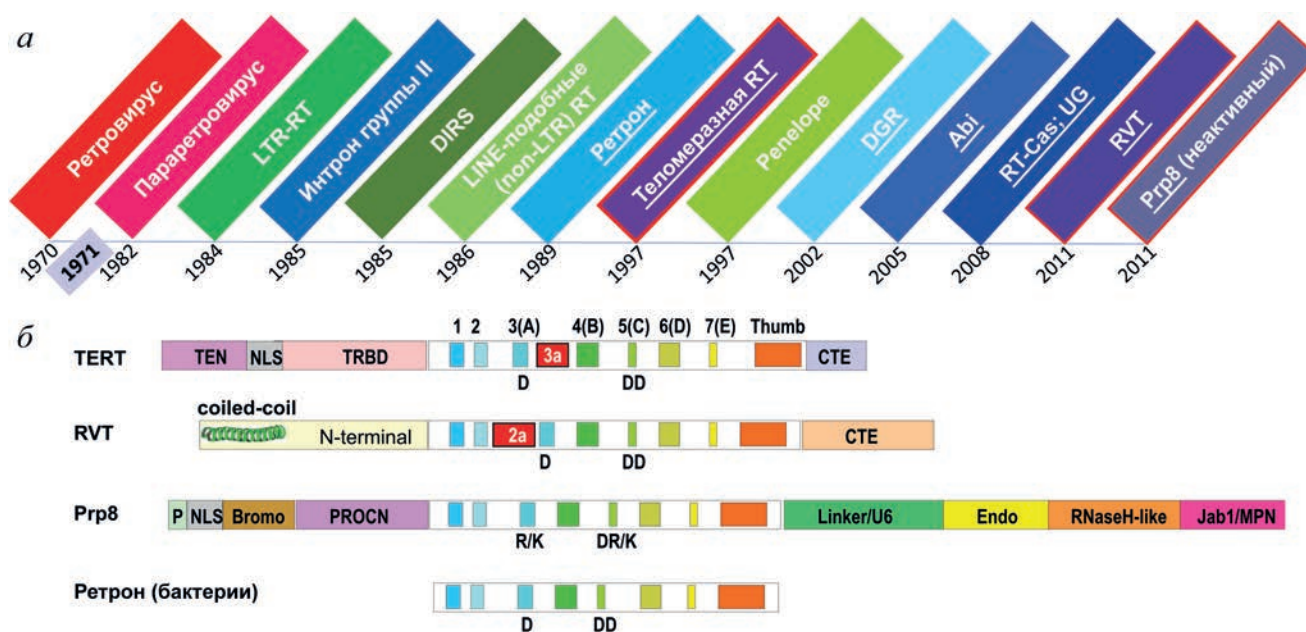


Рис. 1. Основные типы обратных транскриптаз (RT) из трёх надцарств живых организмов. *a* — Хронология открытия RT. Основные типы RT, описанные в тексте, показаны следующими цветами: вирусные RT — оттенки красного; RT эукариотических мобильных элементов — оттенки зелёного; прокариотические RT — оттенки синего; «одомашненные» эукариотические RT — оттенки фиолетового. «Одомашненные» RT подчеркнуты. Годы соответствуют первым сообщениям о выявлении гомологии с каталитическим ядром RT. В 1971 г. впервые была обозначена проблема неполной репликации концов хромосом [1]. *б* — Примеры структурной организации «одомашненных» эукариотических RT. Бактериальные ретроны включены для сравнения. Расположенное в центре каталитическое ядро RT представлено семью консервативными мотивами, разделёнными спейсерами переменной длины с характерными длинными петлями 2a и 3a (также называемая IFD), которые отмечены красным. Указаны аминокислотные остатки каталитической триады D..DD и их некаталитические замены. Дополнительные домены по обе стороны от ядра RT и «большого пальца»: TEN — незаменимый N-концевой домен теломеразы (telomerase essential N-terminal domain); TRBD — теломеразный РНК-связывающий домен (telomerase RNA binding domain); CTE — C-концевое удлинение (C-terminal extension); P — полипролиновый участок (polyproline stretch); NLS — сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal); Bromo — бромодомен; PROCN — центральный домен PRO8 (PRO8 central domain); Endo — эндонуклеазоподобный домен (endonuclease-like); Jab1/MPN — предполагаемый деубиквитиназоподобный домен. Масштаб приблизительный. Доменная структура представлена по различным литературным источникам [55, 57, 59].

могут взять на себя потомки таких мобильных элементов. Примечательно, что RT были обнаружены примерно в то же время, когда была впервые выявлена проблема неполной репликации концов хромосом (рис. 1).

РАЗВИТИЕ ПОДХОДОВ К ВЫЯВЛЕНИЮ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ

С момента открытия RT в ретровирусах представление об их разнообразии необычайно расширилось: от представления о них как о чисто вирусных компонентах до открытия их удивительно разнообразных структурных и функциональных ролей у эукариотических и прокариотических хозяев (рис. 1, *a*). Ранние достижения в области вирусологии привели к дальнейшему открытию обратной транскрипции в репликативных циклах гепаднавирусов и каулимовирусов (совместно названных параретровирусами [9]) — этому способствовала доступность методов выделения вирусов и биохимического анализа RT. Вскоре после этого перспективы новых открытий сместились к обнаружению гомологии последовательностей. Этот процесс ускорило появление технологий секвенирования и знаковое открытие общих мотивов аминокислотных последовательностей в каталитическом ядре ДНК-полимераз вирусов, осуществляющих обратную транскрипцию [10]. Вскоре после этого неотъемлемой частью идентификации новых RT стал поиск остатков аспартата, образующих каталитическую триаду D..DD в активном центре RT. На представленной временной шкале изучения RT (рис. 1, *a*) основополагающим работам, в которых были впервые выявлены характерные остатки RT, был присвоен приоритет по сравнению с теми, в которых сообщалось о первоначальном биохимическом обнаружении РНК-зависимой полимеризации ДНК. Это связано с тем, что полноценное экспериментальное подтверждение активности RT непременно должно включать в себя сайт-направленный мутагенез остатков активного центра, присутствующих в двух из семи консервативных мотивов, формирующих каталитическое ядро RT (рис. 1, *b*).

Первая половина временной шкалы, до 1990-х гг., представлена в основном открытиями RT в различных типах вирусов и мобильных генетических элементах. Действительно, мульткопийные мобильные элементы были одними из первых компонентов эукариотических геномов, клонированных на молекулярном уровне [11, 12], наряду с другими ак-

тивно транскрибируемыми мульткопийными генами, такими как повторяющиеся единицы рибосомальной ДНК или кластеры генов гистонов [13, 14]. Общее структурное сходство LTR-ретротранспозонов и ретровирусов сразу же стало очевидным при их клонировании из дрожжи и дрожжей [15]. Однако окончательное доказательство их близкого родства с ретровирусами было получено в результате анализа их полных нуклеотидных последовательностей, выявившего их способность кодировать фермент RT [16, 17]. Более того, характерные участки гомологии с консервативными мотивами RT вскоре были идентифицированы не только в ретровирусоподобных мобильных элементах, но также и в мобильных интронах митохондрий грибов II группы и других типах мульткопийных эукариотических транспозонов, таких как DIRS и LINE-подобные ретро-транспозоны [18–21]. В конце первых двух десятилетий изучения RT появились первые сообщения об их существовании у бактерий в форме ретронов, мульткопийных внехромосомных химерных молекул ДНК–РНК, связанных через точку ветвления 2'-5' [22, 23].

На следующем этапе в истории открытий новых RT исследователи по-прежнему опирались на обнаружение гомологии последовательностей, но преимущественно обнаруживались RT, присутствующие в меньшем количестве копий, и большинство из них не относилось к мобильным элементам, а представляло собой однокопийные гены клетки-хозяина (рис. 1, *a*, подчёркнуто). Фактически известный на данный момент спектр эукариотических ретро-транспозонов не расширялся с момента открытия *Penelope*-подобных ретро-элементов (*Penelope-like elements*, PLE) [24]. Первый и наиболее известный случай «одомашнивания» RT у эукариот был выявлен после доказательства того, что подлинную RT представляет собой теломераза. Проведение связи между активностью RT и соответствующим ферментом потребовало много сил и времени, в течение которого происходили и ошибочные определения [25]. Окончательного успеха в определении каталитической субъединицы теломеразы как RT удалось достичь благодаря выявлению консервативных мотивов в домене «пальцев» и «ладони» RT, что подтвердила потеря активности ферментом при направленном мутагенезе трёх инвариантных каталитических остатков аспартата [26]. Таким образом, было обнаружено, что однокопийный ген RT, присутствующий почти у всех видов эукариот, отвечает за важную функцию клетки-хозяина по удлинению концов линейных хромосом

для противодействия потере концевой ДНК из-за недорепликации, или маргинотомии, как этот процесс был исходно назван Оловниковым [27]. В настоящее время новые типы RT выявляются в основном с помощью компьютерного поиска с использованием обширных геномных и метагеномных данных. В следующих разделах мы кратко охарактеризуем RT, принадлежащие к мобильным генетическим элементам, и сравним их с «одомашненными» и, соответственно, немобильными элементами.

ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ: РЕТРОВИРУСЫ, ПАРАРЕТРОВИРУСЫ, РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ

Чтобы понять и сравнить свойства вирусных и мобильных RT, необходимо рассмотреть архитектуру консервативных доменов, кото-

рые встречаются вместе с RT, а также состав соседних генов внутри мобилизуемой единицы (рис. 2). Интересно, что **ретровирусы**, обнаружение которых открыло эру изучения RT, оказались поразительно похожими на **LTR-ретротранспозоны**, открытые более десяти лет позже, по составу генов, организации и циклу репликации, что указывает на общее эволюционное происхождение [16, 17, 28]. RT **гепаднавирусов** можно в целом отнести к основанию вирусной/LTR-ветви эукариотических RT, в представителях которой содержится С-концевой домен РНКазы Н для обеспечения репликации в цитоплазме, что позволяет не нуждаться в ядерных РНКазах Н хозяина для разрушения РНК в ДНК–РНК-гибриде (рис. 2). Ещё более необычными являются **каулимовирусы**, RT которых сходна с таковой у Metaviridae (также известных как Ty3/mdg4(gypsy)-подобные LTR-ретротранспозоны), так что их происхождение, скорее всего, гибридное –

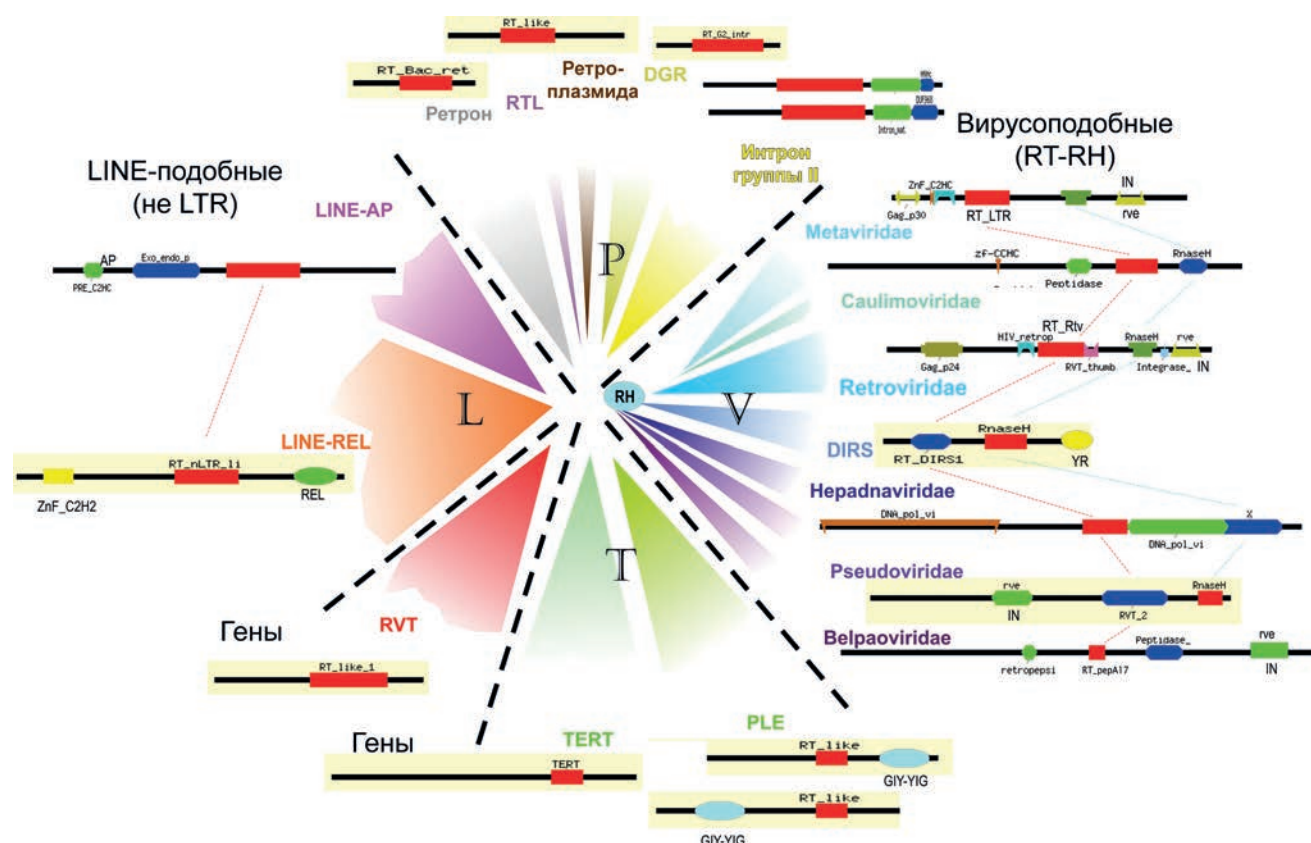


Рис. 2. Доменная архитектура основных типов RT, описанных в тексте. Для каждого типа представлена типичная архитектура, выявленная с помощью CDART (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool) в NCBI [63]. Обозначение домена соответствует базе данных консервативных доменов NCBI (CDD) [64]. Цвета определяются CDART динамически, а не фиксированы для каждого домена; для облегчения отслеживания гомологии домены RT и РНКазы Н (RH) соединены пунктирной линией. Расположенные по кругу элементы соответствуют приведённым в центре филогенетическим группам, взятым из работы Gladyshev et al. [55]. Буквы P, V, T и L соответствуют прокариотическим, вирусноподобным, теломеразоподобным и LINE-подобным ретрозелементам; гены *rvt* образуют отдельную группу, пока не имеющую обозначения. Мобильные элементы содержат шесть различных типов ассоциированных нуклеаз/фосфотрансфераз, упомянутых в тексте: IN, AP, REL, YR, GIY-YIG, HNH. Вирусноподобные элементы названы согласно классификации ICTV [29]. «Одомашненные» эукариотические RT (TERT, RVT) обозначены как «Гены»

в результате захвата RT ДНК-вирусом [29]. Ty1/*copi*a-подобные LTR-ретротранспозоны (Pseudoviridae) соответствуют общей структуре LTR, но имеют другой порядок доменов. Все ретровирусоподобные элементы, входящие в таксономический порядок Ortervirales (Retroviridae, Metaviridae, Pseudoviridae и Belraoviridae) [29], мобилизуются с помощью интегразы (integrase, IN), которая отвечает за встраивание копии кДНК в новые участки хромосом. Отдельная группа элементов под названием **DIRS** мобилизуется с помощью тирозинрекомбиназы (YR) вместо IN.

Ретротранспозоны подкласса LINE (также известные как non-LTR) мобилизуются без образования цитоплазматической промежуточной кДНК: их RT использует механизм обратной транскрипции, праймируемой в сайте интеграции (target-primed reverse transcription, TPRT) для синтеза кДНК непосредственно на сайте интеграции в хромосому, который разрезается одним из двух различных типов ассоциированных эндонуклеаз (EN) — AP-подобной или REL-подобной. Наконец, RT **Penelope-подобных элементов (PLE)** используют для мобилизации ещё один тип EN (GIY-YIG), в результате чего количество типов эндонуклеаз, связанных с ретротранспозонами эукариот, достигает пяти. Более подробное свежее описание механизмов ретромобильности можно найти в обзоре Paul et al. [30].

ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ: ИНТРОНЫ ГРУППЫ II, РЕТРОПЛАЗМИДЫ

Интроны группы II (G2I) представляют собой самосплайсинговые ретроэлементы, обнаруженные у бактерий, некоторых архей и органелл эукариот [31]. Они были впервые найдены в митохондриях грибов и, как было показано, обладают такой же структурной организацией у бактерий и архей и часто рассматриваются в качестве эволюционных предшественников эукариотических сплайсосомных интронов. Их ретромобильность обеспечивается совместным действием каталитически активной РНК, выполняющей функцию рибозима в реакциях самосплайсинга и обратного сплайсинга, а также кодируемой интроном RT, которая синтезирует кДНК-копию интронной РНК в сайте-мишени с использованием механизма TPRT.

Ретроплазмиды были обнаружены в митохондриях грибов [32] и долгое время служили

модельной системой для изучения нестандартных способов праймирования обратными транскриптазами (белковое праймирование, в процессе которого RT использует в качестве праймера гидроксильную группу остатка тирозина или серина, или инициация *de novo*, при которой вообще не используется праймер). Их распространение всё же весьма ограничено, поскольку они присутствуют лишь в нескольких десятках видов грибов среди сотен секвенированных грибных геномов. Ожидается, что, будучи внехромосомными образованиями, они не подвергаются интеграции, но формально составляют часть мобилома благодаря способности реплицироваться автономно.

НЕМОБИЛЬНЫЕ РЕТРОЭЛЕМЕНТЫ В БАКТЕРИЯХ И АРХЕЯХ: РЕТРОНЫ, DGR, Abi/UG, Cas-АССОЦИИРОВАННЫЕ, G2I-ПОДОБНЫЕ

Ретроны представляют собой своеобразные «одомашненные» бактериальные элементы, состоящие из ковалентно связанной РНК и мультикопийной одноцепочечной ДНК (оцДНК) в одной разветвлённой молекуле, соединённой 2'-5'-фосфодиэфирными связями [22, 23]. Каждый отдельный участок ретрона кодирует последовательность белка RT, некодирующую РНК, которая подвергается обратной транскрипции с помощью RT с образованием химерных одноцепочечных молекул ДНК/РНК, а также эффекторный ген, необходимый для антифаговой активности. Несмотря на то, что ретроны были первыми прокариотическими немобильными ретроэлементами, открытыми более 30 лет назад, их клеточная функция была выяснена только в 2020 г. [33–35]. Ретроны обеспечивают защиту хозяина от широкого спектра фагов посредством abortивной инфекции и последующей гибели клеток. Они широко распространены у бактерий, являясь одним из основных компонентов бактериальной иммунной системы. Однако точные механизмы, посредством которых они дают бактериям устойчивость к фагам за счёт обратной транскрипции, до сих пор неизвестны. Появление RT в трёхчастных модулях вместе с матрицей РНК и множеством предполагаемых эффекторных генов предполагает их прямое взаимодействие в индукции антифагового ответа [36]. Действительно, такое взаимодействие наблюдалось в комплексе RT, родственной ей оцДНК и связанной эффекторной нуклеозиддезоксирибозилтрансферазы [37].

Ретроэлементы, генерирующие разнообразие (diversity-generating retroelements, DGR), представляют собой немобильные RT, которые модифицируют соседние с ними последовательности ДНК у бактерий, архей и вирусов [38, 39]. Несмотря на то что DGR не являются жизненно необходимыми ретроэлементами, они тем не менее полезны для своих хозяев. В наиболее детально описанной модельной системе DGR создают разнообразие в С-концевой вариабельной области генамишени (*mtd*), кодирующего белок бактериофага BPP-1 *Bordetella pertussis*. Возникающая в результате этого гипервариабельность белка хвоста фага — области, которая контактирует с бактериальной клеткой во время инфекции — позволяет фагу инфицировать бактериальные клетки с изменёнными рецепторами на поверхности. Используя подверженную ошибкам обратную транскрипцию, DGR помогают увеличить разнообразие продуктов генов, особенно тех, которые участвуют в связывании лигандов и прикреплении к клетке-хозяину. До сих пор остаётся загадкой то, как достигается адениновая специфичность целенаправленного гипермутагенеза. Более того, проверка соседних генов в модулях DGR позволяет предположить, что гипервариабельность может не ограничиваться переключением тропизма и поверхностным дисплеем [40, 41].

Системы abortивной инфекции (abortive infection systems, Abi), представленные AbiA, AbiK и Abi-P2, представляют собой бактериальные ретроэлементы, служащие для защиты определённых бактерий от фаговых инфекций. Эти гены обнаружены только в геномах некоторых бацилл (в основном у *Lactococcus lactis*), где в основном кодируются плазмидами (AbiA и AbiK), а также в P2-подобных профагах в *Escherichia coli* (Abi-P2). Хотя подробный механизм их действия до сих пор неизвестен, ясно, что белки Abi необходимы для блокирования репликации фагов с последующей запрограммированной гибелью клеток или удалением фага [42, 43]. Интересно, что белок AbiK, как было показано, осуществляет нематричную полимеризацию ДНК *in vitro* и ковалентно присоединяется к ДНК, что указывает на белковое праймирование [44]. Таким образом, Abi представляют собой ещё один (помимо ретронов) тип активных RT, который даёт преимущество субпопуляции бактерий при атаке фагами. Следует отметить, что RT AbiP2 и AbiK отличаются исключительной возможностью образовывать компактные тримеры или гексамеры в растворе, а также отсутствием RT-домена «большого пальца», который

заменён α -спиральным доменом, состоящим из повторов HEAT [45, 46]. Для значительной части так называемых неизвестных групп RT (unknown groups, UG) [47], некоторые из которых были независимо названы DRT (защитные RT) [33], в более ранних исследованиях указывалось, что их невозможно отнести к конкретному типу RT, но позже было обнаружено, что они родственны RT Abi и играют роль в антифаговой защите, находясь в так называемых защитных островках, которые содержат множество других генов, обеспечивающих защиту от вторжения чужеродной ДНК [33, 45].

RT-Cas: домены RT были обнаружены рядом с CRISPR-ассоциированными генами или даже слиты с белками Cas [48–50]. Потенциально эти RT могут обеспечивать бактериальный иммунитет, выполняя синтез кДНК на РНК из бактериофагов, и действительно, было показано, что они опосредуют наследуемое приобретение коротких последовательностей (спейсеров) из чужеродных РНК-элементов [51]. Слияние с белками Cas не является необходимым, хотя и способствует более эффективной кооперации взаимодействующих доменов [52]. Эти RT не являются монофилетическими, поскольку включены в системы CRISPR-Cas из нескольких бактериальных линий RT [50].

Интроноподобные RT группы II — гетерогенная группа немобильных RT, последовательности которых имеют сходство с таковыми G2I, но лишены рибозимного компонента — были впервые описаны в работе Simon et al. [48]. Недавно было обнаружено, что RT G2L из *Pseudomonas aeruginosa* (RT G2L4) участвует в транслезионном синтезе ДНК и репарации двухцепочечных разрывов посредством микрогомологичного соединения концов (microhomology-mediated end-joining, MMEJ) [53]. Интересно, что замена YADD на YIDD в активном центре RT G2L4 ответственна за сдвиг в сторону выполнения MMEJ вместо удлинения праймера, что характерно для каноничных RT G2I с YADD в каталитическом центре. Тем не менее каноничная RT G2I также была способна выполнять репарацию ДНК.

НЕМОБИЛЬНЫЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ RT И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ: ТЕЛОМЕРАЗА, RVT, Prp8

Теломеразная обратная транскриптаза (TERT, telomerase reverse transcriptase), описанная выше, несомненно, является наиболее

известной RT с ключевой клеточной функцией. За счёт своей главной функции поддержания длины линейных хромосом она играет хорошо описанную роль в старении, развитии рака и других заболеваний человека (апластическая анемия, синдром кошачьего крика, врождённый дискератоз и т.д.). Разрабатываются многочисленные методы фармацевтического воздействия на активную теломеразу и связанную с ней матрицу РНК TERT в контексте противораковой терапии и лечения возрастных заболеваний (недавний обзор приведён в работе Fragkiadaki et al. [54]).

Гены, родственные обратной транскриптазе (reverse transcriptase-related genes, *rvt*), представляют собой последний обнаруженный тип «одомашненных» эукариотических RT, широко распространённый у грибов и иногда встречающийся у отдельных растений, простейших и беспозвоночных [55]. Поразительно, что эти гены присутствуют как у прокариот, так и у эукариот, в отличие от всех других типов RT. Примечательно, что RVT изо всех типов бактерий образуют монофилетическую группу, что позволяет предположить, что они не были переданы горизонтально от эукариот, как изначально предполагалось, но, возможно, присутствовали в бактериях до эукариогенеза [56]. Гены *rvt* кодируют активные RT-подобные белки, которые у грибов могут полимеризовать как dNTP, так и NTP. Белки RVT также способны к белковому праймированию. Хотя биологическая функция генов *rvt* ещё не полностью изучена, они явно сохраняются в результате естественного отбора, что указывает на их важность для клеток-хозяев. Эти гены сильно активируются при аминокислотном голодании и применении некоторых антибиотиков у грибов, что позволяет предположить их участие в ответе на такие агенты [55].

Фактор процессинга пре-мРНК 8 (pre-mRNA-processing factor 8, Prp8) представляет собой необычное «одомашненное» производное RT, которое потеряло два из трёх каталитических остатков аспартата, в результате чего утратило способность полимеризовать нуклеотиды [57]. Тем не менее Prp8 является важной частью эукариотической сплайсосомы, регулирующей её сборку и конформацию во время сплайсинга пре-мРНК [58]. Было высказано предположение, что RT-фрагмент Prp8 происходит от мобильных интронов группы II [59]. Это даёт нам ещё один пример того, как в ходе эволюции «эгоистичные» ретротранспозоны могут давать начало важным компонентам эукариотических клеток, в данном случае в качестве структурного элемента,

который включает в себе центральную часть крупного мультидоменного белка, связывающую U5-мРНК (рис. 1, б). Отсутствие каталитических остатков и очень высокая консервативность последовательностей, обусловленная эволюционными ограничениями, налагаемыми функцией сплайсосомы, препятствуют однозначному филогенетическому размещению этого RT-производного домена, но его происхождение, несомненно, восходит к последнему общему предку всех эукариот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из приведённых выше описаний RT легко заключить, что те из них, которые принадлежат к типам, открытым в более ранние годы, как правило, обнаруживались у многочисленных организмов с большим количеством копий RT. Вначале это были вирусы, а затем клеточные многокопийные мобильные генетические элементы: у эукариот — LTR, DIRS и LINE-подобные ретротранспозоны, у прокариот — мобильные интроны группы II и ретроплазмиды, а также ретроны, продуцирующие многочисленные разветвлённые молекулы ДНК–РНК в бактериальных клетках. Ретромобильность обычно обеспечивается определённым типом эндонуклеазы, связанной с каждым мобильным элементом и дающей возможность осуществлять внутривнутрихромосомную вставку копии кДНК. На начальных этапах многие эукариотические мобильные элементы были выявлены по своей способности вызывать инсерционные мутации с видимыми фенотипами в штаммах, где происходит транспозиция мультикопийных элементов [60]. Сейчас очевидно, что RT могут выполнять широкий спектр функций, помимо роли в распространении «эгоистичных» генетических элементов. Мы утверждаем, что многообразие «одомашненных» RT было сильно занижено, а их роль существенно недооценена, и существует множество возможностей рекрутирования RT клетками-хозяевами, несмотря на то, что в целом они не являются незаменимыми и распределены неравномерно. Неудивительно, что иногда от первоначальной идентификации того или иного элемента до правильного определения его функции в клетке-хозяине может пройти много времени, вплоть до десятилетий, если он даёт хозяину селективное преимущество лишь в определённых условиях. Теломеразная RT, кодируемая геном с одной копией, представляет собой существенное исключение, поскольку она практически повсеместно при-

сутствует в эукариотах, и открытие того факта, что она кодирует специализированную RT, т.е. фермент, который ранее считался характерным лишь для вирусов и мобильных элементов, произвело настоящую революцию в данной области исследований [26]. Тем не менее даже критически важная функция поддержания стабильности теломер может поддерживаться за счёт независимых запасных путей [61].

Стоит подчеркнуть, что «приручение» RT у эукариот неразрывно связано с появлением дополнительных функциональных доменов, которые предотвращают произвольный синтез ею кДНК с использованием случайных комбинаций праймер/матрица. В целом, не ожидается, что синтез копий кДНК на случайных матрицах РНК клетки-хозяина принесёт ей пользу, и этот процесс следует предотвращать. Самый простой способ это сделать — устранить каталитическую активность путём замены остатков активного центра, как в случае Prp8. Другой вариант — изменить конфигурацию активного центра за счёт вставки дополнительных структурных петель, как в генах *rvf*. Наконец, TERT достигли строгой субстратной специфичности благодаря высокой степени специализации в отношении несвязанной высокоструктурированной РНК (называемой TERC или TR), которая содержит короткий обратный комплемент теломерной повторяющейся единицы, служащей матрицей, и специфически взаимодействует с доменом TRBD, выполняя высокопроцессивный синтез ДНК по механизму обратной транскрипции, праймируемой в сайте интеграции (target-primed

reverse transcription, TPRT) с 3'-концов экспонированных коротких G-богатых tandemных повторов на концах линейных хромосом [62]. Трудно не удивляться тому, что специализированный фермент, для которого Оловниковым была предсказана способность решать проблему утраты концевой ДНК и сохранять целостность хромосом, происходит от мобильных элементов, изначально предназначенных для нарушения стабильности хромосом.

Вклад авторов. И.Р. Архипова, И.А. Юшенова — концепция, написание и редактирование текста статьи; рисунки были адаптированы И.А. из своей презентации на конференции 2022 г. «Пятьдесят лет обратной транскриптазы» (Cold Spring Harbor, “Fifty Years of Reverse Transcriptase”).

Благодарности. Работа посвящена памяти Алексея Оловникова и заменяет собой запланированную ранее личную беседу, которая должна была произойти в Москве, но так и не состоялась.

Финансирование. Лабораторные исследования поддержаны грантами Национального института здравоохранения США (И.А., R01GM111917) и Национального научного фонда США (И.А. и И.Ю. — MCB-2139001, MCB-2326038).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описаний каких-либо исследований с участием людей или использованием животных, выполненных авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olovnikov, A. M. (1971) Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides [in Russian], *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **201**, 1496-1499.
2. Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon, *J. Theor. Biol.*, **41**, 181-190, doi: 10.1016/0022-5193(73)90198-7.
3. Watson, J. D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA, *Nat. New Biol.*, **239**, 197-201, doi: 10.1038/newbio239197a0.
4. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts, *Cell*, **43**, 405-413, doi: 10.1016/0092-8674(85)90170-9.
5. Greider, C. W., and Blackburn, E. H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis, *Nature*, **337**, 331-337, doi: 10.1038/337331a0.
6. Temin, H. M., and Mizutani, S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, *Nature*, **226**, 1211-1213, doi: 10.1038/2261211a0.
7. Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses, *Nature*, **226**, 1209-1211, doi: 10.1038/2261209a0.
8. Temin, H. M. (1964) Nature of the provirus of Rous sarcoma, *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, **17**, 557-570.
9. Temin, H. M. (1985) Reverse transcription in the eukaryotic genome: retroviruses, pararetroviruses, retrotransposons, and retrotranscripts, *Mol. Biol. Evol.*, **2**, 455-468, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040365.
10. Toh, H., Hayashida, H., and Miyata, T. (1983) Sequence homology between retroviral reverse tran-

- scriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus, *Nature*, **305**, 827-829, doi: 10.1038/305827a0.
11. Georgiev, G. P., Ilyin, Y. V., Ryskov, A. P., Tchurikov, N. A., Yenikolopov, G. N., Gvozdev, V. A., and Ananiev, E. V. (1977) Isolation of eukaryotic DNA fragments containing structural genes and the adjacent sequences, *Science*, **195**, 394-397, doi: 10.1126/science.401545.
 12. Finnegan, D. J., Rubin, G. M., Young, M. W., and Hogness, D. S. (1978) Repeated gene families in *Drosophila melanogaster*, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **42**, 1053-1063, doi: 10.1101/sqb.1978.042.01.106.
 13. Glover, D. M., White, R. L., Finnegan, D. J., and Hogness, D. S. (1975) Characterization of six cloned DNAs from *Drosophila melanogaster*, including one that contains the genes for rRNA, *Cell*, **5**, 149-157, doi: 10.1016/0092-8674(75)90023-9.
 14. Schaffner, W., Gross, K., Telford, J., and Birnstiel, M. (1976) Molecular analysis of the histone gene cluster of *Psammecinus miliaris*: II. The arrangement of the five histone-coding and spacer sequences, *Cell*, **8**, 471-478, doi: 10.1016/0092-8674(76)90214-2.
 15. Georgiev, G. P. (1984) Mobile genetic elements in animal cells and their biological significance, *Eur. J. Biochem.*, **145**, 203-220, doi: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08541.x.
 16. Saigo, K., Kugimiya, W., Matsuo, Y., Inouye, S., Yoshioka, K., and Yuki, S. (1984) Identification of the coding sequence for a reverse transcriptase-like enzyme in a transposable genetic element in *Drosophila melanogaster*, *Nature*, **312**, 659-661, doi: 10.1038/312659a0.
 17. Emori, Y., Shiba, T., Kanaya, S., Inouye, S., Yuki, S., and Saigo, K. (1985) The nucleotide sequences of *copia* and *copia*-related RNA in *Drosophila* virus-like particles, *Nature*, **315**, 773-776, doi: 10.1038/315773a0.
 18. Michel, F., and Lang, B. F. (1985) Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses, *Nature*, **316**, 641-643, doi: 10.1038/316641a0.
 19. Cappello, J., Handelsman, K., and Lodish, H. F. (1985) Sequence of Dictyostelium DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence, *Cell*, **43**, 105-115, doi: 10.1016/0092-8674(85)90016-9.
 20. Hattori, M., Kuhara, S., Takenaka, O., and Sakaki, Y. (1986) L1 family of repetitive DNA sequences in primates may be derived from a sequence encoding a reverse transcriptase-related protein, *Nature*, **321**, 625-628, doi: 10.1038/321625a0.
 21. Fawcett, D. H., Lister, C. K., Kellett, E., and Finnegan, D. J. (1986) Transposable elements controlling I-R hybrid dysgenesis in *D. melanogaster* are similar to mammalian LINEs, *Cell*, **47**, 1007-1015, doi: 10.1016/0092-8674(86)90815-9.
 22. Lampson, B. C., Sun, J., Hsu, M. Y., Vallejo-Ramirez, J., Inouye, S., and Inouye, M. (1989) Reverse transcriptase in a clinical strain of *Escherichia coli*: production of branched RNA-linked msDNA, *Science*, **243**, 1033-1038, doi: 10.1126/science.2466332.
 23. Lim, D., and Maas, W. K. (1989) Reverse transcriptase-dependent synthesis of a covalently linked, branched DNA-RNA compound in *E. coli* B, *Cell*, **56**, 891-904, doi: 10.1016/0092-8674(89)90693-4.
 24. Evgen'ev, M. B., Zelentsova, H., Shostak, N., Kozitsina, M., Barskyi, V., Lankenau, D. H., and Corces, V. G. (1997) *Penelope*, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 196-201, doi: 10.1073/pnas.94.1.196.
 25. Lundblad, V., and Blackburn, E. H. (1990) RNA-dependent polymerase motifs in ESTI: Tentative identification of a protein component of an essential yeast telomerase, *Cell*, **60**, 529-530, doi: 10.1016/0092-8674(90)90653-v.
 26. Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T. R. (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase, *Science*, **276**, 561-567, doi: 10.1126/science.276.5312.561.
 27. Olovnikov, A. M. (1996) Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory, *Exp. Gerontol.*, **31**, 443-448, doi: 10.1016/0531-5565(96)00005-8.
 28. Arkhipova, I. R., Mazo, A. M., Cherkasova, V. A., Gorelova, T. V., Schuppe, N. G., and Ilyin, Y. V. (1986) The steps of reverse transcription of *Drosophila* mobile genetic elements and U3-R-U5 structure of their LTRs, *Cell*, **44**, 555-563, doi: 10.1016/0092-8674(86)90265-5.
 29. Krupovic, M., Blomberg, J., Coffin, J. M., Dasgupta, I., Fan, H., Geering, A. D., Gifford, R., Harrach, B., Hull, R., Johnson, W., Kreuze, J. F., Lindemann, D., Llorens, C., Lockhart, B., Mayer, J., Muller, E., Olszewski, N., Pappu, H. R., Pooggin, M., Richert-Poggeler, K. R., et al. (2018) Ortervirales: A new viral order unifying five families of reverse-transcribing viruses, *J. Virol.*, **92**, e00515-18, doi: 10.1128/jvi.00515-18.
 30. Paul, B. G., Yushenova, I. A., and Arkhipova, I. R. (2022) *The Diversity of Reverse Transcriptases in Retrotransposons and Human Disease* (Gabriel, A., ed.) World Scientific, Singapore, pp. 1-28, doi: 10.1142/9789811249228_0001.
 31. Lambowitz, A. M., and Belfort, M. (2015) Mobile bacterial group II introns at the crux of eukaryotic evolution, *Microbiol. Spectr.*, **3**, doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0050-2014.
 32. Arkhipova, I. R., and Yushenova, I. A. (2019) Giant transposons in eukaryotes: Is bigger better? *Genome Biol. Evol.*, **11**, 906-918, doi: 10.1093/gbe/evz041.
 33. Gao, L., Altae-Tran, H., Böhning, F., Makarova, K. S., Segel, M., Schmid-Burgk, J. L., Koob, J.,

- Wolf, Y. I., Koonin, E. V., and Zhang, F. (2020) Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes, *Science*, **369**, 1077-1084, doi: 10.1126/science.aba0372.
34. Millman, A., Bernheim, A., Stokar-Avihail, A., Fedorenko, T., Voichkek, M., Leavitt, A., Oppenheimer-Shaanan, Y., and Sorek, R. (2020) Bacterial retrons function in anti-phage defense, *Cell*, **183**, 1551-1561, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.065.
 35. Bobonis, J., Mitosch, K., Mateus, A., Karcher, N., Kritikos, G., Selkig, J., Zietek, M., Monzon, V., Pfalz, B., Garcia-Santamarina, S., Galardini, M., Sueki, A., Kobayashi, C., Stein, F., Bateman, A., Zeller, G., Savitski, M. M., Elfenbein, J. R., Andrews-Polymenis, H. L., and Typas, A. (2022) Bacterial retrons encode phage-defending tripartite toxin-antitoxin systems, *Nature*, **609**, 144-150, doi: 10.1038/s41586-022-05091-4.
 36. Mestre, M. R., González-Delgado, A., Gutiérrez-Rus, L. I., Martínez-Abarca, F., and Toro, N. (2020) Systematic prediction of genes functionally associated with bacterial retrons and classification of the encoded tripartite systems, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12632-12647, doi: 10.1093/nar/gkaa1149.
 37. Wang, Y., Guan, Z., Wang, C., Nie, Y., Chen, Y., Qian, Z., Cui, Y., Xu, H., Wang, Q., Zhao, F., Zhang, D., Tao, P., Sun, M., Yin, P., Jin, S., Wu, S., and Zou, T. (2022) Cryo-EM structures of *Escherichia coli* Ec86 retron complexes reveal architecture and defence mechanism, *Nat. Microbiol.*, **7**, 1480-1489, doi: 10.1038/s41564-022-01197-7.
 38. Guo, H., Arambula, D., Ghosh, P., and Miller, J. F. (2014) Diversity-generating retroelements in phage and bacterial genomes, *Microbiol. Spectr.*, **2**, MDNA3-0029-2014, doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0029-2014.
 39. Paul, B. G., Burstein, D., Castelle, C. J., Handa, S., Arambula, D., Czornyj, E., Thomas, B. C., Ghosh, P., Miller, J. F., Banfield, J. F., and Valentine, D. L. (2017) Retroelement-guided protein diversification abounds in vast lineages of Bacteria and Archaea, *Nat. Microbiol.*, **2**, 17045, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.45.
 40. Roux, S., Paul, B. G., Bagby, S. C., Nayfach, S., Allen, M. A., Attwood, G., Cavicchioli, R., Chistoserdova, L., Gruninger, R. J., Hallam, S. J., Hernandez, M. E., Hess, M., Liu, W. T., McAllister, T. A., O'Malley, M. A., Peng, X., Rich, V. I., Saleska, S. R., and Elie-Fadrosh, E. A. (2021) Ecology and molecular targets of hypermutation in the global microbiome, *Nat. Commun.*, **12**, 3076, doi: 10.1038/s41467-021-23402-7.
 41. Paul, B. G., and Eren, A. M. (2022) Eco-evolutionary significance of domesticated retroelements in microbial genomes, *Mobile DNA*, **13**, 6, doi: 10.1186/s13100-022-00262-6.
 42. Fortier, L. C., Bouchard, J. D., and Moineau, S. (2005) Expression and site-directed mutagenesis of the lactococcal abortive phage infection protein AbiK, *J. Bacteriol.*, **187**, 3721-3730, doi: 10.1128/jb.187.11.3721-3730.2005.
 43. Lopatina, A., Tal, N., and Sorek, R. (2020) Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy, *Annu. Rev. Virol.*, **7**, 371-384, doi: 10.1146/annurev-virology-011620-040628.
 44. Wang, C., Villion, M., Semper, C., Coros, C., Moineau, S., and Zimmerly, S. (2011) A reverse transcriptase-related protein mediates phage resistance and polymerizes untemplated DNA *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7620-7629, doi: 10.1093/nar/gkr397.
 45. Mestre, M. R., Gao, L. A., Shah, S. A., López-Beltrán, A., González-Delgado, A., Martínez-Abarca, F., Iranzo, J., Redrejo-Rodríguez, M., Zhang, F., and Toro, N. (2022) UG/Abi: a highly diverse family of prokaryotic reverse transcriptases associated with defense functions, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 6084-6101, doi: 10.1093/nar/gkac467.
 46. Figiel, M., Gapińska, M., Czarnocki-Cieciura, M., Zajko, W., Sroka, M., Skowronek, K., and Nowotny, M. (2022) Mechanism of protein-primed template-independent DNA synthesis by Abi polymerases, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 10026-10040, doi: 10.1093/nar/gkac772.
 47. Zimmerly, S., and Wu, L. (2015) An unexplored diversity of reverse transcriptases in bacteria, *Microbiol. Spectrum*, **3**, MDNA3-0058-2014, doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0058-2014.
 48. Simon, D. M., and Zimmerly, S. (2008) A diversity of uncharacterized reverse transcriptases in bacteria, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 7219-7229, doi: 10.1093/nar/gkn867.
 49. Kojima, K. K., and Kanehisa, M. (2008) Systematic survey for novel types of prokaryotic retroelements based on gene neighborhood and protein architecture, *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 1395-1404, doi: 10.1093/molbev/msn081.
 50. Toro, N., Martinez-Abarca, F., Mestre, M. R., and Gonzalez-Delgado, A. (2019) Multiple origins of reverse transcriptases linked to CRISPR-Cas systems, *RNA Biol.*, **16**, 1486-1493, doi: 10.1080/15476286.2019.1639310.
 51. Silas, S., Mohr, G., Sidote, D. J., Markham, L. M., Sanchez-Amat, A., Bhaya, D., Lambowitz, A. M., and Fire, A. Z. (2016) Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein, *Science*, **351**, aad4234, doi: 10.1126/science.aad4234.
 52. Mohr, G., Silas, S., Stamos, J. L., Makarova, K. S., Markham, L. M., Yao, J., Lucas-Elio, P., Sanchez-Amat, A., Fire, A. Z., Koonin, E. V., and Lambowitz, A. M. (2018) A reverse transcriptase-Cas1 fusion protein contains a Cas6 domain required for both CRISPR RNA biogenesis and RNA spacer acquisition, *Mol. Cell*, **72**, 700-714, doi: 10.1016/j.molcel.2018.09.013.

53. Park, S. K., Mohr, G., Yao, J., Russell, R., and Lambowitz, A. M. (2022) Group II intron-like reverse transcriptases function in double-strand break repair, *Cell*, **185**, 3671-3688.e3623, doi: 10.1016/j.cell.2022.08.014.
54. Fragkiadaki, P., Renieri, E., Kalliantasi, K., Kouvidi, E., Apalaki, E., Vakonaki, E., Mamoulakis, C., Spandidos, D. A., and Tsatsakis, A. (2022) Telomerase inhibitors and activators in aging and cancer: A systematic review, *Mol. Med. Rep.*, **25**, 158, doi: 10.3892/mmr.2022.12674.
55. Gladyshev, E. A., and Arkhipova, I. R. (2011) A widespread class of reverse transcriptase-related cellular genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20311-20316, doi: 10.1073/pnas.1100266108.
56. Yushenova, I. A., and Arkhipova, I. R. (2018) Biochemical properties of bacterial reverse transcriptase-related (*rvt*) gene products: multimerization, protein priming, and nucleotide preference, *Curr. Genet.*, **64**, 1287-1301, doi: 10.1007/s00294-018-0844-6.
57. Dlakic, M., and Mushegian, A. (2011) Prp8, the pivotal protein of the spliceosomal catalytic center, evolved from a retroelement-encoded reverse transcriptase, *RNA*, **17**, 799-808, doi: 10.1261/rna.2396011.
58. Grainger, R. J., and Beggs, J. D. (2005) Prp8 protein: at the heart of the spliceosome, *RNA*, **11**, 533-557, doi: 10.1261/rna.2220705.
59. Galej, W. P., Oubridge, C., Newman, A. J., and Nagai, K. (2013) Crystal structure of Prp8 reveals active site cavity of the spliceosome, *Nature*, **493**, 638-643, doi: 10.1038/nature11843.
60. Lambert, M. E., McDonald, J. F., and Weinstein, I. B. (1988) *Eukaryotic Transposable Elements as Mutagenic Agents*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
61. Arkhipova, I. R. (2012) *Telomerase, retrotransposons, and evolution*, in *Telomerases: Chemistry, Biology, and Clinical Applications* (Lue, N. F., and Autexier, C., eds.) John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, pp. 265-299, doi: 10.1002/9781118268667.ch11.
62. Lue, N. F., and Autexier, C. (2006) The structure and function of telomerase reverse transcriptase, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 493-517, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142412.
63. Geer, L. Y., Domrachev, M., Lipman, D. J., and Bryant, S. H. (2002) CDART: protein homology by domain architecture, *Genome Res.*, **12**, 1619-1623, doi: 10.1101/gr.278202.
64. Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., and Geer, L. Y. (2015) CDD: NCBI's conserved domain database, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D222-D226, doi: 10.1093/nar/gku1221.

TO BE MOBILE OR NOT: THE VARIETY OF REVERSE TRANSCRIPTASES AND THEIR RECRUITMENT BY HOST GENOMES

Review

I. R. Arkhipova* and I. A. Yushenova

*Josephine Bay Paul Center for Comparative Molecular Biology and Evolution, Marine Biological Laboratory,
Woods Hole, MA 02543 USA; e-mail: iarkhipova@mbl.edu, iyushenova@mbl.edu*

Reverse transcriptases (RT), or RNA-dependent DNA polymerases, are unorthodox enzymes that originally added a new angle to the conventional view of the unidirectional flow of genetic information in the cell from DNA to RNA to protein. First discovered in vertebrate retroviruses, RTs were since re-discovered in most eukaryotes, bacteria, and archaea, spanning essentially all domains of life. For retroviruses, RTs provide the ability to copy the RNA genome into DNA for subsequent incorporation into the host genome, which is essential for their replication and survival. In cellular organisms, most RT sequences originate from retrotransposons, the type of self-replicating genetic elements that rely on reverse transcription to copy and paste their sequences into new genomic locations. Some retroelements, however, can undergo domestication, eventually becoming a valuable addition to the overall repertoire of cellular enzymes. They can be beneficial yet accessory, like the diversity-generating elements, or even essential, like the telomerase reverse transcriptases. Nowadays, ever-increasing numbers of domesticated RT-carrying genetic elements are being discovered. It may be argued that domesticated RTs and reverse transcription in general is more widespread in cellular organisms than previously thought, and that many important cellular functions, such as chromosome end maintenance, may evolve from an originally selfish process of converting RNA into DNA.

Keywords: reverse transcription, RNA-dependent DNA polymerase, telomerase reverse transcriptase

ЭФФЕКТЫ МИКРОГРАВИТАЦИИ И ФИЗИОЛОГИЯ СТАРЕНИЯ: СХОДНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИЛИ ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ?

Обзор

© 2023 А.Ю. Ратушный, Л.Б. Буравкова*

*Институт медико-биологических проблем РАН,
123007 Москва, Россия; электронная почта: buravkova@imbp.ru*

Поступила в редакцию 18.07.2023

После доработки 13.10.2023

Принята к публикации 14.10.2023

Несмотря на использование средств профилактики (в том числе интенсивных физических нагрузок), у космонавтов и астронавтов в длительных космических полетах развиваются атония и атрофия мышц, недостаточность сердечно-сосудистой системы, остеопения и др. Все эти изменения, напоминающие возрастные физиологические сдвиги, наступают у здорового человека в условиях микрогравитации довольно быстро — в течение нескольких месяцев. То есть адаптация к отсутствию гравитации приводит к симптоматике старения, которая компенсируется после возвращения на Землю. Перспектива межпланетных полетов ставит вопрос о пороговых значениях гравитации, ниже которых основные физиологические системы будут терять свой функциональный потенциал по аналогии со старением и влиять на продолжительность жизни. Важная роль в процессах старения принадлежит клеточному резерву организма — прогениторным клеткам, которые участвуют в физиологическом ремоделировании и регенеративных/репаративных процессах всех физиологических систем. С возрастом их число уменьшается, и снижается регенеративный потенциал. Более того, их паракринный спектр при клеточном старении становится провоспалительным, нарушая тканевой гомеостаз. Мезенхимальные стволовые/стромальные клетки являются механочувствительными, и поэтому отсутствие гравитационного стимула вызывает серьезные изменения их функционального статуса. В обзоре проведено сравнение клеточных эффектов микрогравитации и изменений, развивающихся в сенесцентных клетках, в том числе стромальных предшественниках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микрогравитация, старение организма, клеточное старение, мезенхимальные стромальные клетки (МСК).

DOI: 10.31857/S032097252311009X, EDN: MLINNI

ВВЕДЕНИЕ

Факторы космического полета, в частности, невесомость/микрогравитация, повышают риски ухудшения здоровья космонавтов, несмотря на тщательный предполетный отбор [1–3]. В связи с этим одной из наиболее существенных научных проблем космической медицины является поиск фундаментальных механизмов адаптации к воздействию микрогравитации на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях. Особый интерес представляет

сходство физиологических изменений, происходящих в условиях космического полета и при старении организма человека, что поднимает фундаментальный вопрос об общности молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в их основе. В то же время после возвращения на Землю наблюдается восстановление и нормализация физиологических процессов в органах и тканях. Старение же ведет к односторонним, прогрессирующим патологическим изменениям [1, 4].

Известно, что длительные космические полеты могут приводить к появлению признаков, характерных для старения, во многих системах организма [4–7]. Исследования, проведенные на орбитальной станции «Мир» и Международной космической станции, показали, что длительное пребывание в космосе приводит к снижению плотности костей [8–11],

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ВКМ — внеклеточный матрикс; ММГ — моделированная микрогравитация; МСК — мезенхимальные стволовые/стромальные клетки; Rb — белок ретинобластомы; RPM — устройство рандомизации положения объекта относительно вектора гравитации.

* Адресат для корреспонденции.

дисфункции иммунной системы [12], проблемам функционирования сердечно-сосудистой системы [13, 14], а также снижению массы и силы скелетной мускулатуры [15]. В опорно-двигательном аппарате отмечаются проблемы и с хрящевой тканью. Снижается размер хондрогенных гранул, синтез протеогликанов и динамическая жесткость трехмерных хрящевых конструкций [7]. Можно отметить также умеренный гипотиреоз, повышенное содержание гормонов стресса (в основном катехоламинов), снижение уровня половых стероидов, инсулинорезистентность и системный воспалительный ответ [6, 16]. Сходные изменения происходят при старении человека в условиях земной гравитации, но в космосе они развиваются намного быстрее.

В контексте воздействия микрогравитации одним из наиболее важных рисков являются дистрофические изменения опорно-двигательного аппарата. В недавнем мета-обзоре на эту тему просуммированы данные 25 экспериментальных статей. Исследователи проанализировали значения плотности костной ткани после полета для 148 человек, а также биохимические маркеры костной ткани в полете и после полета для 124 человек. У космонавтов, которые провели в полете более 28 дней, обнаружено снижение плотности костей в нижних конечностях на 5,4% ($n = 96$) относительно предполетного уровня. После приземления маркеры резорбции снижались, и баланс смещался в сторону костеобразования [11].

Некоторые механизмы, лежащие в основе снижения плотности костей в условиях космического полета, могут быть очень похожи на механизмы остеопороза, ассоциированного со старением и/или гиподинамией. Уменьшение костной массы и остеопороз проявляются как у пожилых людей, так и у пациентов любого возраста, ведущих малоподвижный образ жизни [6]. В первую очередь, можно выделить снижение механической нагрузки на опорно-двигательный аппарат. Во-вторых, отметить снижение уровня половых гормонов, таких как тестостерон и эстроген. Интересно, что у мужчин-астронавтов наблюдается как снижение нагрузки, так и снижение тестостерона (сравнимое с пожилыми мужчинами) [6, 17]. Необходимо отметить, что выполнение ежедневных физических тренировок и нагрузочных тестов не позволяет полностью остановить развитие остеопении.

Сходные результаты демонстрируются и в работе с животными, где 16-недельных самок мышей C57BL/6J ($n = 8$) подвергли воздействию микрогравитации в течение 15 дней во

время миссии космического корабля STS-131. Последующий анализ показал снижение объемной доли кости на 6,2% и толщины кости на 11,9%. Более детальный анализ выявил увеличение количества остеокластов. Экспрессия матриксных металлопротеиназ (ММР-1, -3 и -10) в костях также повышалась. В то же время экспрессия гена *CDKN1a*, кодирующего p21 (один из ингибиторов клеточного цикла и важных маркеров клеточного старения), в остеобластах увеличивалась в 3,3 раза. Это может доказывать, что в основе изменения костного гомеостаза в условиях микрогравитации лежат остеолит остеоцитов и p21-опосредованная остановка клеточного цикла остеобластов [18]. Таким образом, феноменология длительного воздействия факторов космического полета на физиологию костной ткани позволяет провести некоторые параллели с возрастными изменениями. Это дает основания предполагать существование сходных клеточных механизмов.

Последние исследования с участием астронавтов обнаруживают еще больше связей между изменениями во время космических полетов и при старении. Современные молекулярно-биологические методы позволяют оценить состояние генетического аппарата при различных воздействиях. Так, американские исследователи провели оценку динамики изменения длины теломер (концевых участков хромосом) и ответа на повреждение ДНК (DDR – DNA damage response) в мононуклеарных клетках периферической крови до, во время и после длительных полетов (до года) на борту МКС у 11 астронавтов. Сокращение теломерных участков считается одним из классических признаков старения, что будет подробнее рассмотрено ниже. Несмотря на то что все обследуемые прошли строгий медицинский отбор и не имели замечаний к состоянию здоровья, у них отмечены более низкие значения длины теломер и меньший уровень теломеразной активности по сравнению с контрольной группой здоровых обследуемых того же возраста. Интересно, что длина теломер несколько увеличивалась во время космических полетов, но затем этот показатель быстро снижался после возвращения на Землю [19]. В результате почти у всех астронавтов длина теломер после полета была ниже дополетных значений, несмотря на индивидуальные различия. Авторы установили положительную корреляцию окислительного стресса и динамики изменения длины теломер. Кроме этого, во время и после космических полетов наблюдалось возрастание частоты появления хромосомных инверсий. Выдвинуто предположение,

что хронический окислительный стресс во время космических полетов транзиторно активирует в соматических клетках альтернативный путь регуляции длины теломер, не зависящий от активности теломеразы [19].

Обсуждая данные об увеличении длины теломер во время космических полетов, необходимо отметить, что космонавты и астронавты используют физические нагрузки (около часа ежедневно) в качестве средства профилактики неблагоприятного действия невесомости. Анализ эффектов бега на длину теломер [20] выявил его положительное влияние на этот показатель в моноклеточных клетках крови, при этом длина теломер положительно коррелировала с уровнем тренированности спортсменов [21].

Если рассматривать длину теломер (или любой другой признак старения) как один из «интегративных маркеров» кумулятивного действия генетических и внешних факторов (окружающая среда и образ жизни) на старение организма, то, анализируя влияние космических полетов на физиологические процессы, необходимо помнить, что, помимо микрогравитации, на организм здорового человека будет влиять повышенный уровень радиации, транзиторные изменения нормоксической атмосферы станции (повышение уровня CO₂, органические примеси в атмосфере), изменение микробиома, а также стрессовые ситуации (например, внекорабельная деятельность, отказы элементов систем жизнеобеспечения и др.).

Интересно, что концентрация провоспалительных интерлейкинов и хемокинов в плазме крови астронавтов достоверно коррелировала с длиной теломер и повышалась в условиях длительных космических полетов. В плазме космонавтов было обнаружено повышение содержания таких факторов, как TNF α , IL-8, IL-1 α , TPO, VEGF, MCP-1, CCL4, CXCL5, включая провоспалительные цитокины [12], что может рассматриваться как хроническое (стерильное) воспаление, являющееся одним из признаков старения.

Во время космического полета микрогравитация является основным фактором, влияющим на здоровье астронавтов [22]. Поскольку физиологические изменения на уровне организма являются следствием модификации функционирования клеток, мы сравнили клеточные изменения при старении и в условиях микрогравитации.

Безусловно, необходимо помнить, что в физиологических эффектах влияния гравитации большую роль играют и центральные регуляторные процессы, такие как изменение

биоритмов, гормонального статуса и другие, влияющие на состояние (и старение) клеток в контексте целостной единой системы. Эти эффекты являются предметом отдельных исследований. В частности, они рассматриваются в нейроэндокринной теории старения Дильмана и в гипотезе А.М. Оловникова о возможных молекулярных механизмах развития и старения многоклеточных организмов, в том числе с участием нейроэндокринных клеток и гравитационных влияний. Там же упоминается и восприятие животными гравитационных инфраничных ритмов, которые могут нарушаться в космическом полете и, вероятно, приводить к ускоренному старению [23–27].

СТАРЕНИЕ КЛЕТОК

В современном представлении старением часто называют прогрессирующую с течением времени потерю физиологической целостности организма, ведущую к нарушениям его функций и увеличению риска смерти. Гипотезы, теории, определения старения на различных уровнях организации жизни активно обсуждаются на страницах журнала «Биохимия», в том числе в № 12 за 2022 г. В данном обзоре мы отметим лишь основные моменты. Также стоит отметить и существование эпигенетических «часов» старения, предложенных в 2013 г. Horvath [28] и в 2017 г. группой исследователей под руководством Gladyshev [29]. Однако достаточно широкое применение этих «часов» в приложении к космической биологии остается вопросом будущих исследований.

На сегодняшний день на клеточном уровне к признакам старения относят изменение межклеточного взаимодействия, истощение пула стволовых клеток, клеточное старение, митохондриальную дисфункцию, нарушение метаболизма, нарушение протеостаза, нестабильность генома, укорочение теломер, эпигенетические изменения [30]. Непосредственно клеточное старение (сенесценцию) ученые считают одним из центральных звеньев в старении организма [31]. Данный феномен характеризуется необратимым арестом клеточного цикла и может сопровождаться выраженными фенотипическими изменениями, включая усиление аутофагических процессов, модуляцию метаболизма, ремоделирование хроматина, продукцию провоспалительных цитокинов и др. [32–36]. Среди наиболее известных маркеров сенесцентного состояния клетки следует отдельно выделить морфологические изменения, включая увеличение размера и уплощение [37].

Также повышается активность старение-ассоциированной β -галактозидазы (SA- β -gal) [38] и увеличивается частота возникновения гетерохроматиновых фокусов — γ -H2AX [39]. В некоторой степени сенесцентная клетка является и следствием, и причиной старения. С одной стороны, она представляет собой следствие изменений на молекулярном уровне, которые воплощаются в реализацию программы сенесценции на уровне элементарной единицы организации жизни — на уровне клетки. С другой стороны, физиология сенесцентной клетки в значительной степени изменяется, что в долгосрочной перспективе приводит к нарушениям в работе тканей и органов.

Клеточное старение принято относить к антагонистическим признакам, которые имеют как отрицательные, так и положительные стороны. Хорошо известно, что активация сенесцентного состояния является важнейшим барьером на пути опухолеобразования. Неконтролируемое деление опухолевых клеток и неспособность к делению сенесцентных клеток представляются противоположными следствиями одних и тех же причин, а именно накопления повреждений в генетическом материале [40, 41]. Также клеточное старение играет важную роль в процессе заживления ран. При заживлении кожных ран матрицеллюлярный белок CCN1 может индуцировать старение фибробластов или миофибробластов и тем самым уменьшать фиброз [42]. Еще одной стороной положительных эффектов старения может быть и изменение межклеточного взаимодействия. Ряд паракринных медиаторов, характерных для сенесцентного секретома, даже используют при праймировании стромальных предшественников с целью использования в регенеративной медицине. В последние годы были исследованы разные подходы к праймированию для расширения возможностей стромальных прогениторов, что привело к созданию новых клеточных продуктов с улучшенным потенциалом для различных клинических применений [43]. Подобные исследования ярко иллюстрируют неоднозначность негативных и позитивных эффектов в биологии, что касается и сенесцентных клеток.

На сегодняшний день различают репликативное и стресс-индуцированное клеточное старение. Репликативным старением считают состояние клеток, при котором пролиферативная активность необратимо утрачена после ряда митозов. Основной причиной ареста клеточного цикла (в этом случае) является укорочение теломерных участков, которое можно рассматривать как частный случай нестабиль-

ности генома. В 1961 г. клеточное старение впервые было описано как прогрессивная и необратимая потеря пролиферативного потенциала соматических клеток человека. Показано, что даже в идеальных условиях культивирования фибробласты эмбриона человека способны делиться только ограниченное число раз (50 ± 10) [44]. Феномен назвали по имени автора работы — «лимит Хейфлика». Объяснение этого явления предложил А.М. Оловников в 1971 г. [45], используя данные о принципах синтеза ДНК в клетках. Согласно его гипотезе, которая позже получила экспериментальные подтверждения, при каждом клеточном делении хромосомы немного укорачиваются из-за недорепликации теломерного участка ДНК. Теломеры человека представляют собой концевые участки хромосом, которые содержат от 4 до 15 тысяч пар оснований и состоят из повторяющихся последовательностей TTAGGG. Дело в том, что ДНК-полимераза не способна синтезировать дочернюю копию ДНК с самого конца цепи — она может лишь добавлять нуклеотиды к уже имеющейся 3'-гидроксильной группе, т.е. нуждается в РНК-праймере. После удаления последнего праймера на 3'-конце дочерняя цепь неизбежно окажется короче, что приведет к постепенной потере участка теломеры в процессе последовательных циклов синтеза ДНК [46].

Стресс-индуцированное клеточное старение также характеризуется необратимым арестом клеточного цикла. В отличие от репликативного оно не связано с количеством делений. Стресс-индуцированное старение запускается в ответ на сублетальные воздействия или активацию онкогенов [36, 47]. Наиболее часто это состояние связывают с окислительным стрессом, т.е. с нарушением баланса между оксидантами (обычно активными формами кислорода (АФК)) и антиоксидантными системами. Воздействие АФК на ДНК, в том числе на мтДНК, способствует формированию продуктов окислительного повреждения оснований ДНК, таких как 8-гидрокси-2'-диоксигуанозин (8OHdG), а также может приводить к разрыву цепей [48]. Помимо этого, митохондриальные АФК могут активировать N-концевую киназу JUN (JNK), которая, в свою очередь, способствует высвобождению фрагментов хроматина в цитоплазму и активации провоспалительных компонентов секретома [49]. Интересно, что окислительный стресс также может ускорить укорочение теломер [50], вероятно, из-за большого содержания гуанина (G), который является наиболее уязвимым для АФК [51].

Программы репликативного и стресс-индуцированного клеточного старения реализуются через сходные механизмы в клетке. Сравнительно небольшие повреждения ДНК приводят к временному аресту клеточного цикла. После успешной репарации клетка снова может начать делиться. Такое состояние по определению нельзя назвать клеточным старением. Более значительные повреждения, длительно не поддающиеся репарации, приводят к хронической активации сигнального каскада DDR, реакции клетки на повреждение генетического материала. Хроническая активация DDR обычно возникает при множественных повреждениях ДНК и приводит к стабильному аресту клеточного цикла, главному признаку сенесцентного состояния. Стабильный арест цикла достигается путем активации сигнальных каскадов супрессоров опухолей p16INK4a/Rb и p53/p21CIP1 [47, 51]. Снова начать делиться клетка уже никогда не сможет. Оба ингибитора — p21 и p16 (кодируются генами *CDKN1A* и *CDKN2A* соответственно), подавляя активность соответствующих циклинзависимых киназ, приводят к гипофосфорилированию белка ретинобластомы (Rb). Гипофосфорилированный Rb способен связывать транскрипционные факторы семейства E2F, регулирующие клеточный цикл [52, 53]. Путем обратимого связывания и, как следствие, функциональной инактивации белков E2F, Rb контролирует экспрессию генов, продукты которых являются важными участниками регуляции клеточного цикла, и блокирует переход клеток из G1 в S-фазу. При этом путь p53/p21 преимущественно активируется первым, предотвращая пролиферацию клеток с серьезными повреждениями ДНК, тогда как путь p16/Rb вовлекается несколько позднее [32]. Однако в зависимости от клеточного контекста предпочтение может быть отдано тому или другому пути.

На клеточное старение могут влиять различные механические силы, включая напряжение сдвига, растяжение и давление [54, 55]. Можно ли рассматривать микрогравитацию как фактор, вызывающий клеточное старение или иные сходные изменения в физиологии клетки?

СЕНЕСЦЕНТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛЕТКАХ В УСЛОВИЯХ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Как уже было отмечено выше, в космическом полете на организм действует целый ряд

неблагоприятных стрессовых факторов, которые могут усугублять развитие признаков, ассоциированных со старением. На клеточном уровне это может быть измененный радиационный фон, который способен нарушать целостность ДНК и усиливать окислительный стресс. В данном обзоре основное внимание сосредоточено на эффектах микрогравитации.

Рассмотрим ассоциированные со старением изменения в разных типах клеток при моделировании микрогравитации (ММГ). В силу технических ограничений по проведению экспериментов в космических полетах исследователи используют различные наземные модели. Как правило, такие модели направлены на гравитационную «разгрузку» с целью моделирования некоторых эффектов микрогравитации. Наземные эксперименты также позволяют избежать влияния повышенного радиационного фона и других факторов космического полета. Для моделирования эффектов микрогравитации на клеточных культурах чаще всего используются сосуды с вращающейся стенкой (Rotating Wall Vessel, RWV) и 2D/3D-клино-статы, такие как устройство рандомизации положения объекта относительно вектора гравитации (Random Positioning Machine, RPM). Считается, что для моделирования эффектов микрогравитации на адгезивных культурах клеток наиболее подходящим является RPM, которое представляет собой прибор, состоящий из двух рамок, осуществляющих вращение в двух перпендикулярных плоскостях с помощью специального программного обеспечения. Это приводит к рандомизации положения объекта относительно вектора гравитации. В стандартных режимах работы прибор моделирует ускорение свободного падения, эквивалентное $10^{-2} g$ [56–58].

В качестве объекта исследований используют различные клеточные культуры, включая иммортализованные линии, эндотелий, стромальные предшественники и др. [59–63]. Исследования морфофункционального состояния клеток *in vitro* позволили выявить широкий спектр изменений, свидетельствующих о прямом влиянии гравитации на клеточные структуры. Изменение положения тяжелых органелл, таких как ядро, приводит к перераспределению нагрузки на цитоскелет и вызывает его реорганизацию, также происходят модификации физического взаимодействия клетки с внеклеточным матриксом через молекулы адгезии. Все это приводит к изменению экспрессии генов, функционирования ряда белков и общей модификации функционального состояния клеток [64–68].

В отдельных работах предприняты попытки выявить в условиях ММГ активацию сенесценции в клетках феохромоцитомы (PC12), эритроцитах, миоблестах скелетных мышц и кардиомиоцитах [59, 69–71]. Wang et al. [59] исследовали влияние ММГ на клеточной линии PC12 крысы нейронального происхождения на ранних сроках (6–96 ч). Обнаружен арест клеточного цикла в фазе G1, повышение активности SA-b-gal и активация сигнальных каскадов p53 и p16, связанных с сенесценцией. Более детальный анализ выявил увеличение количества АФК, которые могут быть индуктором сенесценции. Активность внутриклеточных антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза (GSH-Px) и каталаза (CAT), была значительно повышена через 12 ч после начала эксперимента, но снижена через 96 ч. Более того, блокировка АФК антиоксидантом N-ацетилцистеином значительно подавляла вызванное микрогравитацией повышение активности SA-b-gal. Эти результаты позволили авторам предположить, что воздействие ММГ вызывает клеточное старение в клетках PC12 через усиление окислительного стресса [59].

С использованием 3D-клиностата проведена оценка модификаций структуры и функций эритроцитов человека. Сравнивали структурные параметры эритроцитов и выбирали метаболические показатели, характерные для клеточного старения. Полученные результаты, по мнению авторов, свидетельствуют о том, что длительные экспозиции приводят к характерным морфологическим паттернам старения [69].

Показано, что ММГ с использованием 3D-клиноста «Zeroto» ускоряет старение миобластов скелетных мышц человека в культуре. Продемонстрированы значительное снижение пролиферации, характерная реорганизация цитоскелета и гипертрофия ядер клеток, повышение экспрессии SA-b-gal. Подобные изменения наблюдаются в сенесцентных миоблестах после нескольких пассажей. Авторы отмечают, что эти эффекты оставались даже после возвращения к нормальным гравитационным условиям. Кроме этого, миобласты, подвергнутые воздействию ММГ, продемонстрировали сниженную способность к дифференцировке в миотубы [70].

Совсем недавно проведены исследования на кардиомиоцитах, полученных из iPSC (Induced pluripotent stem cell) человека. Продемонстрировано, что ММГ приводит к хромосомным реорганизациям, снижению митохондриальной функции, повышению уровня АФК

и другим признакам клеточного старения. Стоит отметить, что авторы указывают и на ограничения своего исследования, с которыми сложно не согласиться. Во-первых, короткое время экспозиции в условиях ММГ (48 ч). Во-вторых, необходимость дополнительных экспериментов для демонстрации обратимости или необратимости обнаруженных изменений [71].

Некоторые другие авторы также склоняются к мысли об участии АФК в повреждении ДНК при ММГ. Отмечается, что в клетках промиелоцитарного лейкоза человека ММГ индуцирует повреждение ДНК и митохондриально-опосредованный апоптоз через повышение продукции АФК [72]. В более ранних исследованиях уже отмечалось, что клиностатирование влияет на митохондрии, один из главных продуцентов свободных радикалов в клетке, и тем самым может вызывать апоптоз в клетках щитовидной железы. Через 24 ч эксперимента 10% клеток карциномы щитовидной железы (клеточная линия ONCO-DG1) вступили на Fas-зависимый апоптотический путь. Были обнаружены разрушение и перераспределение митохондрий, разрушение микротрубочек и активация эффекторной каспазы-3. Апоптоз был также выявлен при клиностатировании в нормальных клетках щитовидной железы (HTU-5), о чем свидетельствует активация каспазы-3, повышение содержания белков Fas и Bax [73].

Исследования на эмбриональных стволовых клетках мыши показали усиление действия АФК в условиях ММГ. Авторы добавляли перекись водорода к клеткам и анализировали количество двунитевых разрывов ДНК через 24 ч. Воздействие микрогравитации на обработанные клетки значительно повышало степень повреждения ДНК [74]. О сходных результатах в 2003 г. сообщили Greco et al. [75]. Они показали увеличение частоты хромосомных аберраций примерно в 1,2–2,8 раза при воздействии рентгеновского излучения на образцы крови после полета по сравнению с данными перед полетом. В то же время результаты другой работы показывают, что для фибробластов человека, находящихся в фазе G1 клеточного цикла, ранний ответ на блеомицин-индуцированное повреждение ДНК (количество фокусов γ -H2AX) было одинаковым как для клеток, экспонированных в условиях микрогравитации, так и для клеток статического наземного контроля [76].

Таким образом, целый ряд работ указывает на то, что ММГ может приводить к некоторым признакам клеточного старения. Более того,

в некоторой степени предполагается даже механизм, а именно окислительный стресс, ассоциированный с нарушением в работе митохондрий. Тем не менее ни в одной работе нет подтверждений перманентности ареста клеточного цикла. То есть четких доказательств, что после воздействия клетки уже не могут пролиферировать, по-прежнему не существует. Следовательно, однозначно говорить о клеточном старении в условиях ММГ пока рано. По нашему мнению, ММГ вряд ли может быть настолько сильным воздействием, чтобы привести к столь серьезным нарушениям на клеточном уровне.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В УСЛОВИЯХ ММГ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ СЕНЕСЦЕНЦИИ

Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК) или стромальные предшественники уже обнаружены почти во всех тканях организма и играют одну из главных ролей при обновлении и регенерации. Они участвуют в поддержании гомеостаза костной ткани, гемопоэза, регуляции иммуномодуляции и ангиогенеза, и др. МСК представляют немалый интерес как для фундаментальной науки, так и для прикладного применения в регенеративной медицине, включая случаи возрастных патологий. На сегодняшний день исследователи пришли к консенсусу и связывают положительные эффекты МСК с их способностью продуцировать целый ряд секретируемых факторов, в том числе компоненты внеклеточного матрикса и цитокины [77–80].

Некоторые авторы предполагают, что патологические изменения у астронавтов могут быть связаны со старением стромальных предшественников. Дальнейшее изучение влияния микрогравитации на старение МСК способствует пониманию роли сенесцентных клеток в развитии физиологических и патологических изменений в условиях космического полета [81]. Старение в организме коррелирует со снижением функциональной активности МСК. Это снижает скорость восстановления тканей, что характерно для старения. Например, переломы остеопоротической кости в пожилом возрасте медленнее заживают из-за снижения функции и количества МСК [82].

Основной причиной повреждения клеток, как уже было отмечено выше, может являться окислительный стресс. Микрогравитация

представляет собой стрессовое воздействие, потенциально способное индуцировать выработку АФК, что в конечном итоге приводит к различным повреждениям субклеточных компартментов [83]. В недавней работе отмечено увеличение уровня свободных радикалов и митохондриальная дисфункция в МСК. Антиоксидант восстанавливал функцию митохондрий и обращал вспять старение клеток. Кроме того, ММГ способствовала экспрессии YAP (Yes-associated protein) и его транслокации в ядро. YAP является важным эффектором сигнального пути Hippo, регулирующего развитие, гомеостаз и регенерацию [81, 84, 85]. Известно, что YAP может регулировать старение клеток, влияя на сигнальные пути ATM (мутация атаксии-телеангиэктазии), p53/p21, p16/CDK/Rb, аутофагию, AMPK, mTOR и SIRT1 [86–88]. Вертепорфин (VP), ингибитор YAP, восстанавливал ММГ-индуцированную митохондриальную дисфункцию и старение МСК [81].

В некоторых других исследованиях авторы также предполагают, что ММГ вызывает старение стромальных предшественников. Были изучены молекулярные изменения, ассоциированные со стволовостью (OCT-4, SOX2, NANOG) и клеточным старением (p19, p21, p53) в МСК, выделенных из Вартонова студня. По мнению авторов, результаты указывают на клеточную адаптацию, происходящую в течение первых часов воздействия, после чего следует потеря стволовости и появление признаков молекулярной программы старения [89]. Рассмотрим подробнее основные физиологические показатели МСК в условиях микрогравитации.

Пролиферация. Пролиферация представляет собой одну из главных характеристик клеток, особенно в контексте старения. В первую очередь, старение МСК классически характеризуется перманентным арестом клеточного цикла в фазе G1. То есть сенесцентные МСК не могут пролиферировать и образовывать колонии [36, 90, 91]. Ряд работ свидетельствует, как минимум, о некотором снижении пролиферативного потенциала МСК в условиях ММГ. Так, клиностатирование в течение времени (от 1 ч до 10 суток) приводило к снижению скорости пролиферации и изменению морфологии клеток, которые становились более плоскими и достигали конfluence при более низкой плотности. При увеличении срока воздействия до 20 суток пролиферация также снижалась, при этом увеличивалось количество крупных плоских клеток в культуре [92, 93]. Подобные изменения могут быть

и признаками старения. Работа с МСК костного мозга крысы подтверждает выводы предыдущих авторов [94]. Отмечается, что клиностамирование ингибирует рост популяции МСК в G0/G1-фазе клеточного цикла.

Другие авторы не только не сумели получить схожие результаты, но и обнаружили противоположный эффект. Yuge et al. [95] показали, что скорость пролиферации МСК человека на 3D-клиностае была повышена почти в 3 раза по сравнению с контрольной группой. Авторы отметили, что ММГ можно использовать для увеличения прироста популяций стволовых клеток *in vitro*. В нашем собственном исследовании было изучено функциональное состояние МСК, выделенных из жировой ткани человека, в условиях ММГ (96 ч) при помощи RPM. Обнаружено повышение прироста клеток в 1,5–2 раза, снижение активности лизосомального компартмента, уменьшение размера и гранулярности клеток. Не выявлено изменений в уровне АФК и трансмембранном потенциале митохондрий. Проведенное исследование указывает на отсутствие признаков клеточного стресса при культивировании МСК в условиях ММГ [96].

Работа с более коммитированными потомками МСК — остеобластами — показала, что ММГ не влияла на прирост клеток или их жизнеспособность. Клетки инкубировали на 3D-клиностае в течение 12–96 ч. Через 24 ч после начала эксперимента соотношение уровней мРНК *Bax/Bcl-2* (индикатор апоптоза) было увеличено до 136% от статического контроля. Однако уровни мРНК *XIAP* (антиапоптотическая молекула) одновременно увеличились до 138% от статического контроля. Фрагментация ДНК не наблюдалась. Уровень мРНК эффекторной каспазы-3 не изменялся [97].

Таким образом, делать однозначные выводы о снижении пролиферации МСК или увеличении апоптоза в условиях ММГ, как минимум, преждевременно. Данный вопрос требует дальнейших и более детальных исследований.

Дифференцировка. Важной особенностью сенесцентных МСК считается снижение мультипотентности [90, 91], что может ослаблять их репаративные свойства в тканях всех типов. Обнаруживается смещение баланса между адипоцитарным и остеоцитарным направлениями, хотя конкретный вектор сдвига по-прежнему остается дискуссионным. Некоторые работы отметили снижение остеогенных свойств МСК с увеличением длительности культивирования или при старении [98–100]. Другие исследования не показывают сходных

изменений или даже сообщают об увеличении остеогенного потенциала [101, 102]. Столь неоднозначные результаты, получаемые разными научными группами, обычно объясняют различными методологическими подходами и экспериментальными моделями, гетерогенностью популяции МСК, а также отсутствием однозначных тестов на остеогенную дифференцировку [98, 103]. Наиболее информативным маркером остеогенного потенциала *in vitro* является индукция дифференцировки в соответствующем направлении с последующим выявлением минерализации матрикса. В то же время повышенный уровень клеточной гибели может привести к ложноположительным результатам вследствие выхода большого количества кальция из погибающих клеток и его связывания с матриксом [36, 90, 91]. Касательно адипоцитарного потенциала ученые оказались ближе к консенсусу. Спектр получаемых результатов несколько широк, тем не менее большинство исследователей приходят к выводу о снижении адипогенного потенциала при клеточном старении [91].

Наши собственные результаты однозначно свидетельствуют о снижении адипогенного потенциала МСК, выделенных из жировой ткани, при репликативном старении. На это указывает отсутствие выраженного образования липидных включений при дифференцировке. Обнаружено значительное снижение экспрессии гена ключевого транскрипционного регулятора *PPAR γ* , что, вероятно, лежит в основе данного феномена. С другой стороны, в той же работе отмечены признаки, указывающие на реципрокное повышение остеогенного потенциала, несмотря на снижение экспрессии генов некоторых позитивных регуляторов остеобластного пути (*BMP2*, *BMP6*, *IGF1*, *IL1B*). При этом увеличивалась выраженность кальцификации матрикса при дифференцировке и концентрация остеопротегерина, что может быть важно в контексте кальцификации атеросклеротических бляшек у пожилых людей. Транскрипционная активность ключевого регулятора остеогенеза (*RUNX2*) и ряда исследуемых генов-маркеров (*SPARC*, *SPPI*, *COL1A1*, *BGLAP*) при репликативном старении МСК оставалась стабильной [104]. Несмотря на усиление кальцификации матрикса, его морфология отличалась в «молодых» и сенесцентных культурах, что может указывать на ложноположительный результат вследствие выхода кальция [36, 90, 91]. В то же время обнаруженное повышение продукции остеопротегерина может указывать на проостеогенную паракринную активность сенесцентных МСК [104].

Вопрос об остеогенной дифференцировке в условиях ММГ приводит исследователей к большому согласию. Подавляющее большинство авторов сходятся во мнении, что микрогравитация способствует снижению остеогенного потенциала МСК [105]. В частности, эти эффекты продемонстрированы на МСК костного мозга крыс [94, 106] и человека [107, 108]. Эти результаты были подтверждены Saxena et al. [109], которые продемонстрировали, что ММГ ингибирует остеобластогенез и увеличивает адипоцитогенез МСК, инкубированных в остеогенных условиях. Они считают, что в этот процесс вовлечены сниженная активность RhoA и фосфорилирование кофилина, нарушение стрессовых волокон F-актина и снижение передачи сигналов интегрина через киназу фокальной адгезии. Другие авторы показали, что снижение остеобластогенеза в ММГ, по крайней мере частично, вызвано снижением передачи сигналов интегрин/MAPK [110].

Анализ транскриптома с использованием полногеномного микрочипа показал, что 882 гена были подавлены, а 505 генов активизированы после 24-часового ММГ. Отмечено значительное снижение экспрессии остеобластных и хондроцитарных генов и увеличение экспрессии адипоцитарных генов [111].

В более поздних исследованиях ученые заинтересовались и неканоничными направлениями дифференцировки. Так, ММГ может усиливать дифференцировку МСК в нейроны. Было обнаружено, что увеличивается экспрессия ряда соответствующих маркеров. Кроме того, повышалась секреция нейротрофинов, таких как фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) или цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) [112]. В другом исследовании МСК крыс культивировали в течение 72 ч или 10 дней на клиностае с последующей экспансией в различных дифференциальных средах. Короткий период воздействия (72 ч) способствовал эндотелиальной, нейрональной и адипогенной дифференцировке. Длительное воздействие (10 дней) способствовало дифференцировке МСК в остеобласты, что неожиданно. Короткий период воздействия ММГ значительно снижал активность RhoA. Однако при увеличении длительности экспозиции этот показатель повышался. Эти результаты показали, что продолжительность ММГ регулирует дифференцировку МСК через RhoA-ассоциированный путь [113] и подтвердили результаты Saxena et al. [109], рассмотренные выше.

Таким образом, моделирование микрогравитации может в значительной степени повлиять на дифференцировочный потенциал МСК. По крайней мере в части остеогенной дифференцировки это влияние носит ингибирующий характер, что может объяснять и сходные физиологические последствия, касающиеся нарушения костного метаболизма.

Секреторная активность. Предполагается, что сенесцентные клетки могут способствовать поддержанию хронического воспаления и развитию заболеваний, ассоциированных со старением, поэтому изучение вопроса паракринной регуляции имеет большое значение. При старении клетки продолжают взаимодействовать со своим окружением и оказывать локальные и системные эффекты в первую очередь через паракринную регуляцию. Секреторный фенотип при клеточном старении значительно изменяется и даже получил отдельное название — SASP (senescence-associated secretory phenotype). Прежде всего, SASP характеризуется повышением провоспалительной части секретома, хотя отдельные факторы могут значительно варьировать в зависимости от типа клеток и способа индукции сенесценции [36, 90, 91, 114].

Показано, что 20-дневная экспозиция на 2D-клиностае повышала содержание IL-8, одного из основных провоспалительных цитокинов МСК, в культуральной среде в 1,4–3,2 раза, а среднее увеличение продукции на RPM составило 1,5–6 раз (10 суток) и 1,6–2,1 раза (20 суток) соответственно. В работе использовали МСК, полученные из костного мозга человека [115]. Позже, исследования на МСК, полученных из жировой ткани человека, дополнили эти результаты. Оценка изменений паракринной активности при экспозиции на RPM в течение 96 ч показала увеличение продукции IL-8 и уменьшение IL-6. При этом отмечено повышение продукции VEGF, ключевого позитивного регулятора ангиогенеза [96].

В нашей работе продемонстрировано, что кондиционированная среда от МСК, подвергшихся воздействию RPM, стимулировала образование сети сосудов *in ovo*, капилляроподобной сети эндотелиальных клеток (ЭК) в матриксе и ненаправленную миграцию ЭК *in vitro*. Эти эффекты были обусловлены изменением экспрессии генов и белков, связанных с ангиогенезом. В том числе было обнаружено повышение уровня регуляторов ангиогенеза Serpin E1, Serpin F1, IGFBP, VEGF и IL-8, а также повышалась транскрипция генов, кодирующих факторы роста с проангиогенной

активностью, включая *VEGF-c* и *VEGF-a*. Эти данные свидетельствовали о том, что микрогравитация может оказывать МСК-опосредованное влияние на функциональное состояние ЭК [63].

В той же работе мы обнаружили повышенную транскрипционную активность нейротрофического фактора головного мозга, BDNF [63], подтвердив выводы Chen et al. [112] об усилении дифференцировки МСК в нейрон-подобные клетки при ММГ. Дополнительно была изучена терапевтическая эффективность культивируемых в условиях микрогравитации МСК после ишемически-реперфузионного повреждения спинного мозга. Отмечено большее количество BDNF-положительных астроцитов, уменьшенное количество каспаза-3-положительных апоптотических клеток и восстановление моторики, что свидетельствует о положительном регенеративном влиянии МСК после ММГ [116].

Важным с точки зрения оценки сенесцентного состояния прогениторных клеток является исследование провоспалительной составляющей. При оценке влияния ММГ на TNF α -опосредованное праймирование МСК из жировой ткани показано, что ММГ сама по себе не вызывает изменений экспрессии ICAM-1 и HLA-ABC на мембране, которые можно рассматривать как маркеры провоспалительной активации клеток. При этом был зарегистрирован ослабленный ответ МСК на праймирование TNF α при действии ММГ, что проявлялось в снижении продукции TNF α -зависимых плейотропных цитокинов (IL-8 и MCP-1), протеаз, ремоделирующих матрикс, и подавлении некоторых генов, кодирующих факторы роста и цитокины [117].

Помимо провоспалительных цитокинов, изучено влияние моделирования микрогравитации в течение 10 дней на паракринную активность остеоккоммитированных и интактных МСК. Реакция клеток на ММГ зависела от степени коммитированности. Ответ остеоккоммитированных МСК был менее выражен и проявлялся в увеличении продукции склеростина, негативного регулятора остеобластогенеза. В интактных МСК выявлено снижение уровня остеопротегерина. Эти изменения могут лежать в основе смещения костного гомеостаза в сторону резорбции кости [118]. Напомним, что при клеточном старении уровень остеопротегерина увеличивался [104].

Таким образом, можно отметить, что ММГ приводит к увеличению секреции провоспалительного IL-8, который, в свою очередь, может усиливать продукцию зависимых от него фак-

торов, таких как VEGF. Как показывают эксперименты, подобные изменения в секретоме могут быть рассмотрены на предмет использования в регенеративной медицине для повышения нейро- и ангиогенеза. Известно, что провоспалительный SASP сенесцентных клеток также может оказывать позитивное влияние на регенерацию ткани, а потенциальные негативные последствия могут быть реализованы лишь при его хроническом воздействии. Тем не менее говорить о большем сходстве ММГ и старения в контексте секретомы пока преждевременно.

Внеклеточный матрикс. Помимо непосредственно клеток и их паракринных медиаторов, важную роль в функционировании ткани играет внеклеточный матрикс (ВКМ). Он в значительной степени различается в зависимости от локализации и является посредником в межклеточных взаимодействиях. Взаимодействие клетки с ВКМ необходимо для ее нормального функционирования, включая пролиферацию и дифференцировку [119, 120]. Различные компоненты ВКМ выполняют специфические функции. Протеогликаны за счет молекулярного строения и наличия большого количества заряженных групп задерживают воду, депонируют метаболиты и ростовые факторы [121]. Белковые компоненты, такие как коллаген и фибронектин, обеспечивают механические свойства ткани, необходимые клеткам для поддержания формы, а также для миграции. Вместе с другими белками ВКМ, такими как эластин и ламинин, они обеспечивают эластичность матрикса.

Литературные данные указывают на изменения ВКМ сенесцентных клеток, связанные с их катаболическим фенотипом. Показано повышение экспрессии протеолитических ферментов (матриксных металлопротеиназ, адамализинов, урокиназ и катепсинов) и снижение продукции структурных компонентов ВКМ (коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов). Это приводит к снижению эластичности тканей, повреждению базальной мембраны и увеличению жесткости ВКМ [122].

Основные направления исследований на данный момент заключаются в изучении эффектов ВКМ, продуцируемого молодыми и сенесцентными клетками, на функциональную активность клеточных элементов тканевой ниши. В работе Choi et al. [123] было показано, что сенесцентные фибробласты, которые высевались на ВКМ от фибробластов на ранних пассажах, обладали сниженной экспрессией SA- β -gal, также отмечалось снижение уровня свободных радикалов, восстановление потен-

циала митохондрий и удлинение теломер. И, наоборот, показано снижение пролиферации «молодых» фибробластов, культивируемых на ВКМ от сенесцентных клеток [123].

В исследовании на МСК из мышиног костного мозга молодых (3 недели) и старых (18 недель) особей было установлено изменение в свойствах ВКМ. МСК от молодых и старых мышей высевались на децеллюляризованный матрикс от соответствующих групп клеток. При этом на ВКМ от молодых МСК уровень АФК снижался на 30–50% и у молодых, и у сенесцентных МСК по сравнению со «старым» ВКМ или пластиком [124]. Также показано, что культивирование сенесцентных МСК из синовиальной жидкости на децеллюляризованном фетальном матриксе усиливает способность МСК к хондро- и адиподифференцировке [125].

С точки зрения гравирецепции комплекс ВКМ–интегрин–цитоскелет является механически чувствительной структурой, координирующей функциональное состояние клеток и тканей в гравитационном поле [68]. Группа Муоци исследовала дифференцировку при клино-статировании [106]. МСК костного мозга крыс культивировали в порах пористого гидроксиапатита кальция в течение 2 недель на 3D-клиностате. Активность щелочной фосфатазы (маркера остеобластной дифференцировки) была снижена на 40% по сравнению с контрольной группой. Имплантация композитов с МСК сингенным крысам показала, что костеобразование было значительно ниже при ММГ по сравнению с контрольной группой. Важно отметить, что при клино-статировании наблюдалось меньше внеклеточного матрикса. Вероятно, эти два факта могут быть связаны [106]. В более поздней работе отмечено, что ММГ увеличивала экспрессию молекул адгезии (ITGB1, CD44), протеазы MMP1 и одного из коллагенов (ColIII) в МСК. Известно, что MMP1 расщепляет интерстициальные коллагены, включая ColIII. Вероятно, авторы наблюдали реакцию компенсации. Экспрессия генов *FBN1* и *VIM* при этом была снижена. *FBN1* представляет собой гликопротеин внеклеточного матрикса и необходим для образования эластических волокон. *VIM* является основным промежуточным филаментом цитоскелета стромальных предшественников [126].

Недавние исследования в нашей лаборатории дополнили полученные ранее результаты. Показано, что 10-дневная экспозиция на RPM приводит к снижению содержания коллагеновых компонентов ВКМ, вероятно, за счет снижения синтеза коллагена и активации

протеаз. Представленные данные показывают, что ассоциированные с ВКМ молекулы как нативных, так и остеоккомитированных МСК могут участвовать в реорганизации костного матрикса во время космического полета [127].

Полетные эксперименты на Foton 10 продемонстрировали подавление основного структурного белка COL1A в остеобластной линии MG-63. В эксперименте на SJ-10 после 2 дней полета наблюдалось подавление нескольких генов, кодирующих структурные белки матрикса, и повышение экспрессии MMP1 в МСК костного мозга. Ингибирующее действие на COL1A2 было обнаружено в той же миссии через 5 дней. На основании бортовых экспериментов можно сделать вывод, что микрогравитация негативно влияет на структурные белки матрикса на транскрипционном уровне [128, 129].

Несложно проследить некоторую схожесть изменений при активации сенесценции и при ММГ. В обоих случаях продуцируется меньшее количество ВКМ и усиливается протеазная активность. Вероятно, существует связь между деградацией матрикса и остеогенной дифференцировкой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие физиологических/патофизиологических изменений у человека во время длительных космических полетов может являться проявлением «атрофического синдрома», описанного неоднократно G. Libertini [130]. Этот синдром характеризуется снижением способности клеток к удвоению, уменьшением числа клеток, заменой специфических клеток неспецифическими, гипертрофией оставшихся специфических клеток, изменением функционирования клеток с укороченными теломерами, изменением клеточного микроокружения в зависимости от состояния сенесцентных клеток [130]. Этот атрофический синдром, вызванный отсутствием опорной нагрузки, в настоящий момент является обратимым для условий полета не более года и при выполнении довольно широкого спектра профилактических мероприятий на борту орбитальных космических станций. Существуют ли пороговые значения снижения гравитации или предельно допустимое время пребывания в безопорной среде без средств профилактики, ниже которых основные физиологические системы будут терять свой функциональный потенциал по аналогии со старением, утверждать, на наш взгляд, невозможно.

Кроме этого, практически ничего не известно о влиянии микрогравитации на продолжительность жизни организмов различного уровня организации, включая млекопитающих.

Подводя некоторые итоги анализа влияния микрогравитации на клетки и сравнения выявленных эффектов с изменениями, ассоциированными со старением, необходимо отметить, что микрогравитация, вероятно, может инициировать начальные стадии стресс-индуцированных реакций. Некоторые рассмотренные работы прямо указывают на сходство механизмов, лежащих в основе ответа на микрогравитацию и сенесценцию. Даже при коротких экспозициях эти сдвиги могут вызвать снижения пролиферации, смещение направления дифференцировки, изменения секреторного профиля, включая паракринные медиаторы и ВКМ-ассоциированные молекулы. При этом, во-первых, остается открытым вопрос об обратимости сдвигов, обнаруженных при моделировании микрогравитации, поскольку обратимость этих сдвигов не позволит прямо говорить

о сенесценции. А, во-вторых, необходимо отметить, что подавляющее большинство экспериментальных исследований, доказывающих возможность активации сенесцентного состояния клеток *in vitro*, используют короткие экспозиции (24–72 ч), что явно недостаточно для реализации программы клеточного старения.

Вклад авторов. Л.Б. — исходная концепция, Л.Б. и А.Ю. — написание рукописи, сравнительный анализ обсуждаемых эффектов микрогравитации и старения.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ — ИМБП РАН (тема 65.3) и Российского научного фонда (грант № 21-75-10117) в равных долях.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Demontis, G. C., Germani, M. M., Caiani, E. G., Barravecchia, I., Passino, C., and Angeloni, D. (2017) Human pathophysiological adaptations to the space environment, *Front. Physiol.*, **8**, 547, doi: 10.3389/fphys.2017.00547.
- Tran, K. N., and Choi, J. I. (2022) Mimic microgravity effect on muscle transcriptome under ionizing radiation, *Life Sci. Space Res.*, **32**, 96–104, doi: 10.1016/j.lssr.2021.12.002.
- Patel, S. (2020) The effects of microgravity and space radiation on cardiovascular health: from low-Earth orbit and beyond, *Int. J. Cardiol. Heart Vasc.*, **30**, 100595, doi: 10.1016/j.ijcha.2020.100595.
- Vernikos, J., and Schneider, V. S. (2010) Space, gravity and the physiology of aging: parallel or convergent disciplines? A mini-review, *Gerontology*, **56**, 157–166, doi: 10.1159/000252852.
- Wang, E. (1999) Age-dependent atrophy and microgravity travel: what do they have in common? *FASEB J.*, **13**, S167–S174, doi: 10.1096/fasebj.13.9001.s167.
- Biolo, G., Heer, M., Narici, M., and Stollo, F. (2003) Microgravity as a model of ageing, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **6**, 31–40, doi: 10.1097/00075197-200301000-00006.
- Stollo, F., Gentile, S., Stollo, G., Mambro, A., and Vernikos, J. (2018) Recent progress in space physiology and aging, *Front. Physiol.*, **9**, 1551, doi: 10.3389/fphys.2018.01551.
- Burger, E. H., and Klein-Nulend, J. (1998) Microgravity and bone cell mechanosensitivity, *Bone*, **22**, 127S–130S, doi: 10.1016/s8756-3282(98)00010-6.
- Keune, J. A., Branscum, A. J., Iwaniec, U. T., and Turner, R. T. (2015) Effects of spaceflight on bone microarchitecture in the axial and appendicular skeleton in growing ovariectomized rats, *Sci. Rep.*, **5**, 18671, doi: 10.1038/srep18671.
- Gerbaix, M., Gnyubkin, V., Farlay, D., Olivier, C., Ammann, P., Courbon, G., Laroche, N., Genthial, R., Follet, H., Peyrin, F., Shenkman, B., Gauquelin-Koch, G., and Vico, L. (2017) One-month spaceflight compromises the bone microstructure, tissue-level mechanical properties, osteocyte survival and lacunae volume in mature mice skeletons, *Sci. Rep.*, **7**, 2659, doi: 10.1038/s41598-017-03014-2.
- Stavnichuk, M., Mikolajewicz, N., Corlett, T., Morris, M., and Komarova, S. V. (2020) A systematic review and meta-analysis of bone loss in space travelers, *NPJ Microgravity*, **6**, 13, doi: 10.1038/s41526-020-0103-2.
- Crucian, B., Simpson, R. J., Mehta, S., Stowe, R., Chouker, A., Hwang, S. A., Actor, J. K., Salam, A. P., Pierson, D., and Sams, C. (2014) Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation, *Brain Behav. Immun.*, **39**, 23–32, doi: 10.1016/j.bbi.2014.01.011.
- Sofronova, S. I., Tarasova, O. S., Gaynullina, D., Borzykh, A. A., Behnke, B. J., Stabley, J. N.,

- McCullough, D. J., Maraj, J. J., Hanna, M., Muller-Delp, J. M., Vinogradova, O. L., and Delp, M. D. (2015) Spaceflight on the Bion-M1 biosatellite alters cerebral artery vasomotor and mechanical properties in mice, *J. Appl. Physiol.*, **118**, 830-838, doi: 10.1152/japplphysiol.00976.2014.
14. Hughson, R. L., Yee, N. J., and Greaves, D. K. (2016) Elevated end-tidal Pco₂ during long-duration spaceflight, *Aerospace Med. Hum. Perform.*, **87**, 894-897, doi: 10.3357/AMHP.4598.2016.
15. Shen, H., Lim, C., Schwartz, A. G., Andreev-Andrievskiy, A., Deymier, A. C., and Thomopoulos, S. (2017) Effects of spaceflight on the muscles of the murine shoulder, *FASEB J.*, **31**, 5466-5477, doi: 10.1096/fj.201700320R.
16. Novikov, V. E., and Ilyin, E. A. (1981) Age-related reactions of rat bones to their unloading, *Aviat. Space Environ. Med.*, **52**, 551-553.
17. Strollo, F., Riondino, G., Harris, B., Strollo, G., Casarosa, E., Mangrossa, N., Ferretti, C., and Luisi, M. (1998) The effect of microgravity on testicular androgen secretion, *Aviat. Space Environ. Med.*, **69**, 133-136.
18. Blaber, E. A., Dvorochkin, N., Lee, C., Alwood, J. S., Yousuf, R., Pianetta, P., Globus, R. K., Burns, B. P., and Almeida, E. A. (2013) Microgravity induces pelvic bone loss through osteoclastic activity, osteocytic osteolysis, and osteoblastic cell cycle inhibition by CDKN1a/p21, *PLoS One*, **8**, e61372, doi: 10.1371/journal.pone.0061372.
19. Luxton, J. J., McKenna, M. J., Lewis, A., Taylor, L. E., George, K. A., Dixit, S. M., Moniz, M., Benegas, W., Mackay, M. J., Mozsary, C., Butler, D., Bezdan, D., Meydan, C., Crucian, B. E., Zwart, S. R., Smith, S. M., Mason, C. E., and Bailey, S. M. (2020) Telomere length dynamics and DNA damage responses associated with long-duration spaceflight, *Cell Rep.*, **33**, 108457, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108457.
20. Zhuikova, S. E., and Nagovitsyn, R. S. (2021) Influence of running on some physiological and molecular biological markers of human aging, *Hum. Physiol.*, **47**, 587-594, doi: 10.1134/S0362119721050133.
21. Simoes, H. G., Sousa, C. V., Dos Santos Rosa, T., da Silva Aguiar, S., Deus, L. A., Rosa, E. C. C. C., Amato, A. A., and Andrade, R. V. (2017) Longer telomere length in elite master sprinters: relationship to performance and body composition, *Int. J. Sports Med.*, **38**, 1111-1116, doi: 10.1055/s-0043-120345.
22. Prasad, B., Grimm, D., Strauch, S. M., Erzinger, G. S., Corydon, T. J., Lebert, M., Magnusson, N. E., Infanger, M., Richter, P., and Krüger, M. (2020) Influence of microgravity on apoptosis in cells, tissues, and other systems *in vivo* and *in vitro*, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9373, doi: 10.3390/ijms21249373.
23. Fernando, H. J., and Bowers, D. (2021) Neuroendocrine Theory of Aging, in *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging* (Gu, D., and Dupre, M. E., eds) Springer, Cham, doi: 10.1007/978-3-030-22009-9_673.
24. Dilman, V. M., Revskoy, S. Y., and Golubev, A. G. (1986) Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integrated theory of aging, *Int. Rev. Neurobiol.*, **28**, 89-156, doi: 10.1016/s0074-7742(08)60107-5.
25. Olovnikov, A. (2005) Lunasensor, infradian rhythms, telomeres, and the chronomere program of aging, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1057**, 112-132, doi: 10.1196/annals.1356.006.
26. Olovnikov, A. M. (2015) Chronographic theory of development, aging, and origin of cancer: role of chromomeres and printomeres, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 76-88, doi: 10.2174/1874609808666150422114916.
27. Olovnikov, A. M. (2022) Planetary metronome as a regulator of lifespan and aging rate: the metronomic hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1640-1650, doi: 10.1134/S0006297922120197.
28. Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.*, **14**, R115, doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115.
29. Petkovich, D. A., Podolskiy, D. I., Lobanov, A. V., Lee, S. G., Miller, R. A., and Gladyshev, V. N. (2017) Using DNA methylation profiling to evaluate biological age and longevity interventions, *Cell Metab.*, **25**, 954-960.e6, doi: 10.1016/j.cmet.2017.03.016.
30. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging, *Cell*, **153**, 1194-1217, doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
31. McHugh, D., and Gil, J. (2018) Senescence and aging: causes, consequences, and therapeutic avenues, *J. Cell Biol.*, **217**, 65-77, doi: 10.1083/jcb.201708092.
32. Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 729-740, doi: 10.1038/nrm2233.
33. Ratushnyy, A. Y., Rudimova, Y. V., and Buravkova, L. B. (2020) Replicative senescence and expression of autophagy genes in mesenchymal stromal cells, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1169-1177, doi: 10.1134/S0006297920100053.
34. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2010) The essence of senescence, *Genes Dev.*, **24**, 2463-2479, doi: 10.1101/gad.1971610.
35. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014) Cellular senescence and its effector programs, *Genes Dev.*, **28**, 99-114, doi: 10.1101/gad.235184.113.
36. Ratushnyy, A. Y., and Buravkova, L. B. (2020) Cell senescence and mesenchymal stromal cells, *Hum. Physiol.*, **46**, 85-93, doi: 10.1134/S0362119720010132.
37. Imai, S., and Guarente, L. (2014) NAD⁺ and sirtuins in aging and disease, *Trends Cell Biol.*, **24**, 464-471, doi: 10.1016/j.tcb.2014.04.002.
38. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I.,

- and Pereira-Smith, O. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9363-9367, doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
39. Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence, *Cell*, **113**, 703-716, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00401-x.
 40. Collado, M., Blasco, M. A., and Serrano, M. (2007) Cellular senescence in cancer and aging, *Cell*, **130**, 223-233, doi: 10.1016/j.cell.2007.07.003.
 41. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
 42. Jun, J. I., and Lau, L. F. (2010) The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 676-685, doi: 10.1038/ncb2070.
 43. Noronha, N. C., Mizukami, A., Caliari-Oliveira, C., Cominal, J. G., Rocha, J. L. M., Covas, D. T., Swiech, K., and Malmegrim, K. C. R. (2019) Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies, *Stem Cell Res. Ther.*, **10**, 131, doi: 10.1186/s13287-019-1224-y.
 44. Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res.*, **25**, 585-621, doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
 45. Olovnikov, A. M. (1971) Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **201**, 1496-1499.
 46. Vettorelli, S., and Passos, J. F. (2017) Telomeres and cell senescence – size matters not, *EBioMedicine*, **21**, 14-20, doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.027.
 47. De Magalhães, J. P., and Passos, J. F. (2018) Stress, cell senescence and organismal ageing, *Mech. Ageing Dev.*, **170**, 2-9, doi: 10.1016/j.mad.2017.07.001.
 48. Gruber, J., Schaffer, S., and Halliwell, B. (2008) The mitochondrial free radical theory of ageing – where do we stand? *Front. Biosci.*, **13**, 6554-6579, doi: 10.2741/3174.
 49. Vizioli, M. G., Liu, T., Miller, K. N., Robertson, N. A., Gilroy, K., Lagnado, A. B., Perez-Garcia, A., Kiourtis, C., Dasgupta, N., Lei, X., Kruger, P. J., Nixon, C., Clark, W., Jurk, D., Bird, T. G., Passos, J. F., Berger, S. L., Dou, Z., and Adams, P. D. (2020) Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence, *Genes Dev.*, **34**, 428-445, doi: 10.1101/gad.331272.119.
 50. Von Zglinicki, T. (2002) Oxidative stress shortens telomeres, *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 339-344, doi: 10.1016/s0968-0004(02)02110-2.
 51. Campisi, J. (2013) Aging, cellular senescence, and cancer, *Annu. Rev. Physiol.*, **75**, 685-705, doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653.
 52. Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev.*, **13**, 1501-1512, doi: 10.1101/gad.13.12.1501.
 53. Sherr, C. J., and McCormick, F. (2002) The RB and p53 pathways in cancer, *Cancer Cell*, **2**, 103-112, doi: 10.1016/s1535-6108(02)00102-2.
 54. Tharp, K. M., Higuchi-Sanabria, R., Timblin, G. A., Ford, B., Garzon-Coral, C., Schneider, C., Muncie, J. M., Stashko, C., Daniele, J. R., Moore, A. S., Frankino, P. A., Homentcovschi, S., Manoli, S. S., Shao, H., Richards, A. L., Chen, K. H., Hoeve, J. T., Ku, G. M., Hellerstein, M., Nomura, D. K., et al. (2021) Adhesion-mediated mechanosignaling forces mitohormesis, *Cell Metab.*, **33**, 1322-1341.e13, doi: 10.1016/j.cmet.2021.04.017.
 55. Duan, J. L., Ruan, B., Song, P., Fang, Z. Q., Yue, Z. S., Liu, J. J., Dou, G. R., Han, H., and Wang, L. (2022) Shear stress-induced cellular senescence blunts liver regeneration through Notch-sirtuin 1-P21/P16 axis, *Hepatology*, **75**, 584-599, doi: 10.1002/hep.32209.
 56. Van Loon, J. W. A. (2007) Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research, *Adv. Space Res.*, **39**, 1161-1165, doi: 10.1016/j.asr.2007.02.016.
 57. Kopp, S., Warnke, E., Wehland, M., Aleshcheva, G., Magnusson, N. E., Hemmersbach, R., Corydon, T. J., Bauer, J., Infanger, M., and Grimm, D. (2015) Mechanisms of three-dimensional growth of thyroid cells during long-term simulated microgravity, *Sci. Rep.*, **5**, 16691, doi: 10.1038/srep16691.
 58. Wuest, S. L., Richard, S., Kopp, S., Grimm, D., and Egli, M. (2015) Simulated microgravity: critical review on the use of random positioning machines for mammalian cell culture, *BioMed Res. Int.*, **2015**, 971474, doi: 10.1155/2015/971474.
 59. Wang, J., Zhang, J., Bai, S., Wang, G., Mu, L., Sun, B., Wang, D., Kong, Q., Liu, Y., Yao, X., Xu, Y., and Li, H. (2009) Simulated microgravity promotes cellular senescence via oxidant stress in rat PC12 cells, *Neurochem. Int.*, **55**, 710-716, doi: 10.1016/j.neuint.2009.07.002.
 60. Kapitonova, M. Y., Muid, S., Froemming, G. R., Yusoff, W. N., Othman, S., Ali, A. M., and Nawawi, H. M. (2012) Real space flight travel is associated with ultrastructural changes, cytoskeletal disruption and premature senescence of HUVEC, *Malays. J. Pathol.*, **34**, 103-113.
 61. Ulbrich, C., Wehland, M., Pietsch, J., Aleshcheva, G., Wise, P., van Loon, J., Magnusson, N., Infanger, M., Grosse, J., Eilles, C., Sundaresan, A., and Grimm, D. (2014) The impact of simulated and real microgravity on bone cells and mesenchymal stem cells, *BioMed Res. Int.*, **2014**, 928507, doi: 10.1155/2014/928507.
 62. Winkelmanier, G., Jabbari, K., Chien, L. C., Grabham, P., Parvin, B., and Pluth, J. (2023) Influence of simulated microgravity on mammary epithelial cells grown

- as 2D and 3D cultures, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 7615, doi: 10.3390/ijms24087615.
63. Ratushnyy, A., Ezdakova, M., Yakubets, D., and Buravkova, L. (2018) Angiogenic activity of human adipose-derived mesenchymal stem cells under simulated microgravity, *Stem Cells Dev.*, **27**, 831-837, doi: 10.1089/scd.2017.0262.
 64. Ingber, D. E. (2003) Mechanobiology and diseases of mechanotransduction, *Ann. Med.*, **35**, 564-577, doi: 10.1080/07853890310016333.
 65. Louis, F., Deroanne, C., Nusgens, B., Vico, L., and Guignandon, A. (2015) RhoGTPases as key players in mammalian cell adaptation to microgravity, *BioMed Res. Int.*, **2015**, 747693, doi: 10.1155/2015/747693.
 66. Mao, X., Chen, Z., Luo, Q., Zhang, B., and Song, G. (2016) Simulated microgravity inhibits the migration of mesenchymal stem cells by remodeling actin cytoskeleton and increasing cell stiffness, *Cytotechnology*, **68**, 2235-2243, doi: 10.1007/s10616-016-0007-x.
 67. Ratushnyy, A. Y., and Buravkova, L. B. (2017) Expression of focal adhesion genes in mesenchymal stem cells under simulated microgravity, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **477**, 354-356, doi: 10.1134/S1607672917060035.
 68. Buravkova, L., Larina, I., Andreeva, E., and Grigoriev, A. (2021) Microgravity effects on the matrix, *Cells*, **10**, 2226, doi: 10.3390/cells10092226.
 69. Dinarelli, S., Longo, G., Dietler, G., Francioso, A., Mosca, L., Pannitteri, G., Boumis, G., Bellelli, A., and Girasole, M. (2018) Erythrocyte's aging in microgravity highlights how environmental stimuli shape metabolism and morphology, *Sci. Rep.*, **8**, 5277, doi: 10.1038/s41598-018-22870-0.
 70. Takahashi, H., Nakamura, A., and Shimizu, T. (2021) Simulated microgravity accelerates aging of human skeletal muscle myoblasts at the single cell level, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **578**, 115-121, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.09.037.
 71. Acharya, A., Nemade, H., Papadopoulos, S., Hescheler, J., Neumaier, F., Schneider, T., Rajendra Prasad, K., Khan, K., Hemmersbach, R., Gusmao, E. G., Mizi, A., Papantonis, A., and Sachinidis, A. (2022) Microgravity-induced stress mechanisms in human stem cell-derived cardiomyocytes, *iScience*, **25**, 104577, doi: 10.1016/j.isci.2022.104577.
 72. Singh, R., Rajput, M., and Singh, R. P. (2021) Simulated microgravity triggers DNA damage and mitochondria-mediated apoptosis through ROS generation in human promyelocytic leukemic cells, *Mitochondrion*, **61**, 114-124, doi: 10.1016/j.mito.2021.09.006.
 73. Kossmehl, P., Shakibaei, M., Cogoli, A., Infanger, M., Curcio, F., Schönberger, J., Eilles, C., Bauer, J., Pickenhahn, H., Schulze-Tanzil, G., Paul, M., and Grimm, D. (2003) Weightlessness induced apoptosis in normal thyroid cells and papillary thyroid carcinoma cells via extrinsic and intrinsic pathways, *Endocrinology*, **144**, 4172-4179, doi: 10.1210/en.2002-0171.
 74. Ran, F., An, L., Fan, Y., Hang, H., and Wang, S. (2016) Simulated microgravity potentiates generation of reactive oxygen species in cells, *Biophys. Rep.*, **2**, 100-105, doi: 10.1007/s41048-016-0029-0.
 75. Greco, O., Durante, M., Gialanella, G., Grossi, G., Pugliese, M., Scamporrì, P., Snigiryova, G., and Obe, G. (2003) Biological dosimetry in Russian and Italian astronauts, *Adv. Space Res.*, **31**, 1495-1503, doi: 10.1016/s0273-1177(03)00087-5.
 76. Lu, T., Zhang, Y., Kidane, Y., Feiveson, A., Stodieck, L., Karouia, F., Ramesh, G., Rohde, L., and Wu, H. (2017) Cellular responses and gene expression profile changes due to bleomycin-induced DNA damage in human fibroblasts in space, *PLoS One*, **12**, e0170358, doi: 10.1371/journal.pone.0170358.
 77. Murphy, M. B., Moncivais, K., and Caplan, A. I. (2013) Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine, *Exp. Mol. Med.*, **45**, e54, doi: 10.1038/emmm.2013.94.
 78. Spees, J. L., Lee, R. H., and Gregory, C. A. (2016) Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function, *Stem Cell Res. Ther.*, **7**, 125, doi: 10.1186/s13287-016-0363-7.
 79. Andreeva, E., Bobyleva, P., Gornostaeva, A., and Buravkova, L. (2017) Interaction of multipotent mesenchymal stromal and immune cells: bidirectional effects, *Cytotherapy*, **19**, 1152-1166, doi: 10.1016/j.jcyt.2017.07.001.
 80. Fujii, S., and Miura, Y. (2022) Immunomodulatory and regenerative effects of MSC-derived extracellular vesicles to treat acute GVHD, *Stem Cells*, **40**, 977-990, doi: 10.1093/stmcls/sxac057.
 81. Lv, W., Peng, X., Tu, Y., Shi, Y., Song, G., and Luo, Q. (2023) YAP inhibition alleviates simulated microgravity-induced mesenchymal stem cell senescence via targeting mitochondrial dysfunction, *Antioxidants*, **12**, 990, doi: 10.3390/antiox12050990.
 82. Moretta, L., Uccelli, A., and Pistoia, V. (2015) Mesenchymal stromal cells and immunity: Introductory overview, *Immunol. Lett.*, **168**, 127-128, doi: 10.1016/j.imlet.2015.08.010.
 83. Yatagai, F., Honma, M., Dohmae, N., and Ishioka, N. (2019) Biological effects of space environmental factors: A possible interaction between space radiation and microgravity, *Life Sci. Space Res.*, **20**, 113-123, doi: 10.1016/j.lssr.2018.10.004.
 84. Moya, I. M., and Halder, G. (2019) Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 211-226, doi: 10.1038/s41580-018-0086-y.
 85. Pobbati, A. V., and Hong, W. (2020) A combat with the YAP/TAZ-TEAD oncoproteins for cancer therapy, *Theranostics*, **10**, 3622-3635, doi: 10.7150/thno.40889.
 86. Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., Dananberg, J., and van Deursen, J. M.

- (2017) Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **16**, 718-735, doi: 10.1038/nrd.2017.116.
87. Xie, Q., Chen, J., Feng, H., Peng, S., Adams, U., Bai, Y., Huang, L., Li, J., Huang, J., Meng, S., and Yuan, Z. (2013) YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence, *Cancer Res.*, **73**, 3615-3624, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3793.
 88. Yeung, Y. T., Guerrero-Castilla, A., Cano, M., Muñoz, M. F., Ayala, A., and Argüelles, S. (2019) Dysregulation of the hippo pathway signaling in aging and cancer, *Pharmacol. Res.*, **143**, 151-165, doi: 10.1016/j.phrs.2019.03.018.
 89. Pala, R., Cruciani, S., Manca, A., Garroni, G., El Faqir, M. A., Lentini, V., Capobianco, G., Pantaleo, A., and Maioli, M. (2023) Mesenchymal stem cell behavior under microgravity: from stress response to a premature senescence, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 7753, doi: 10.3390/ijms24097753.
 90. Turinetto, V., Vitale, E., and Giachino, C. (2016) Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1164, doi: 10.3390/ijms17071164.
 91. Li, Y., Wu, Q., Wang, Y., Li, L., Bu, H., and Bao, J. (2017) Senescence of mesenchymal stem cells (Review), *Int. J. Mol. Sci.*, **39**, 775-782, doi: 10.3892/ijmm.2017.2912.
 92. Merzlikina, N. V., Buravkova, L. B., and Romanov, Y. A. (2004) The primary effects of clinorotation on cultured human mesenchymal stem cells, *J. Gravitat. Physiol.*, **11**, P193-P194.
 93. Gershovich, J. G., and Buravkova, L. B. (2007) Morphofunctional status and osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stromal precursor cells during in vitro modeling of microgravity effects, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **144**, 608-613, doi: 10.1007/s10517-007-0387-1.
 94. Dai, Z. Q., Wang, R., Ling, S. K., Wan, Y. M., and Li, Y. H. (2007) Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells, *Cell Prolif.*, **40**, 671-684, doi: 10.1111/j.1365-2184.2007.00461.x.
 95. Yuge, L., Kajiume, T., Tahara, H., Kawahara, Y., Umeda, C., Yoshimoto, R., Wu, S. L., Yamaoka, K., Asashima, M., Kataoka, K., and Ide, T. (2006) Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation, *Stem Cells Dev.*, **15**, 921-929, doi: 10.1089/scd.2006.15.921.
 96. Ratushnyy, A. Yu., and Buravkova, L. B. (2016) Functional state of multipotent mesenchymal stromal cells during modeling the effects of microgravity [in Russian], *Aviakosm. Ekol. Med.*, **50**, 24-29.
 97. Nakamura, H., Kumei, Y., Morita, S., Shimokawa, H., Ohya, K., and Shinomiya, K. (2003) Antagonism between apoptotic (Bax/Bcl-2) and anti-apoptotic (IAP) signals in human osteoblastic cells under vector-averaged gravity condition, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1010**, 143-147, doi: 10.1196/annals.1299.023.
 98. Kim, M., Kim, C., Choi, Y. S., Kim, M., Park, C., and Suh, Y. (2012) Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects, *Mech. Ageing Dev.*, **133**, 215-225, doi: 10.1016/j.mad.2012.03.014.
 99. Despars, G., Carbonneau, C. L., Bardeau, P., Coutu, D. L., and Beauséjour, C. M. (2013) Loss of the osteogenic differentiation potential during senescence is limited to bone progenitor cells and is dependent on p53, *PLoS One*, **8**, e73206, doi: 10.1371/journal.pone.0073206.
 100. Yang, Y. K., Ogando, C. R., Wang See, C., Chang, T. Y., and Barabino, G. A. (2018) Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging *in vitro*, *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 131, doi: 10.1186/s13287-018-0876-3.
 101. Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., and Ho, A. D. (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process, *PLoS One*, **3**, e2213, doi: 10.1371/journal.pone.0002213.
 102. Digirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., and Prockop, D. J. (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate, *Br. J. Haematol.*, **107**, 275-281, doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01715.x.
 103. Cheng, H., Qiu, L., Ma, J., Zhang, H., Cheng, M., Li, W., Zhao, X., and Liu, K. (2011) Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts, *Mol. Biol. Rep.*, **38**, 5161-5168, doi: 10.1007/s11033-010-0665-2.
 104. Ratushnyy, A. Yu., and Buravkova, L. B. (2022) Differentiation potential of the mesenchymal stromal cells during replicative senescence [in Russian], *Aviakosm. Ekol. Med.*, **56**, 64-69.
 105. Buravkova, L. B., Gershovich, P. M., Gershovich, J. G., and Grigor'ev, A. I. (2010) Mechanisms of gravitational sensitivity of osteogenic precursor cells, *Acta Naturae*, **2**, 28-36, doi: 10.32607/actanaturae.10734.
 106. Nishikawa, M., Ohgushi, H., Tamai, N., Osuga, K., Uemura, M., Yoshikawa, H., and Myoui, A. (2005) The effect of simulated microgravity by three-dimensional clinostat on bone tissue engineering, *Cell Transplant.*, **14**, 829-835, doi: 10.3727/000000005783982477.
 107. Zayzafoon, M., Gathings, W. E., and McDonald, J. M. (2004) Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis, *Endocrinology*, **145**, 2421-2432, doi: 10.1210/en.2003-1156.

108. Buravkova, L. B., Gershovich, P. M., Gershovich, J. G., and Grigoriev, A. I. (2013) Microgravity and mesenchymal stem cell response, *Curr. Biotechnol.*, **2**, 217-225, doi: 10.2174/22115501113029990016.
109. Saxena, R., Pan, G., and McDonald, J. M. (2007) Osteoblast and osteoclast differentiation in modeled microgravity, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1116**, 494-498, doi: 10.1196/annals.1402.033.
110. Meyers, V. E., Zayzafoon, M., Gonda, S. R., Gathings, W. E., and McDonald, J. M. (2004) Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J. Cell. Biochem.*, **93**, 697-707, doi: 10.1002/jcb.20229.
111. Sheyn, D., Pelled, G., Netanel, D., Domany, E., and Gazit, D. (2010) The effect of simulated microgravity on human mesenchymal stem cells cultured in an osteogenic differentiation system: a bioinformatics study, *Tissue Eng. Part A*, **16**, 3403-3412, doi: 10.1089/ten.tea.2009.0834.
112. Chen, J., Liu, R., Yang, Y., Li, J., Zhang, X., Li, J., Wang, Z., and Ma, J. (2011) The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons, *Neurosci. Lett.*, **505**, 171-175, doi: 10.1016/j.neulet.2011.10.014.
113. Xue, L., Li, Y., and Chen, J. (2017) Duration of simulated microgravity affects the differentiation of mesenchymal stem cells, *Mol. Med. Rep.*, **15**, 3011-3018, doi: 10.3892/mmr.2017.6357.
114. Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression, *Annu. Rev. Pathol.*, **5**, 99-118, doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
115. Gershovich, Iu. G., and Buravkova, L. B. (2009) Interleukine production in culture of mesenchymal stromal cells of humans during simulation of the microgravity effects [in Russian], *Aviakosm. Ecol. Med.*, **43**, 44-50.
116. Kurose, T., Takahashi, S., Otsuka, T., Nakagawa, K., Imura, T., Sueda, T., and Yuge, L. (2019) Simulated microgravity-cultured mesenchymal stem cells improve recovery following spinal cord ischemia in rats, *Stem Cell Res.*, **41**, 101601, doi: 10.1016/j.scr.2019.101601.
117. Ratushnyy, A., Yakubets, D., Andreeva, E., and Buravkova, L. (2019) Simulated microgravity modulates the mesenchymal stromal cell response to inflammatory stimulation, *Sci. Rep.*, **9**, 9279, doi: 10.1038/s41598-019-45741-8.
118. Zhivodernikov, I. V., Ratushnyy, A. Y., and Buravkova, L. B. (2021) Secretory activity of mesenchymal stromal cells with different degree of commitment under conditions of simulated microgravity, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **170**, 560-564, doi: 10.1007/s10517-021-05106-6.
119. Aamodt, J. M., and Grainger, D. W. (2016) Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response, *Biomaterials*, **86**, 68-82, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.003.
120. Choudhury, D., Tun, H. W., Wang, T., and Naing, M. W. (2018) Organ-derived decellularized extracellular matrix: a game changer for bioink manufacturing? *Trends Biotechnol.*, **36**, 787-805, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.03.003.
121. Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D., and Ozbolat, I. T. (2017) The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials, *Biotechnol. Adv.*, **35**, 217-239, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.12.006.
122. Mavrogenatou, E., Pratsinis, H., Papadopoulou, A., Karamanos, N. K., and Kletsas, D. (2019) Extracellular matrix alterations in senescent cells and their significance in tissue homeostasis, *Matrix Biol.*, **75-76**, 27-42, doi: 10.1016/j.matbio.2017.10.004.
123. Choi, H. R., Cho, K. A., Kang, H. T., Lee, J. B., Kaerberlein, M., Suh, Y., Chung, I. K., and Park, S. C. (2011) Restoration of senescent human diploid fibroblasts by modulation of the extracellular matrix, *Aging Cell*, **10**, 148-157, doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00654.x.
124. Sun, Y., Li, W., Lu, Z., Chen, R., Ling, J., Ran, Q., Jilka, R. L., and Chen, X. D. (2011) Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix, *FASEB J.*, **25**, 1474-1485, doi: 10.1096/fj.10-161497.
125. Lynch, K., and Pei, M. (2014) Age associated communication between cells and matrix: a potential impact on stem cell-based tissue regeneration strategies, *Organogenesis*, **10**, 289-298, doi: 10.4161/15476278.2014.970089.
126. Ebnerasuly, F., Hajebrahimi, Z., Tabaie, S. M., and Darbouy, M. (2018) Simulated microgravity condition alters the gene expression of some ECM and adhesion molecules in adipose derived stem cells, *Int. J. Mol. Cell. Med.*, **7**, 146-157, doi: 10.22088/IJMCMBUMS.7.3.146.
127. Zhivodernikov, I., Ratushnyy, A., and Buravkova, L. (2021) Simulated microgravity remodels extracellular matrix of osteocommitted mesenchymal stromal cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5428, doi: 10.3390/ijms22115428.
128. Carmeliet, G., Nys, G., and Bouillon, R. (1997) Microgravity reduces the differentiation of human osteoblastic MG-63 cells, *J. Bone Min. Res.*, **12**, 786-794, doi: 10.1359/jbmr.1997.12.5.786.
129. Zhang, C., Li, L., Jiang, Y., Wang, C., Geng, B., Wang, Y., Chen, J., Liu, F., Qiu, P., Zhai, G., Chen, P., Quan, R., and Wang, J. (2018) Space microgravity drives transdifferentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells from osteogenesis to adipogenesis, *FASEB J.*, **32**, 4444-4458, doi: 10.1096/fj.201700208RR.
130. Libertini, G. (2014) The programmed aging paradigm: how we get old, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1004-1016, doi: 10.1134/S0006297914100034.

MICROGRAVITY EFFECTS AND AGING PHYSIOLOGY: SIMILAR CHANGES OR COMMON MECHANISMS?

Review

A. Yu. Ratushnyy and L. B. Buravkova*

*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences,
123007 Moscow, Russia; e-mail: buravkova@imbp.ru*

Despite the use of preventive measures (including intense physical activity), cosmonauts and astronauts develop muscle atony and atrophy, insufficiency of the cardiovascular system, osteopenia, etc. All these changes, reminiscent of age-related physiological changes, occur in a healthy person in microgravity quite quickly – within a few months. Adaptation to the absence of gravity leads to the symptoms of aging, which are compensated after returning to Earth. The prospect of interplanetary flights raises the question of gravity thresholds, below which the main physiological systems will lose their functional potential, similar to aging, and affect life expectancy. An important role in the aging process belongs to the body's cellular reserve – progenitor cells, which are involved in physiological remodeling and regenerative/reparative processes of all physiological systems. With age, progenitor cell count and the regenerative potential decreases. Moreover, their paracrine spectrum becomes pro-inflammatory during replicative senescence, disrupting tissue homeostasis. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are mechanosensitive, and therefore the absence of a gravitational stimulus causes serious changes in their functional status. The review compares the cellular effects of microgravity and changes developing in senescent cells, including stromal precursors.

Keywords: microgravity, aging, cell senescence, mesenchymal stromal cells (MSCs)

АКТУАРНАЯ СКОРОСТЬ СТАРЕНИЯ В КОГОРТАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 Л.А. Гаврилов^{1,2*}, Н.С. Гаврилова^{1,2}

¹ NORC at the University of Chicago, 60637 Chicago, IL, USA

² Институт демографических исследований, ФНИСЦ РАН,
109028 Москва, Россия; электронная почта: lagavril@yahoo.com

Поступила в редакцию 01.08.2023

После доработки 08.10.2023

Принята к публикации 09.10.2023

Скорость старения является важной характеристикой процесса старения человека. Попытки измерить темпы старения с помощью параметра наклона в уравнении Гомперца привели к выводу, что актуарная скорость старения оставалась стабильной на протяжении большей части XX века, но в последнее время демонстрирует рост в большинстве изученных популяций. Эти результаты были получены с использованием поперечных данных о смертности, а не путём анализа смертности реальных когорт рождения. В данном исследовании мы проанализировали исторические изменения актуарной скорости старения в когортах человека. Параметры уравнения Гомперца оценивались в возрастном интервале 50–80 лет с использованием данных о по возрасту коэффициентах смертности в одногодичных когортах из Human Mortality Database (HMD). Всего были проанализированы данные по 2294 когортам мужчин и женщин для 76 популяций. Анализ исторических трендов параметра наклона уравнения Гомперца в изученных когортах выявил две различные закономерности изменения актуарной скорости старения. В странах Восточной Европы с более высокой смертностью показатели актуарной скорости старения демонстрируют постоянное снижение, начиная с когорты рождённых в 1910 по 1940 г. В странах Западной Европы с более низкой смертностью, а также в Австралии, Канаде, Японии, Новой Зеландии и США актуарная скорость старения снижалась, начиная с когорты, рождённой в 1910 г., до когорты, рождённой приблизительно в 1930 г., а затем росла. В целом, в 50 из 76 исследованных популяций (68%) актуарная скорость старения демонстрирует тенденцию к снижению с течением времени. Впервые было проверено и подтверждено существование компенсационного эффекта смертности (КЭС) и оценена видовая продолжительность жизни в когортах человека. При этом оценки видовой продолжительности жизни человека для когорты были близки к оценкам, полученным для поперечных данных, опубликованных ранее.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, смертность, компенсационный эффект смертности, видовая продолжительность жизни, скорость старения.

DOI: 10.31857/S0320972523110106, **EDN:** MLPLLP

ВВЕДЕНИЕ

Исследования по возрасту траекторий смертности и, в частности, актуарной скорости старения важны для понимания фундаментальной биологии старения и разработки реальных мер замедления старения [1]. Скорость старения часто оценивают как коэффициент наклона в уравнении Гомперца, описывающем экспоненциальный рост смертности с возрастом [2, 3]. Полученную таким образом скорость старения называют актуарной скоростью старения. Такой подход выглядит разум-

ным, поскольку гипотетические нестареющие популяции имеют коэффициент наклона, равный нулю, а также поскольку этот параметр наклона характеризует скорость увеличения смертности с возрастом.

Предыдущие исследования актуарной скорости старения человека показали тенденцию к её увеличению в течение последних 30 лет в большинстве стран [2, 3]. Эти результаты, полученные для современных популяций, выглядят неожиданными, учитывая продолжающееся снижение смертности среди взрослого населения. Надёжная теория старения указывает, что коэффициент наклона в уравнении Гомперца определяется не только скоростью потери функции с возрастом («истинная скорость старения»), но и исходными уровнями

Принятые сокращения: КЭС — компенсационный эффект смертности.

* Адресат для корреспонденции.

избыточности (начальными резервными возможностями организма) [1, 4]. Таким образом, актуарная скорость старения определяется не только внутренним ухудшением состояния органов и тканей, но и другими факторами, включая воздействие окружающей среды.

Значения актуарной скорости старения различны в разных популяциях и организованы таким образом, что более низкая исходная смертность компенсируется более быстрым её ростом с возрастом. Это означает, что высокие исходные показатели смертности в неблагополучных популяциях (внутри данного вида) компенсируются низкой величиной актуарной скорости старения (более длительным периодом удвоения смертности). В результате этой компенсации уровни смертности имеют тенденцию к сближению в старшем возрасте [1]. Это явление получило название компенсационного эффекта смертности (КЭС) [2].

Ранее мы исследовали исторические изменения актуарной скорости старения и КЭС, используя поперечные данные о смертности [2]. Однако этот подход подвергся конструктивной критике, и поступила рекомендация изучать КЭС на когортных данных [5]. В данной статье эта критика принята во внимание, и исследуются исторические изменения актуарной скорости старения и КЭС с использованием когортных данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Одной из целей данного исследования является анализ изменения актуарной скорости старения со временем и проверка существования КЭС в когортах человека. Подобный анализ когортных данных до сих пор не проводился, и все предыдущие исследования актуарной скорости старения и КЭС выполнялись с использованием поперечных данных [1–3, 6].

Методы. На первом этапе анализа были рассчитаны параметры R_0 и α уравнения Гомперца (1):

$$\mu(x) = R_0 \exp(\alpha x), \quad (1)$$

где $\mu(x)$ — повозрастная когортная смертность в возрасте x , а R_0 и α — параметры Гомперца. Для поперечных данных актуарная скорость старения обычно оценивается с использованием уравнения Гомперца–Мейкема, имеющего дополнительное независимое от возраста слагаемое (параметр Мейкема). В случае когортных данных (в отличие от поперечных) параметр Мейкема (или фоновая смертность)

не является постоянным и зависит от возраста, поскольку он меняется с течением времени. Было также показано, что в современных популяциях фоновая смертность очень низка [1, 7] и, следовательно, не оказывает заметного влияния на оценки параметров уравнения Гомперца. В данном случае мы используем тот факт, что после 60-х годов XX века фоновая смертность снизилась до очень низких уровней, близких к нулю [2, 8]. Таким образом, при оценке параметров в возрастах старше 50 лет и в когортах, рождённых в 1910 г. и позже, параметр Мейкема можно проигнорировать. Бонгаартс оценивал фоновую и возрастную (*senescent*) смертность, используя данные о причинах смерти, и обнаружил, что после 50–60 лет смертность почти полностью определяется возрастной смертностью [7].

Параметры модели Гомперца оценивались методом нелинейной регрессии в возрастном интервале 50–80 лет (процедура *nlin* в пакете Stata, версия 14), как это было предложено ранее для поперечных данных [6]. Возрастной интервал 50–80 лет характеризуется увеличением темпов роста смертности с возрастом (*life table aging rate*) у женщин, тогда как для мужских когорт эта закономерность не столь очевидна [9, 10]. Считается, что этот возрастной интервал характеризует изменения возрастной компоненты смертности [10]. Некоторые исследователи используют логистическую модель для изучения смертности в поперечных данных, чтобы отразить замедление смертности (*mortality deceleration*) после возраста 85 лет [6, 7]. В нашем исследовании анализируется смертность в возрасте до 85 лет, поэтому применение модели Гомперца в данном случае оправдано.

Известно о следующей проблеме: использование метода наименьших квадратов часто приводит к плохо определяемой задаче нелинейной оптимизации, которая чрезвычайно чувствительна к ошибкам выборки и малейшим систематическим демографическим изменениям [11]. Эта проблема обсуждалась в нашей предыдущей публикации [2].

Исторические тренды актуарной скорости старения для каждой популяции мужчин и женщин (с 1910 по 1940 г. рождения) оценивались с использованием модели линейной регрессии и анализа знака и статистической значимости параметра наклона регрессии.

КЭС можно определить количественно, используя обратную зависимость между параметрами Гомперца (2):

$$\ln R_0 = \ln M - B\alpha. \quad (2)$$

Видовая продолжительность жизни (параметр B в уравнении 2) была получена с помощью линейной регрессии между параметрами Гомперца ($\ln R_0$ и α) в виде, представленном в уравнении 2. Таким образом оценивались видовая продолжительность жизни (параметр наклона, B) и отсекаемый отрезок (параметр $\ln M$).

Данные. В настоящем исследовании в качестве источника данных о смертности использовалась Human Mortality Database (HMD), www.mortality.org [12]. Эта база данных содержит информацию о смертности в 42 странах с достаточно хорошим качеством демографической статистики. В общей сложности использовались повозрастные когортные коэффициенты смертности для 3304 когорт, доступных в HMD (что охватывает данные для когорт 1900–1940 гг. рождения). Исследование исторических изменений актуарной скорости старения было сосредоточено на более поздних трендах для когорт с 1910 по 1940 г. рождения и включало 2294 когорты. В базе данных доступны повозрастные когортные показатели смертности мужчин и женщин в возрасте от 0 до 110 лет и старше. Однако данные о когортной смертности часто недоступны для всего возрастного диапазона, поскольку многие когорты ещё не закончили своё дожитие. Использовались данные за каждый год возраста и за каждый календарный год рождения.

Исторические изменения актуарной скорости старения в когортах человека. Исторические изменения актуарной скорости старения в демографических когортах ранее не изучались. Данные о когортной смертности не так многочисленны и доступны, как поперечные данные, и требуют наличия длинных временных рядов смертности для реконструкции когортной смертности. Для этого исследования мы выбрали однолетние когорты людей, родившихся с 1900 по 1940 г., чтобы охватить максимальное количество стран.

Исторические тренды актуарной скорости старения для когорт анализировались за период с 1910 по 1940 г. (годы рождения соответствующих когорт). Для каждой страны/пола мы рассчитывали линейную регрессию параметра наклона Гомперца (оценки актуарной скорости старения) по году рождения для соответствующей когорты. В табл. 1 представлены параметры наклона этой линейной регрессии вместе с соответствующими значениями r . Можно заметить, что в отличие от поперечных данных, актуарная скорость старения для когортных данных имеет тенденцию к снижению с течением времени в большинстве изучен-

ных популяций. Актуарная скорость старения снизилась в 22 регионах для обоих полов, в 7 регионах — только для мужчин и в одном регионе — только для женщин. В 10 случаях для мужчин и в 15 случаях для женщин показатели актуарного старения не показали статистически значимых изменений. Таким образом, 68% изученных популяций продемонстрировали тенденцию к снижению актуарной скорости старения.

Анализируя отдельные тренды для каждой страны, мы обнаружили две различных закономерности изменения актуарной скорости старения. В странах с более низкой смертностью, к которым относятся страны Западной Европы (Австрия, Германия, Дания, Испания, Финляндия, Франция, Англия и Уэльс, Северная Ирландия, Италия, Шотландия, Великобритания, Ирландия, Нидерланды, Норвегия, Португалия, Швеция), а также Австралия, Канада, Япония, Новая Зеландия и США, актуарная скорость старения снижалась примерно до когорты 1930-х гг. рождения, а затем увеличивались (рис. 1, Италия).

В странах с более высокой смертностью (Болгария, Беларусь, Чехия, Эстония, Венгрия, Литва, Латвия, Польша, Россия, Словакия, Украина) актуарная скорость старения всегда снижалась (рис. 1, Литва). Рис. 1 является лишь иллюстрацией, но те же две закономерности наблюдаются и в других странах. Есть несколько исключений. В Бельгии показатели актуарного старения оставались неизменными как для мужчин, так и для женщин. В Швейцарии актуарная скорость старения увеличилась для когорт более позднего года рождения только для женщин и осталась неизменной для мужчин. На Тайване актуарная скорость старения увеличилась у мужчин и продолжала снижаться у женщин.

На рис. 2 показана повозрастная смертность в когортах 1920, 1930 и 1940 г. рождения у шведских и польских мужчин. Можно заметить, что у мужчин Польши траектории смертности расходятся для всех трёх когорт, что соответствует снижению актуарной скорости старения в более поздних когортах рождения. С другой стороны, у мужчин Швеции расхождение траекторий смертности наблюдается только в когортах 1920 и 1930 г. рождения, что соответствует графику, представленному на рис. 1 для западноевропейской страны с более низкой смертностью.

Данные о смертности в когортах человека дают возможность изучить временные тенденции актуарной скорости старения когорт в разных странах. В целом, актуарная скорость

Таблица 1. Исторические тренды актуарной скорости старения для когорт человека с 1910 по 1940 г. рождения*

Страна/регион	Мужчины		Женщины	
	Параметр наклона линейной регрессии $\times 10^3$	<i>p</i> -значение	Параметр наклона линейной регрессии $\times 10^3$	<i>p</i> -значение
Австралия	0,2194	0,001	0,1387	0,019
Австрия	−0,3734	<0,001	−0,1755	0,004
Бельгия	−0,0585	0,031	−0,0137	0,721
Болгария	−1,1383	<0,001	−0,7642	<0,001
Беларусь	−1,3228	<0,001	−1,3422	<0,001
Канада	−0,0321	0,415	−0,0740	0,076
Швейцария	−0,1837	0,001	−0,0882	0,033
Чехия	−0,0871	<0,001	−0,6300	<0,001
Германия	−0,2687	<0,001	0,0352	0,347
Дания	−0,7425	<0,001	−0,8647	<0,001
Испания	−0,3475	<0,001	0,0445	0,346
Эстония	−1,4662	<0,001	−1,5405	<0,001
Финляндия	−0,0140	0,750	−0,2237	0,008
Франция	−0,3126	<0,001	−0,1574	<0,001
Англия и Уэльс	−0,1505	0,032	−0,1443	0,030
Северная Ирландия	−0,000006	0,892	0,0960	0,283
Великобритания	−0,1622	0,020	−0,1272	0,053
Шотландия	−0,2686	<0,001	0,0398	0,541
Венгрия	−1,2918	<0,001	−0,7143	<0,001
Ирландия	−0,5714	<0,001	−0,2981	0,001
Исландия	−0,1458	0,435	0,3480	0,195
Италия	0,0291	0,614	0,0944	0,039
Япония	−0,2001	<0,001	0,0812	0,003
Литва	−1,1191	<0,001	−1,0182	<0,001
Люксембург	−0,3288	0,001	−0,0594	0,668
Латвия	−1,2239	<0,001	−1,2308	<0,001
Нидерланды	−0,4269	<0,001	−0,5814	<0,001
Норвегия	−0,4545	<0,001	−0,5405	<0,001
Новая Зеландия	0,0900	0,335	0,0643	0,401
Польша	−1,3398	<0,001	−1,1047	<0,001
Португалия	−0,5002	<0,001	−0,5316	<0,001
Россия	−1,0891	<0,001	−1,3581	<0,001
Словакия	−1,0837	<0,001	−0,6272	<0,001
Словения	2,1571	<0,001	2,9576	<0,001
Швеция	−0,2394	<0,001	−0,2537	<0,001
Тайвань	−0,1583	<0,001	−0,4012	<0,001
Украина	−1,0314	<0,001	−1,1605	<0,001
США	0,1323	0,003	0,0343	0,400

Примечание. Коэффициенты наклона линейной регрессии для зависимости актуарной скорости старения от когорты рождения.

* Параметры Гомперца оценивались в возрастном интервале 50–80 лет. Линейная регрессия коэффициента наклона уравнения Гомперца по времени (когорте) была проведена для 31 когорты для каждого региона/пола. Жирным шрифтом выделены случаи со статистически значимыми ($p < 0,05$) изменениями актуарной скорости старения.

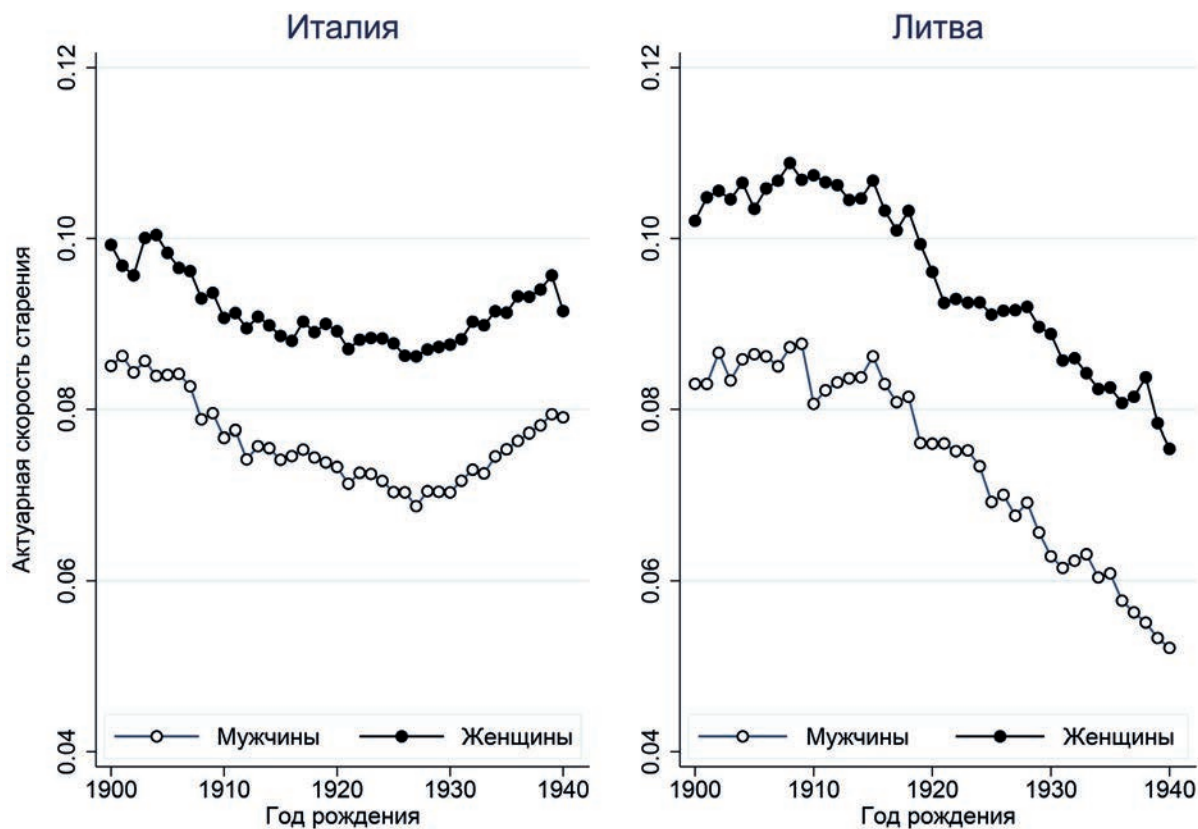


Рис. 1. Исторические изменения актуарной скорости старения в стране Западной Европы с более низкой смертностью (Италия) и в стране Балтии с более высокой смертностью (Литва)

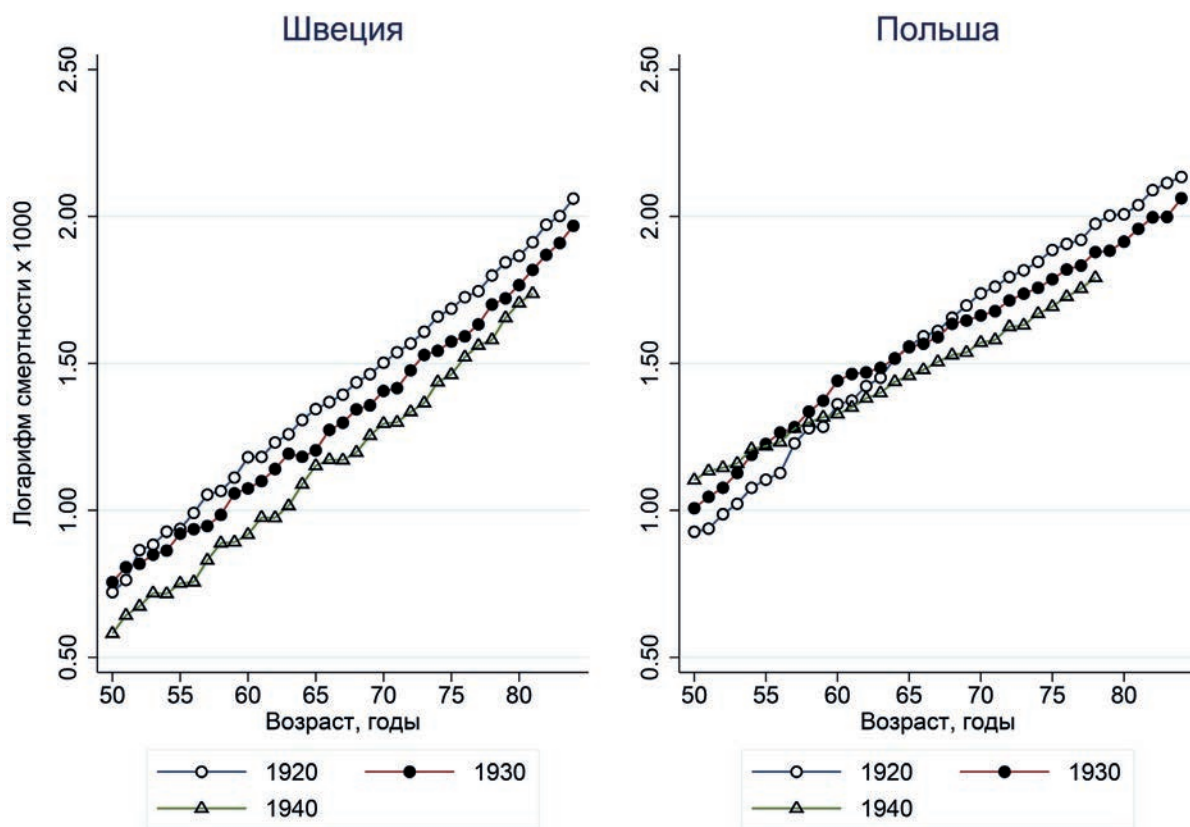


Рис. 2. Смертность (логарифмическая шкала для десятичного логарифма) в зависимости от возраста для трёх когорт шведских и польских мужчин

старения демонстрирует тенденцию к снижению. С другой стороны, в странах с более низким уровнем смертности наблюдаются V-образные изменения актуарной скорости старения.

Эти результаты отличаются от тех, которые были получены для поперечных данных о смертности. Наши более ранние исследования показали, что актуарная скорость старения относительно стабильна во времени, по крайней мере, до 60-х годов XX века [1, 8]. Исследования Бонгаарта подтвердили этот первоначальный вывод [6, 7]. Однако в дальнейшем стало ясно, что после 1960-х гг. актуарная скорость старения имеет более сложную траекторию и демонстрирует рост после 1980-х гг. [2, 3]. Эти выводы были сделаны на основании поперечных данных о смертности.

Компенсационный эффект смертности для когорт человека. КЭС определяется как схождение (конвергенция) смертности в старших возрастах, когда более высокие значения параметра наклона в функции Гомперца (темпы роста смертности) компенсируются более низкими значениями параметра отсекаемого отрезка R_0 в разных популяциях данного биологического вида [1, 13]. КЭС можно определить количественно, используя обратную зависимость параметров Гомперца в уравнении

Гомперца–Мейкема, представленную в уравнении (2). Исходно интерес к исследованию КЭС положила публикация Стрелера и Милдвана, которые обнаружили обратную корреляцию между параметрами Гомперца [14]. Однако эти авторы не учли параметр Мейкема при использовании довольно старых данных по смертности и, как результат, получили ложную корреляцию. Термин «компенсационный эффект смертности» был введён в 1978 г., когда учёт параметра Мейкема привёл к совершенно иным оценкам параметров корреляции Стрелера–Милдвана по сравнению с первоначальной публикацией [15]. КЭС определяется как конвергенция траекторий возрастной компоненты смертности (senescent mortality) в старших возрастах [1, 15].

Координата, соответствующая возрасту пересечения всех траекторий возрастной смертности (В), получила название видовой продолжительности жизни [1]. При использовании поперечных данных установлено, что для человека значение видовой продолжительности жизни равно 95 ± 2 годам [1, 2]. Следует отметить, что КЭС можно наблюдать даже при простом визуальном осмотре траекторий смертности в полулогарифмических координатах, не прибегая к расчёту параметров Гомперца [2].

Таблица 2. Характеристики компенсационного эффекта смертности для трёх когорт рождения, полученные на основании параметров уравнения Гомперца*

Популяция	Коэффициенты регрессии		Коэффициент корреляции между $\ln R_0$ и α	Число наблюдений
	$\ln M \pm \sigma$	$B \pm \sigma$, годы		
Все одногодичные когорты рождения с 1920 по 1940 г.				
Мужчины	$-2,39 \pm 0,10$	$84,02 \pm 1,33$	$-0,9085$	850
Женщины	$-4,36 \pm 0,11$	$66,13 \pm 1,28$	$-0,8716$	850
Оба пола	$-3,29 \pm 0,09$	$75,35 \pm 1,23$	$-0,9029$	850
Все одногодичные когорты рождения с 1930 по 1940 г.				
Мужчины	$-1,57 \pm 0,09$	$97,81 \pm 1,29$	$-0,9624$	460
Женщины	$-3,36 \pm 0,15$	$79,18 \pm 1,77$	$-0,9025$	460
Оба пола	$-2,38 \pm 0,10$	$89,59 \pm 1,32$	$-0,9536$	460
Когорта 1940 г. рождения				
Мужчины	$-1,68 \pm 0,16$	$97,33 \pm 2,23$	$-0,9894$	43
Женщины	$-2,87 \pm 0,39$	$86,24 \pm 4,53$	$-0,9479$	43
Оба пола	$-2,45 \pm 0,19$	$89,89 \pm 2,53$	$-0,9842$	43

* Параметры Гомперца оценивались в интервале 50–80 лет.

Примечание. Данные Human Mortality Database.

Также КЭС можно наблюдать не только у человека, но и у некоторых других биологических видов [1, 13].

Данные о когортной смертности по разным странам позволяют проверить существование КЭС для когорт человека. Существование КЭС для когортных данных ранее не проверялось. С использованием когортных данных были получены оценки параметров линейной регрессии, представленной уравнением (2).

Анализ с использованием данной линейной регрессии был проведён для более поздних когорт 1920–1940-х гг. рождения и использовал оценки параметров Гомперца для 76 популяций мужчин и женщин, полученных в возрастном интервале 50–80 лет. В табл. 2 представлены результаты регрессионного анализа. Эти результаты подтверждают существование КЭС для когорт человека, хотя значения видовой продолжительности жизни [параметр B линейной регрессии в уравнении (2)] оказались несколько ниже по сравнению с результатами, полученными на поперечных данных [1, 2]. Эти результаты также показывают более низкие значения видовой продолжительности жизни для исторически более ранних когорт рождения, что согласуется с результатами, полученными на поперечных данных [2].

В целом, можно заключить, что оценки видовой продолжительности жизни на основе когортных данных (для когорт более позднего рождения) демонстрируют хорошее соответствие с результатами более ранних публикаций, основанных на поперечных данных [1, 2]. Эти результаты означают, что количественные показатели КЭС для людей довольно стабильны.

Рис. 3 демонстрирует схождение траекторий смертности в старших возрастах (КЭС) для когорт 1930 г. рождения для нескольких популяций. Можно заметить, что мужчины в Польше имеют более низкие показатели актуарной скорости старения по сравнению с мужчинами Швеции, а женщины имеют более высокие показатели актуарной скорости старения по сравнению с мужчинами. Также можно заметить, что по возрасту траектории смертности женщин демонстрируют несколько ускоренную тенденцию роста смертности, что подтверждает результаты предыдущих исследований темпов скорости старения (life table aging rate) [10].

Рис. 3 является ещё одной наглядной иллюстрацией существования КЭС, не требующей статистической оценки параметров уравнения Гомперца.

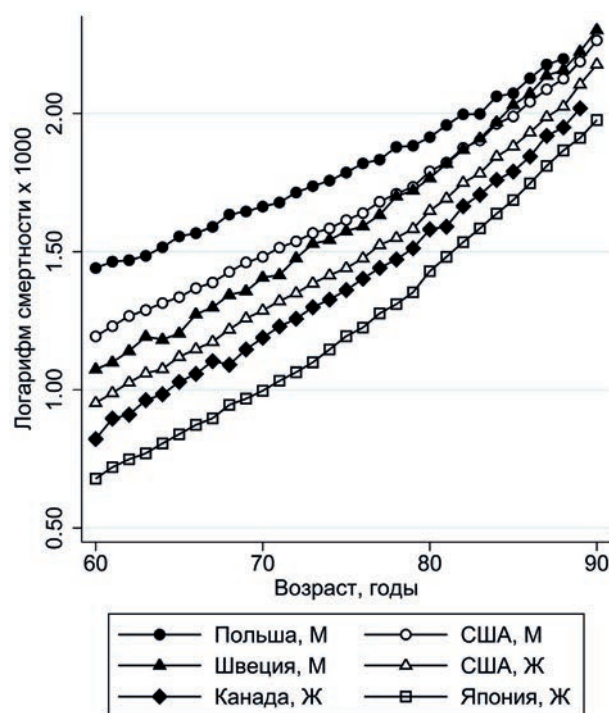


Рис. 3. Компенсационный эффект смертности для когорт человека. Логарифм смертности (логарифмическая шкала для десятичного логарифма) когорт 1930 г. рождения в шести популяциях. Обозначения: М — мужчины; Ж — женщины

ДИСКУССИЯ И ВЫВОДЫ

Было обнаружено, что КЭС для когортных данных действительно существует. Исследование количественных показателей КЭС с использованием когортных данных подтвердило, что обратная корреляция между параметром отсекаемого отрезка уравнения Гомперца, $\ln(R_0)$, и параметром наклона уравнения Гомперца (α) действительно существует и является статистически значимой, когда мы сравниваем разные популяции человека. Оценки видовой продолжительности жизни (параметр B) для когорт более позднего года рождения близки к оценкам, полученным на поперечных данных [1, 2], хотя и оказались несколько ниже. Было также обнаружено, что оценки видовой продолжительности жизни ниже для когорт исторически более ранних годов рождения. Таким образом, существование КЭС подтвердилось для когорт человека.

В этом исследовании мы также проанализировали исторические изменения актуарной скорости старения (параметр наклона уравнения Гомперца) для когорт человека. Были проанализированы временные тренды актуарной скорости старения когорт для каждой популяции отдельно, начиная с 1910 и до 1940 г. рождения. Оказалось, что большинство

популяций (52 из 76, или 68%) демонстрирует тенденцию к снижению актуарной скорости старения. Актуарная скорость старения остаётся стабильной для 23% исследованных когорт человека. Этот результат, полученный для актуарной скорости старения когорт, отличается от результата, полученного для поперечных данных. Ранее было обнаружено, что актуарная скорость старения для поперечных данных демонстрирует тенденцию к увеличению после 1980-х гг. для большинства изученных популяций [2, 3]. До периода 1980-х гг. актуарная скорость старения демонстрировала стабильность с течением времени [1, 2, 8]. С другой стороны, актуарная скорость старения, измеренная для когорт одной и той же страны и пола, имеет тенденцию к снижению с течением времени.

Изучая когортную смертность, важно осознавать, что на протяжении жизни на когорту влияет как старение, способствующее увеличению смертности, так и улучшение условий жизни, снижающее смертность. Теоретически можно допустить, что актуарная скорость старения может в конечном итоге снизиться до очень низкого уровня, близкого к нулю, что можно рассматривать как кажущуюся остановку старения. Например, если рост смертности с возрастом составляет 8% в год, но смертность снижается со временем со скоростью 2% в год, то наблюдаемый рост смертности в когорте в конечном итоге составит всего 6% в год ($8 - 2 = 6$) [16]. Если темпы исторического снижения смертности зависят от возраста, на когортных данных это может выглядеть как снижение актуарной скорости старения в более поздних когортах людей. В любом случае, снижение актуарной скорости старения выглядит как замедление старения. До сих пор неясно, чем можно объяснить увеличение актуарной скорости старения в странах с более низкой смертностью среди когорт людей, родившихся недавно. Одним из возможных объяснений является то, что эти страны уже исчерпали большую часть ресурсов для снижения смертности, таких как снижение смертности от сердечно-сосудистых заболеваний и уменьшение числа курящих. Действительно, смертность во многих из этих стран стабилизировалась в течение последних 10–15 лет, что позволяет предположить, что основной фактор снижения актуарной скорости старения почти исчез [17]. Таким образом, в настоящее время актуарная скорость старения в странах с более низкой смертностью определяется главным образом процессом старения и зависит от возрастной компоненты смертности. В странах с более высокой смертностью, таких как страны Восточной Европы,

всё ещё остаётся некоторый потенциал для снижения смертности, и, следовательно, их актуарная скорость старения продолжает снижаться.

Нам представляется, что старение следует измерять не скоростью увеличения смертности с возрастом, а скоростью потери функциональных элементов (в основном специализированных клеток) в организме. Такой подход к измерению истинной скорости старения был предложен надёжностной теорией старения [1, 4, 18]. Согласно этой теории, приблизительную оценку истинной скорости старения можно получить путём измерения одного из параметров КЭС (обратной величины видовой продолжительности жизни в уравнении (2)). Другая теория старения (метрономическая) была предложена Алексеем Оловниковым [19]. Хотя он и рассматривал процесс старения как программу, но подчёркивал, что эта программа относится главным образом к репродуктивным аспектам этого процесса. Действительно, время начала и окончания репродукции у женщин имеет определённые признаки программы [20]. Однако общий процесс старения лучше описывать моделями теории надёжности, которые предполагают постепенное разрушение организма и утрату функциональных элементов, включая теломеры и специализированные клетки.

Благодарности. Мы очень признательны российскому теоретику Алексею Матвеевичу Оловникову (1936–2022) за многочасовые дружеские научные дискуссии на многие темы биологии старения. Данная статья является частью специального выпуска журнала, посвящённого его памяти. Мы знали Алексея Матвеевича Оловникова лично с 1978 года и многому научились в результате научных бесед с ним. Один из примеров его активного участия в обсуждении наших научных исследований и презентаций приведён здесь: <https://www.youtube.com/watch?v=3cI5M88I-NU>.

Вклад авторов. Л.Г. разрабатывал план исследований, анализировал полученные результаты, редактировал рукопись. Н.Г. проводила статистический анализ данных и подготавливала рукопись.

Финансирование. Работа частично поддержана грантом Национального института здоровья (NIH R21AG054849).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (1991) *The Biology of Life Span: A Quantitative Approach*, Harwood Academic Publisher, New York.
2. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2022) Trends in human species-specific lifespan and actuarial aging rate, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1998-2011, doi: 10.1134/S0006297922120173.
3. Tai, T. H., and Noymer, A. (2018) Models for estimating empirical Gompertz mortality: with an application to evolution of the Gompertzian slope, *Popul. Ecol.*, **60**, 171-184, doi: 10.1007/s10144-018-0609-6.
4. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2006) *Reliability Theory of Aging and Longevity* in *Handbook of the Biology of Aging* (Masoro, E. J., and Austad, S. N., eds) 6 Edn., Academic Press, San Diego, pp. 3-42, doi: 10.1016/B978-012088387-5/50004-2.
5. Mikhalsky, A. I. (2023) On the Paper by Leonid A. Gavrilov and Natalia S. Gavrilova entitled "Trends in Human Species-Specific Lifespan and Actuarial Aging Rate" Published in *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 87, Nos. 12-13, pp. 1622-1633 (2022), *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 162-163, doi: 10.1134/S0006297923010145.
6. Bongaarts, J. (2005) Long-range trends in adult mortality: Models and projection methods, *Demography*, **42**, 23-49, doi: 10.1353/dem.2005.0003.
7. Bongaarts, J. (2009) Trends in senescent life expectancy, *Popul. Stud. (Camb)*, **63**, 203-213, doi: 10.1080/00324720903165456.
8. Gavrilov, L. A., Gavrilova, N. S., and Nosov, V. N. (1983) Human life span stopped increasing: why? *Gerontology*, **29**, 176-180, doi: 10.1159/000213111.
9. Horiuchi, S. (1997) Postmenopausal acceleration of age-related mortality increase, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **52**, B78-B92, doi: 10.1093/gerona/52A.1.B78.
10. Li, T., Yang, Y. C., and Anderson, J. J. (2013) Mortality increase in late-middle and early-old age: heterogeneity in death processes as a new explanation, *Demography*, **50**, 1563-1591, doi: 10.1007/s13524-013-0222-4.
11. Tarkhov, A. E., Menshikov, L. I., and Fedichev, P. O. (2017) Strehler-Mildvan correlation is a degenerate manifold of Gompertz fit, *J. Theor. Biol.*, **416**, 180-189, doi: 10.1016/j.jtbi.2017.01.017.
12. Human Mortality Database. University of California, Berkeley (USA), and Max Planck Institute for Demographic Research (Germany), URL: <https://www.mortality.org> (accessed on 6.5.2022).
13. Golubev, A. (2019) A 2D analysis of correlations between the parameters of the Gompertz-Makeham model (or law?) of relationships between aging, mortality, and longevity, *Biogerontology*, **20**, 799-821, doi: 10.1007/s10522-019-09828-z.
14. Strehler, B. L., and Mildvan, A. S. (1960) General theory of mortality and aging, *Science*, **132**, 14-21, doi: 10.1126/science.132.3418.14.
15. Gavrilov, L. A., Gavrilova, N. S., and Yaguzhinsky, L. S. (1978) The main patterns of aging and death of animals from the point of view of the theory of reliability [in Russian], *J. Gen. Biol.*, **39**, 734-742.
16. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2023) On the Commentary by Anatoly I. Mikhalsky Published in *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 88, No. 1, pp. 162-163 (2023), *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 289, doi: 10.1134/S0006297923020116.
17. Ho, J. Y., and Hendi, A. S. (2018) Recent trends in life expectancy across high income countries: retrospective observational study, *Br. Med. J.*, **362**, k2562, doi: 10.1136/bmj.k2562.
18. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2001) The reliability theory of aging and longevity, *J. Theor. Biol.*, **213**, 527-545, doi: 10.1006/jtbi.2001.2430.
19. Olovnikov, A. M. (2022) Planetary metronome as a regulator of lifespan and aging rate: the metronomic hypothesis, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1640-1650, doi: 10.1134/S0006297922120197.
20. Gavrilova, N. S., Gavrilov, L. A., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2012) Testing predictions of the programmed and stochastic theories of aging: comparison of variation in age at death, menopause, and sexual maturation, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 754-760, doi: 10.1134/S0006297912070085.

ACTUARIAL AGING RATES IN HUMAN COHORTS

L. A. Gavrilov^{1,2*} and N. S. Gavrilova^{1,2}¹ NORC at the University of Chicago, 60637 Chicago, IL, USA² Institute for Demographic Research, Federal Center of Theoretical and Applied Sociology, Russian Academy of Sciences, 109028 Moscow, Russia; e-mail: lagavril@yahoo.com

Aging rate is an important characteristic of human aging. Attempts to measure aging rates through the Gompertz slope parameter lead to a conclusion that actuarial aging rates were stable during the most of the 20th century, but recently demonstrate an increase over time in the majority of studied populations. These findings were made using cross-sectional mortality data rather than by the analysis of mortality of real birth cohorts. In this study we analyzed historical changes of actuarial aging rates in human cohorts. The Gompertz parameters were estimated in the age interval 50-80 years using data on one-year cohort age-specific death rates from the Human Mortality Database (HMD). Totally, data for 2,294 cohorts of men and women from 76 populations were analyzed. Changes of the Gompertz slope parameter in the studied cohorts revealed two distinct patterns for actuarial aging rate. In higher mortality Eastern European countries actuarial aging rates showed continuous decline from the 1910 to 1940 birth cohort. In lower mortality Western European countries, Australia, Canada, Japan, New Zealand, and USA actuarial aging rates declined from the 1910th to approximately 1930th cohort and then increased. Overall, in 50 out of 76 populations (68%) actuarial aging rate demonstrated decreasing pattern of change over time. Compensation effect of mortality (CEM) was tested for the first time in human cohorts and the cohort species-specific lifespan was estimated. CEM was confirmed using cohort data and human cohort species-specific lifespan estimates were similar to the estimates obtained for the cross-sectional data published earlier.

Keywords: aging, mortality, compensation effect of mortality, species-specific lifespan, aging rate

ЕДИНСТВЕННАЯ ОСТАНОВЛЕННАЯ 80S РИБОСОМА ПРЕПЯТСТВУЕТ ВОВЛЕЧЕНИЮ мРНК В СТРЕСС-ГРАНУЛЫ

© 2023 А.Г. Федоровский^{1,2}, А.В. Бураков¹, И.М. Теренин^{1,3}, Д.А. Быков^{1,4,5},
К.А. Лашкевич¹, В.И. Попенко⁵, Н.Е. Макарова^{1*}, И.И. Сорокин^{1&}, А.П. Сухинина^{1,6},
В.С. Прасолов⁵, П.В. Иванов⁷, С.Е. Дмитриев^{1,5,6*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234 Москва, Россия; электронная почта: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет наук о материалах, 119234 Москва, Россия

³ Научно-технологический университет «Сириус»,
354340 Краснодарский край, пгт Сириус, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биохимии, 119234 Москва, Россия

⁵ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

⁷ Гарвардская школа медицины, Женский госпиталь Бригхэма, Отдел медицины,
02115 Бостон, МА, США

Поступила в редакцию 23.11.2022

После доработки 31.08.2023

Принята к публикации 11.09.2023

В ответ на стрессирующие воздействия клетки эукариот обычно подавляют биосинтез белка. Это вызывает высвобождение мРНК из полисом, их конденсацию с участием мРНК-связывающих белков и образование немембранных внутрицитоплазматических компартментов, называемых стресс-гранулами (СГ). В СГ присутствуют 40S, но не обнаруживаются 60S субчастицы рибосом. Известно, что рибосомные ингибиторы циклогексимид, эметин и анизомицин, блокирующие продвижение 80S рибосом по мРНК и стабилизирующие таким образом полисомы, предотвращают образование СГ. Напротив, индуктор преждевременной терминации пуромицин, полностью освобождающий мРНК от рибосом, стимулирует образование СГ. Такой же эффект оказывают и некоторые специфические ингибиторы инициации трансляции, приводящие к накоплению освобождённых из полисом мРНК в форме остановленных 48S преинициаторных комплексов. На основании этих и других данных принято считать, что триггером образования СГ является появление в клетке мРНК с освобождёнными от рибосом протяжёнными участками, которые склонны образовывать конденсаты. В данной работе мы оценили способность различных низкомолекулярных ингибиторов трансляции блокировать или стимулировать сборку СГ в условиях окислительного стресса, вызываемого арсенитом натрия. Вопреки ожиданиям, мы обнаружили, что рибосом-направленные ингибиторы элонгации особого типа, которые останавливают единственную 80S рибосому в начале кодирующей области, но не мешают всем последующим рибосомам закончить трансляцию и покинуть мРНК (например, харрингтонин, лактимидомицин или T-2 токсин), полностью предотвращают образование арсенит-индуцированных СГ. Эти наблюдения позволяют заключить, что присутствия даже одной 80S рибосомы на мРНК достаточно для того, чтобы воспрепятствовать её вовлечению в СГ, а для формирования СГ недостаточно наличия протяжённых областей мРНК, свободных от рибосом. Мы предполагаем, что вхождение мРНК в СГ может быть опосредовано специфичными контактами между РНК-связывающими белками и теми участками находящихся на этих мРНК 40S субчастиц, которые оказываются недоступными в случае ассоциированных рибосом.

Принятые сокращения: НТО – нетранслируемая область; РНП – рибонуклеопротеин; СГ – стресс-гранулы.

* Адресат для корреспонденции.

Нынешнее место работы: отдел генетики, микробиологии и статистики, биологический факультет, Университет Барселоны, 08028 Барселона, Каталония, Испания.

& Нынешнее место работы: Гронингский институт биомолекулярных наук и биотехнологии, Гронингский университет, 9747 AG Гронинген, Нидерланды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стресс-гранулы, фазовое разделение «жидкость-жидкость», низкомолекулярные ингибиторы трансляции, рибосомные ингибиторы, элонгация, полисомы, харрингтонин, лактимидомицин, T-2 токсин, остановленная рибосома.

DOI: 10.31857/S0320972523110118, EDN: MLWTCS

ВВЕДЕНИЕ

Эукариотическая клетка способна оперативно реагировать на резкие изменения внешних условий, запуская программу стрессового ответа, одним из неотъемлемых элементов которого, как правило, является быстрое подавление белкового синтеза [1]. Во многих случаях стресс-индуцированное подавление трансляции сопровождается образованием специализированных рибонуклеопротеиновых конденсатов в цитоплазме клеток, называемых стресс-гранулами (СГ) [2–5]. Принято считать, что СГ вносят вклад в выживаемость клеток в условиях стресса, обеспечивая оптимальное пространственное распределение мРНК и компонентов трансляционного аппарата при остановке трансляции и при её последующем возобновлении, а также являются частью врождённого иммунитета, необходимого для защиты от вирусов [3, 5–8].

В состав СГ входят нетранслируемые мРНК, рибосомные 40S субчастицы и целый ряд белков: прежде всего, несколько факторов инициации трансляции, которые в нормальных условиях являются компонентами преинициаторного 48S комплекса [9], и некоторые другие трансляционные факторы (см. работу Makeeva et al. [10] и ссылки в ней), а также множество мРНК-связывающих белков (см., напр., работы Harvey et al., Kedersha et al., Matsuki et al. и Mazroui et al. [11–14]), участники внутриклеточной сигнализации [15] и прочие компоненты белок-синтезирующего аппарата (подробнее см. в обзорах Bhatte et al., Guzikowski et al., Ivanov et al., Protter et al. и Riggs et al. [1–5]). Некоторые из них непосредственно участвуют в регуляции образования СГ, другие вовлекаются благодаря взаимодействию с различными компонентами гранул. Количество белков, обнаруживаемых в СГ, значительно расширилось за последние несколько лет благодаря применению методов проксимального мечения [16–20].

Механизмы образования СГ изучены недостаточно. Однако ключевым принципом их формирования является так называемое фазовое разделение «жидкость-жидкость» (англ. liquid-liquid phase separation, LLPS), связанное со свойствами самих биополимеров: РНК и РНК-связывающих белков, имеющих неструк-

турированные или повторяющиеся участки, склонные к образованию избыточных контактов [21–30]. Предполагается, что межмолекулярное спаривание оснований нетранслируемых мРНК приводит к их агрегации, а взаимодействие с РНК-связывающими белками обеспечивает формирование рибонуклеопротеиновых (РНП) гранул [22, 27, 31]. Большую роль в этом процессе играют также белок-белковые взаимодействия с участием внутренне неупорядоченных областей [4, 32]. Важными участниками формирования СГ являются белки G3BP1/2, которые в условиях стресса переходят из неактивного компактного состояния в частично развёрнутую конформацию, способствующую кооперативным РНК-белковым взаимодействиям [33, 34]. Это приводит к сборке РНП-кластеров, в которых молекулы мРНК и белков объединены в гетерогенные конденсаты.

Анализ транскриптома СГ показал, что, несмотря на наличие некоторой специфичности, практически все мРНК в клетке в той или иной степени участвуют в их формировании [35]. Неэффективно транслируемые мРНК, а также транскрипты с длинными кодирующими частями и 3'-НТО оказались сильнее представлены в СГ [35, 36], что указывает на роль РНК-РНК-взаимодействий между свободными от рибосом участками мРНК. Интересно, что в каждый конкретный момент в состав СГ входит лишь небольшая доля (~10%) всех клеточных мРНК [35], которые динамически обмениваются с пулом свободных мРНК в цитоплазме [37–39].

Согласно классической модели, в СГ накапливаются именно нетранслируемые мРНК, не связанные с рибосомами [9, 37, 40]. Это согласуется с тем, что в них, несмотря на присутствие 40S субчастиц рибосом, не обнаруживаются 60S субчастицы — что подтверждается как иммунофлуоресцентными методами [9, 41, 42], так и анализом распределения 18S и 28S рРНК [43]. Тем не менее недавно выяснилось, что некоторые активно транслируемые мРНК могут временно взаимодействовать с СГ [44] и даже, возможно, находиться непосредственно внутри них [45], а утверждение о полном отсутствии 60S субчастиц в СГ не так однозначно [45, 46]. Впрочем, в том, что компонентом СГ в основном являются именно нетрансли-

руемые мРНК, сомневаться всё-таки не приходится [45].

Так или иначе, во всех существующих моделях ключевым условием формирования СГ признаётся появление в клетке протяжённых участков мРНК, свободных от рибосом. Хотя само по себе это условие не всегда является триггером сборки СГ, обычно оно способствует их формированию. Так, к сборке СГ приводит блокировка инициации трансляции самыми разными способами. Например, индукторами их образования являются стрессовые воздействия, приводящие к инактивации фактора eIF2, доставляющего Met-тРНК_i в преинициаторный комплекс [12], или ингибиторы РНК-хеликазы eIF4A, участвующей в рибосомном сканировании [47–50]. Также образование СГ запускает снижение уровней eIF4B, eIF4H или PABP, и в меньшей степени – истощение кэп-связывающего белка eIF4E или предотвращение его вхождения в состав eIF4F [51–53]. Интересно, что вмешательство в последнюю стадию инициации трансляции (присоединение 60S субчастицы) с помощью низкомолекулярного ингибитора MDMP либо путём истощения белка L28 не индуцирует образование СГ и не влияет на их сборку [51].

Формирование СГ стимулирует также рибосомный ингибитор пуромицин, вызывающий преждевременную терминацию и разбирающий полисомы [37], а в некоторых случаях это вещество даже вызывает сборку СГ само по себе, без каких-либо дополнительных воздействий [37, 54]. Напротив, стабилизация полисом с помощью классических ингибиторов элонгации – циклогексимида, эметина и анизомицина – препятствует сборке СГ в клетке в условиях стресса [14, 37–39, 51, 55].

Эти факты также укладываются в модель, согласно которой именно протяжённые участки мРНК, свободные от рибосом, служат основным РНК-компонентом СГ и во многом определяют их формирование. В данной работе мы решили проверить, действительно ли это так. Для этого мы проанализировали, какие эффекты оказывают на формирование СГ, вызванное классическим индуктором – арсенитом натрия, различные низкомолекулярные ингибиторы рибосомы. Широкое разнообразие их свойств [56] позволяет с их помощью не только стабилизировать или полностью разобрать полисомы, но и обеспечивать нахождение на мРНК всего одной 80S рибосомы в начале кодирующей части. Мы выяснили, что в последнем случае СГ также не образовывались. Это свидетельствует о том, что мРНК, с которыми связана всего одна-единственная рибо-

сома, не могут вовлекаться в СГ, несмотря на наличие у них протяжённых свободных участков. По-видимому, 80S рибосома сама по себе препятствует уходу мРНК в СГ. Эти факты ставят вопросы об активной роли рибосомы в исключении транслирующихся мРНК из СГ и об универсальности классической модели, описывающей механизм сборки СГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток, индукция стресса и обработка ингибиторами трансляции. Клетки линии HeLa выращивали в среде DMEM («Gibco», США) с аланил-глутамином («ПанЭко», Россия) и 10% FBS («HyClone», США) в присутствии пенициллина и стрептомицина («ПанЭко») во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С. Использовали следующие ингибиторы трансляции (в скобках указаны производитель, концентрация стокового раствора и растворитель): циклогексимид («Sigma-Aldrich», США, 10 мг/мл в воде), цефалин («Cayman Chemical», США, 10 мМ в этаноле), анизомицин («Sigma-Aldrich», 50 мМ в DMSO), пуромицин («Santa Cruz Biotechnology», США, 100 мМ в воде), лактимидомицин («Sigma-Aldrich», 2 мМ в DMSO), харрингтонин («Santa Cruz Biotechnology», 10 мг/мл в DMSO), T-2 токсин («Cayman Chemical», 10 мМ в DMSO), пактамицин («Sigma-Aldrich», 10 мМ в DMSO), торин-1 («Tocris Bioscience», Великобритания, 10 мМ в DMSO). Стоковые растворы перед использованием разводили водой или буфером PBS до удобных для добавления к клеткам концентраций (см. ниже). Для индукции образования СГ клетки подвергали воздействию 100 мкМ арсенита натрия (NaH₂AsO₃, «Sigma-Aldrich») на протяжении указанного времени.

мРНК-трансфекция. Для мРНК-трансфекции клетки HeLa накануне рассеивали в 96-луночный белый планшет FB/НВ («Greiner», Австрия) в объёме 75 мкл на лунку, пространство между ячейками заполняли стерильной водой. m⁷G-Кэпированная полиаденилированная мРНК, кодирующая люциферазу светлячка (Fluc) и содержащая 5'-нетранслируемую область (НТО) мРНК β-актина человека и 3'-НТО вируса SV40, полученная по описанному ранее протоколу [57], была любезно предоставлена Е.А. Пановой (ФББ МГУ). мРНК-трансфекцию проводили с помощью реагента GenJector-U («Moloca», Россия) при плотности клеток ~75%, как описано в работе Akulich et al. [58]. При приготовлении трансфицирующих смесей в буфер PBS к мРНК

и реагенту добавляли D-люциферин («Promega», США) из такого расчёта, чтобы его конечная концентрация в лунке с клетками составила 0,4 мМ. Для изучения действия арсенита на трансляцию мРНК его добавляли до указанных концентраций за 1 ч до трансфекции. Непосредственно перед трансфекцией в лунки добавляли ингибиторы трансляции в виде соответствующих 10-кратных растворов. Затем клетки помещали в мультимодальный планшетный ридер CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия) и измеряли активность люциферазы прижизненно на протяжении 24 ч, как описано в работе Panova et al. [59]. Для дальнейших расчётов брали значения в точке 10 ч, примерно соответствующей середине линейного участка кривой (кроме опыта с арсенитом натрия, для которого были взяты точки 2 ч). Все трансфекции повторяли не менее двух раз на разных пассажах клеток, в трёх повторностях, затем рассчитывали средние значения и стандартное отклонение.

Анализ полисомного профиля. Клетки HeLa высевали на 10-см чашки и после того, как культура достигала плотности ~75%, добавляли рибосомные ингибиторы до указанных концентраций и инкубировали 30 мин, либо добавляли арсенит натрия до 100 мкМ и инкубировали 1 ч. Дальнейшие действия проводили согласно протоколу, описанному в работе Andreev et al. [60], с небольшими изменениями. Клетки промывали охлаждённым во льду PBS и лизировали в 200 мкл буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 250 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 0,5% Triton X-100, 0,1 мг/мл циклогексимида и 20 ед./мл ДНКазы TURBO («Ambion», США). Лизаты инкубировали 10 мин на льду, центрифугировали 10 мин при 16 000 g и +4 °С, супернатант наносили на градиент плотности сахарозы 10–60% (*m/v*), 11 мл, содержащий 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 250 мМ NaCl, 15 мМ MgCl₂, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT и 0,1 мг/мл циклогексимида, и центрифугировали в роторе SW-41 при 35 000 об./мин в течение 3 ч, после чего градиент вручную разделяли на алиquotы по 300 мл и измеряли A₂₆₀ в 96-луночных планшетах UV-Transparent («Corning», США) с помощью планшетного ридера Infinite 200 PRO («TECAN», Швейцария). Полученные значения нормировали на сумму значений A₂₆₀ для всех алиquot из данной пробирки.

Иммуноцитохимический анализ и микроскопия. Для иммуноокрашивания клетки HeLa выращивали до плотности ~70% на покровных стёклах, добавляли рибосомные ингибиторы до указанных концентраций и выдерживали

30 мин, после чего индуцировали окислительный стресс добавлением 100 мкМ арсенита натрия. Через 1 ч клетки фиксировали безводным метанолом при –20 °С в течение 7 мин, затем постфиксировали свежеприготовленным 3%-ным параформальдегидом в PBS при +4 °С в течение 30 мин и отмывали PBS при комнатной температуре 2 раза по 15 мин. После этого осуществляли пермеабиллизацию 0,5%-ным Triton X-100 в течение 2 мин, забивку 3%-ным BSA 15 мин и отмывку PBS 15 мин, а затем гибридизовали с первичными мышиными анти-G3BP1 (H-10) антителами («Santa Cruz Biotechnology») при комнатной температуре в течение 1 ч с последующей отмывкой PBS (3 раза по 5 мин), инкубацией со вторичными анти-мышиными IgG-специфичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 («Invitrogen», США), при тех же условиях и с аналогичной отмывкой. После этого проводили окраску ядер красителем Hoechst 33342 («Thermo Fisher Scientific», США) и монтировали покровные стекла с использованием поливинилового заливочного среда Aqua-Poly/Mount («Polysciences Inc», США). Микроскопию препаратов проводили на конфокальном микроскопе Zeiss LSM900 («Carl Zeiss AG», Германия, приобретён при поддержке Программы развития МГУ). На рисунках для каждой панели представлена сумма всех кадров соответствующей Z-стопки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выбор низкомолекулярных ингибиторов.

Для анализа были выбраны следующие рибосомные ингибиторы: циклогексимид, цефалин (аналог эметина), анизомидин, пуромидин, лактимидомидин, харрингтонин, Т-2 токсин и пактаминин, а также ингибитор киназы mTOR торин-1 [56]. Их структура и важные для данного исследования свойства отражены в таблице.

Циклогексимид связывается с Е-сайтом рибосомной 60S субчастицы, блокирует трансляцию и стабилизирует полисомы. Цефалин (6'-О-деметилэметин) также блокирует трансляцию, однако взаимодействует с малой субчастицей, а не с большой. Анизомидин связывается с А-сайтом 60S субчастицы и ингибирует пептидилтрансферазную реакцию. Наконец, пуромидин имитирует аминокислотированный ССА-конец тРНК и, связываясь с А-сайтом рибосомы, вызывает преждевременную терминацию и высвобождение пептида, разбирая полисомы. Эти ингибиторы были

Структура и функциональные свойства низкомолекулярных ингибиторов трансляции, использованных в данной работе

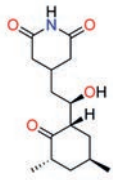
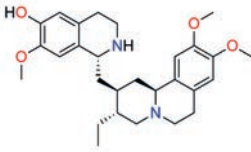
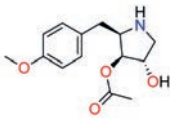
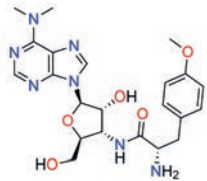
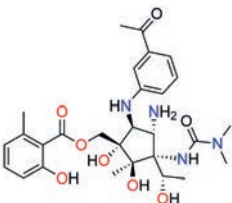
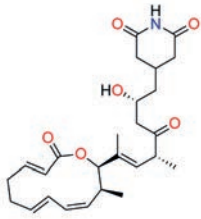
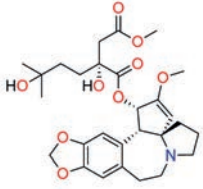
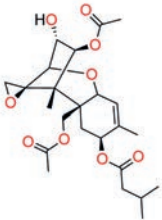
Название ингибитора (PubChem CID)	Структурная формула	Мишень (участок связывания)	Механизм действия	Влияние на полисомы	Влияние на сборку стресс-гранул
Циклогексими́д (6197)		60S (Е-сайт)	ингибирует транслокацию, препятствуя перемещению ССА-конца деацилированной тРНК в Е-сайт	стабилизирует	препятствует сборке [14, 38, 51]
Цефалин (442195), аналог эметина		40S (напротив Е-сайта)	ингибирует транслокацию	стабилизирует	препятствует сборке (показано для эметина) [37, 39]
Анизомицин (253602)		60S (А-сайт)	ингибирует пептидилтрансферазный центр, дестабилизируя связывание Аа-тРНК в А-сайте	стабилизирует	препятствует сборке [55]
Пурамицин (439530)		60S (А-сайт)	вызывает преждевременную терминацию, имитируя аминокислотированный ССА-конец тРНК	разбирает	способствует сборке [37, 54]
Пактамицин (5289124)		40S (напротив Е-сайта)	ингибирует транслокацию	разбирает	неизвестен
Лактимидомицин (11669726)		60S (Е-сайт)	ингибирует транслокацию, препятствуя перемещению ССА-конца деацилированной тРНК в Е-сайт; способен связываться только с вакантной рибосомой	разбирает	неизвестен

Таблица (окончание)

Название ингибитора (PubChem CID)	Структурная формула	Мишень (участок связывания)	Механизм действия	Влияние на полисомы	Влияние на сборку стресс-гранул
Харрингтонин (276389)		60S (А-сайт)	ингибирует пептидилтрансферазный центр, препятствуя аккомодации аминоацильного остатка Аа-тРНК в А-сайте; способен связываться только с вакантной рибосомой	разбирает	неизвестен
Т-2 токсин (5284461)		60S (А-сайт)	ингибирует пептидилтрансферазный центр, препятствуя аккомодации аминоацильного остатка Аа-тРНК в А-сайте; способен связываться только с вакантной рибосомой	разбирает	неизвестен
Торин-1 (49836027)		mTOR (активный центр)	инактивация mTOR приводит к дефосфорилированию 4E-BP1 и нарушению взаимодействия кэп-связывающего белка eIF4E с партнёром eIF4G, угнетая кэп-зависимую трансляцию	разбирает	незначительно ингибирует [61, 62]

Примечание. Структурные формулы веществ взяты из базы данных PubChem [63], данные о механизме работы — из обзора Dmitriev et al. [56].

взяты в качестве контроля, т.к. их влияние на сборку СГ хорошо задокументировано: ожидается, что вещества, стабилизирующие полисомы (такие как циклогексимид, эметин и анизомицин), будут препятствовать формированию СГ [14, 37–39, 51, 55], в то время как разбирающий полисомы пуромицин, наоборот, его простимулирует [37, 54].

Задачей же данного исследования было выяснить, как повлияют на сборку СГ «неканонические» ингибиторы элонгации, воздействие которых парадоксальным образом приводит к разборке полисом [56]. Так, например, пактамицин (который связывается примерно с тем же участком рибосомной 40S субчастицы, что и эметин) из-за этого свойства долгое время считали ингибитором инициации трансляции [64]; однако сейчас известно, что он всё же блокирует транслокацию, хотя точный механизм его работы по-прежнему неясен [65, 66]. Лактимидомицин, относящийся к той же группе веществ (глутаримидам), что и циклогексимид [67], и взаимодействующий

с тем же участком 60S субчастицы, из-за более крупного размера молекулы не способен продуктивно конкурировать с деацилированной тРНК на активно транскрибирующей рибосоме [68]. Видимо, по этой причине он связывается исключительно с 60S субчастицей, только что прибывшей на стартовый кодон в процессе инициации трансляции и имеющей вакантный Е-сайт, и таким образом блокирует только одну (5'-проксимальную) рибосому на всей кодирующей части, из-за чего его добавление приводит не к стабилизации, а к разборке полисом до моносом [67, 69]. Харрингтонин и Т-2 токсин — ингибиторы пептидилтрансферазного центра, но их связывание имеет ту же особенность, что и у лактимидомицина: они блокируют исключительно вновь проинициировавшие рибосомы, и поэтому при их добавлении полисомы также разбираются, однако на каждой мРНК остаётся по одной-единственной 80S рибосоме [64, 70–72].

Помимо веществ, воздействующих на рибосому, мы взяли в нашу подборку также торин-1,

ингибитор протеинкиназы mTOR, воздействие которого приводит к инактивации кэп-связывающего аппарата клетки [73]. Снижение эффективности инициации трансляции высвобождает мРНК из полисом и, согласно вышеописанной модели, должно стимулировать сборку СГ. Однако ранее было показано, что вместо этого торин-1 незначительно ингибирует сборку СГ на двух разных моделях [61, 62], поэтому мы решили изучить его воздействие в нашей системе.

Для проведения экспериментов мы выбрали классическую модель, широко применяемую для изучения СГ в культивируемых клетках млекопитающих — жёсткий окислительный стресс, индуцируемый добавлением арсенита натрия (NaH_2AsO_3), влияние которого на трансляцию хорошо изучено [9, 58, 60, 74–76]. Объект также использовали классический — клетки рака шейки матки человека линии HeLa.

Анализ влияния низкомолекулярных ингибиторов на трансляцию в культивируемых клетках человека. Эксперимент по определению влияния рибосомных ингибиторов на сборку СГ подразумевает полную остановку ими транслирующих рибосом, для чего их нужно добавить в заведомом избытке. Для определения нужных концентраций ингибиторов мы провели анализ подавления ими биосинтеза белка в нашей системе. Ингибирование клеточной трансляции удобно оценивать с помощью метода быстрой мРНК-трансфекции (англ. *fleeting mRNA transfection*, FLERT), разработанного нами ранее для изучения влияния стрессирующих воздействий [58, 77, 78] и низкомолекулярных ингибиторов синтеза белка [79, 80]. В качестве репортерной мРНК был взят экпированный полиаденилированный транскрипт, содержащий 5'-НТО мРНК β -актина человека, ген люциферазы светлячка и 3'-НТО мРНК вируса SV40, поскольку уровень трансляции такого транскрипта хорошо отражает работу типичных клеточных мРНК [57]. Для получения более достоверной картины мы использовали метод прижизненного мониторинга активности люциферазы в реальном времени [59, 79], а в качестве итогового результата брали значения через 10 ч после трансфекции, однако сходная картина подавления наблюдалась и в других временных точках (подробнее см. в разделе «Материалы и методы»).

В соответствии с ожиданиями, при увеличении концентрации ингибиторов активность люциферазы, синтезированной в клетках, снижалась (рис. 1). Во всех случаях, кроме

торина-1, нам удалось достичь полного подавления трансляции трансфицированной мРНК. Результат, полученный с торин-1 (рис. 1, *u*),

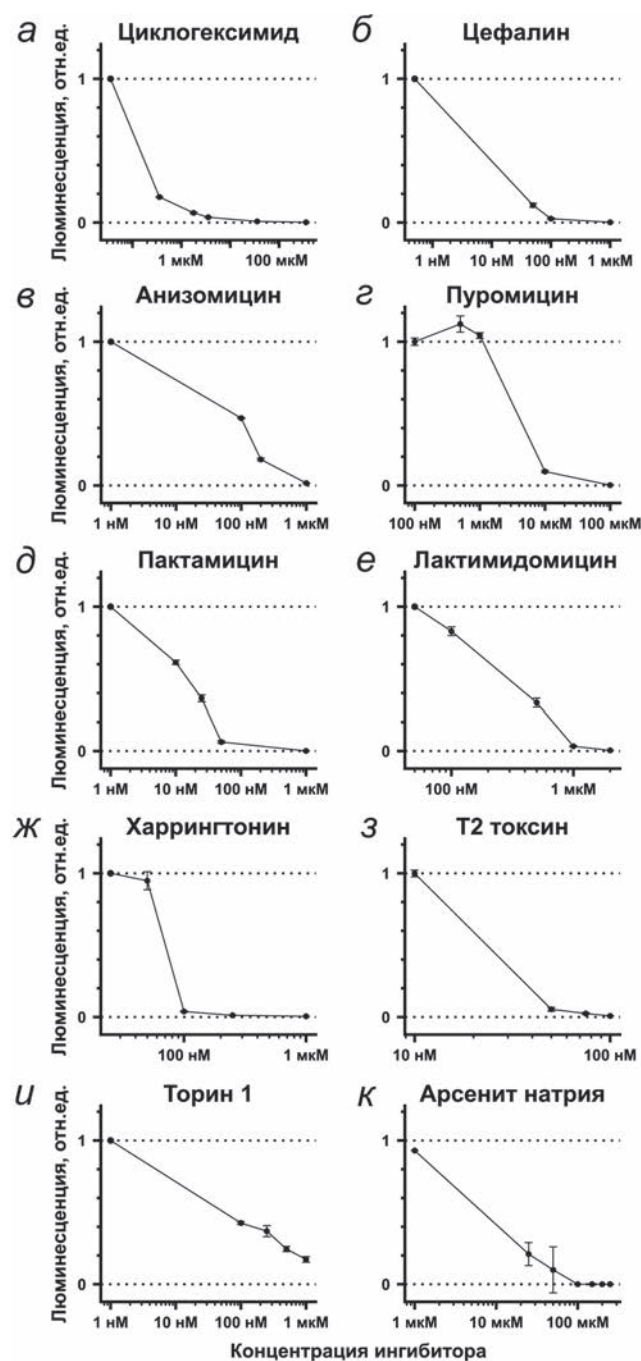


Рис. 1. Анализ влияния избранных низкомолекулярных ингибиторов на трансляцию репортерной мРНК в клетках HeLa (*a–к*). Клетки трансфицировали экпированным полиаденилированным транскриптом, содержащим 5'-НТО мРНК β -актина человека, ген люциферазы светлячка и 3'-НТО мРНК вируса SV40. Перед трансфекцией к клеткам добавляли указанные вещества в разных концентрациях, активность люциферазы измеряли прижизненно в режиме реального времени, после чего брали значения в точке 10 ч (для арсенита натрия — 2 ч) после трансфекции

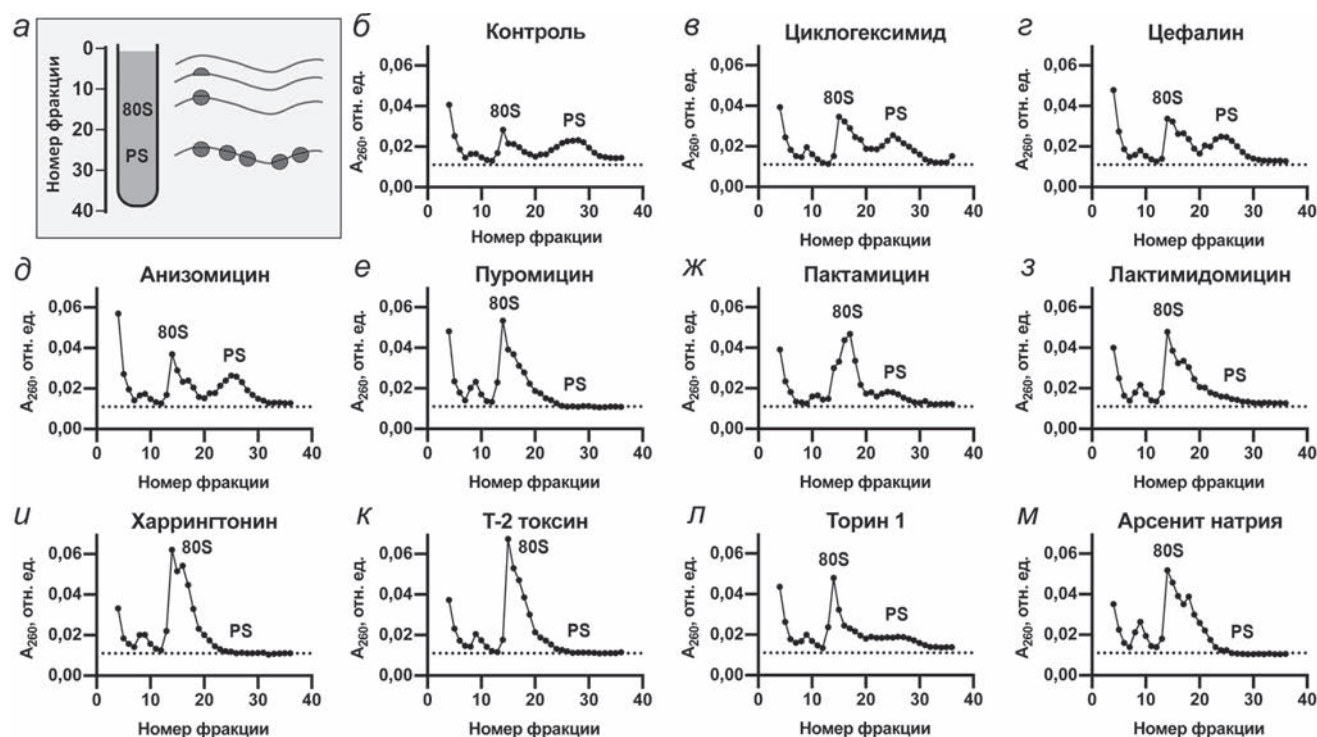


Рис. 2. Анализ полисомных профилей клеток HeLa, обработанных ингибиторами трансляции. *а* – Схема, иллюстрирующая распределение моносом и полисом во фракциях сахарозного градиента. *б* – Полисомный профиль клеток, не обработанных ингибиторами. *в–л* – То же, клетки в течение 30 мин обработаны избытком трансляционных ингибиторов: 350 мкМ циклогексимида, 10 мкМ цефалина, 10 мкМ анизомидина, 1 мМ пурамицина, 10 мкМ пактамицина, 10 мкМ лактимидомидина, 10 мкМ харрингтонина, 10 мкМ Т-2 токсина или 1 мкМ торина-1. *м* – Клетки в течение 1 ч обрабатывали 100 мкМ арсенитом натрия. «80S» – фракции, соответствующие моносомам, «PS» – полисомам

был ожидаемым, поскольку инактивация экзосомы связывающего белка eIF4E не приводит к полному подавлению трансляции большинства мРНК в клетке, оказывая дифференциальное влияние на разные транскрипты [81, 82]. Для дальнейших экспериментов решено было взять концентрации ингибиторов, пятикратно превышающие минимальные концентрации, при которых наблюдалось полное подавление продукции люциферазы в данном опыте (а в случае торина-1 – максимальную испробованную).

В отдельном эксперименте мы провели анализ влияния арсенита натрия на трансляцию трансфицированной мРНК (рис. 1, *к*), чтобы иметь представление о степени подавления трансляции в условиях, используемых для анализа образования СГ. Арсенит добавляли за 1 ч до трансфекции, а значения, представленные на графике, в этом случае соответствуют точке 2 ч после трансфекции (поскольку в ходе многочасовой инкубации клетки приспосабливались к данному виду стресса и возобновляли трансляцию; данные не представлены).

Анализ влияния низкомолекулярных ингибиторов на полисомы. Чтобы оценить действие ингибиторов на общую клеточную трансля-

цию, а также убедиться, что на нашей модели эффекты их действия на полисомы не отличаются от описанных в литературе, мы проанализировали полисомный профиль в клетках HeLa, подвергнутых обработке ингибиторами в выбранных концентрациях на протяжении 30 мин (рис. 2). Как и ожидалось, обработка циклогексимидом, эметином и анизомидином приводила к накоплению тяжелой фракции (т.е. к стабилизации полисом), в то время как пурамицин, пактамицин, лактимидомидин, харрингтонин, Т-2 токсин и торин-1 перераспределяли оптическую плотность в область моносом и верхних фракций (т.е. способствовали разборке полисом). В случае пактамицина и торина-1 полной разборки полисом не наблюдалось, однако клетки, обработанные пурамицином, лактимидомидином, харрингтонином и Т-2 токсином, демонстрировали очень сходное изменение полисомного профиля, указывающее на полное перетекание оптической плотности из области полисом в область моносом. При этом, как известно из литературы (см. обзор Dmitriev et al. [56]), в случае пурамицина фракция моносом представляет собой в основном «пустые» 80S рибосомы (не содержащие мРНК), в то время как

в случае лактимидомицина, харрингтонины, Т-2 токсина и пактамицина пик моносом в основном должен соответствовать единичным 80S рибосомам, заблокированным в области старта [56, 65, 69, 83, 84]. Таким образом, нам удалось подобрать условия, при которых в клетке накапливаются мРНК с протяжёнными участками, освобождёнными от рибосом, но несущие на себе по одной-единственной 80S рибосоме.

Влияние рибосомных ингибиторов на сборку стресс-гранул при арсенитном стрессе. Подобранным образом нужные нам условия и убедившись в том, что действие ингибиторов соответствует ожидаемому, мы перешли к анализу их влияния на сборку СГ. Как уже было сказано выше, классическим индуктором образования СГ в культивируемых клетках млекопитающих является арсенит натрия, который вызывает жёсткий окислительный стресс [9, 74–76]. Клетки HeLa выдерживали в течение 30 мин с ингибиторами трансляции, добавленными в тех же самых концентрациях, которые до этого использовали в опыте по анализу полисомного профиля, а затем добавляли 100 мкМ арсенита и инкубировали ещё 1 ч, после чего клетки фиксировали и проводили окраску (рис. 3). Для визуализации СГ использовали антитела к белку G3BP1, классическому маркеру этих органелл.

Как и ожидалось, в отсутствие рибосомных ингибиторов арсенитный стресс приводил к появлению в клетках микроскопически различных СГ. Аналогичные гранулы также обнаруживались в клетках, преинкубированных с пуромицином, но отсутствовали в слу-

чае добавления циклогексимида, цефалина и анизомицина, что полностью согласуется с ранее описанными эффектами, оказанными этими ингибиторами на сборку СГ [14, 37–39, 51, 54, 55]. Пактамицин воспрепятствовал сборке, что, однако, сложно интерпретировать из-за его двоякого действия на полисомы в нашей модели (рис. 2, ж). Обработка же торином-1 не помешала сборке СГ, что в целом соответствует более ранним наблюдениям [61, 62]. И хотя этот результат не слишком хорошо соотносится с вышеописанной моделью сборки СГ (см. Введение), в которой одну из ключевых ролей играют освобожденные от рибосом протяжённые участки мРНК — ведь их количество при частичной разборке полисом должно очевидным образом увеличиваться, его можно объяснить либо неполной разборкой полисом (рис. 2, л), либо важной ролью взаимодействия eIF4E с eIF4G в образовании СГ [61].

Наконец, в клетках, преинкубированных с лактимидомицином, харрингтонином и Т-2 токсином (также приводящими к разборке полисом, однако оставляющими на мРНК одну 80S рибосому в начале кодирующей части), арсенит не вызывал появления СГ. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях, когда большинство мРНК в клетке вышли из полисом, но несут по одной 80S рибосоме, образование СГ становится невозможным. Наиболее простым объяснением этого факта является то, что такие мРНК-моносомные комплексы не способны входить в состав СГ и поэтому не могут участвовать в LLPS-опосредованной конденсации, несмотря на наличие протяжённых участков, свободных от рибосом.

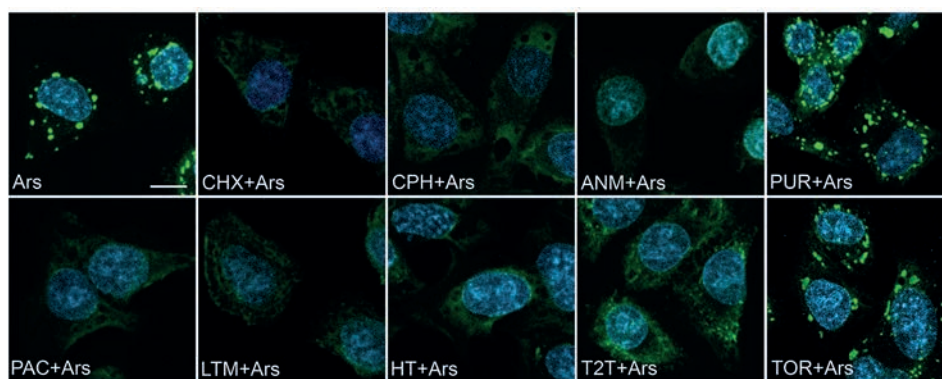


Рис. 3. Анализ влияния трансляционных ингибиторов на формирование стресс-гранул, индуцированное арсенитом натрия. Представлены конфокальные микрофотографии клеток HeLa, подвергнутых последовательной обработке указанными рибосомными ингибиторами (CHX — 350 мкМ циклогексимида, CPH — 10 мкМ цефалина, ANM — 10 мкМ анизомицина, PUR — 1 мМ пуромицина, PAC — 10 мкМ пактамицина, LTM — 10 мкМ лактимидомицина, HT — 10 мкМ харрингтонины, T2T — 10 мкМ Т-2 токсина, TOR — 1 мкМ торина-1) на протяжении 30 мин и 100 мкМ арсенитом натрия (Ars) в течение 60 мин. Клетки фиксированы и окрашены антителами к G3BP1 (маркер СГ, зелёный канал) и красителем Hoechst 33342 (ядра, синий канал). Представлено репрезентативное поле из нескольких десятков проанализированных полей. Все фотографии сделаны при одинаковом увеличении (масштаб линейки — 10 мкм) и мощности возбуждающего лазера, для каждой панели представлена сумма всех кадров соответствующей Z-стопки

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитоплазматические РНК-белковые конденсаты (СГ, Р-тельца, герминальные гранулы, нейрональные гранулы и прочие РНП-содержащие немембранные компартменты) играют важную роль в РНК-метаболизме эукариотических клеток [3, 5, 7, 85]. Физико-химические принципы, лежащие в основе их формирования, связаны с LLPS [21, 22, 24–26, 28–30], однако молекулярные механизмы, обеспечивающие их сборку, изучены недостаточно.

Принято считать, что в случае СГ триггером LLPS служат определённые модификации РНК-связывающих белков (например, G3BP1/2) вкупе с появлением в клетке протяжённых участков мРНК, свободных от рибосом [27, 31, 33, 34]. Агрегация этих участков РНК может приводить к образованию СГ аналогично тому, как частично денатурированные белки, накапливающиеся в клетке при тепловом шоке, образуют белковые агрегаты [86] — при этом рибосомы, РНК-хеликазы и некоторые РНК-связывающие белки выполняют роль РНК-шаперонов, регулирующих РНК-РНК-взаимодействия. В условиях резкого увеличения доступных для спаривания участков мРНК (что наблюдается при массивном выходе мРНК из полисом) этот аппарат перестаёт справляться с нагрузкой подобно тому, как белковых шаперонов становится недостаточно для поддержания протеостаза при тепловом шоке [86].

В полном соответствии с этой моделью классические рибосомные ингибиторы, которые блокируют элонгацию и стабилизируют полисомы — циклогексимид, эметин и анизомицин — предотвращают сборку СГ, в то время как полная разборка полисом под действием индуктора преждевременной терминации, пуромицина, наоборот, ей способствует или даже провоцирует образование СГ [10, 14, 37–39, 51, 55]. Здесь мы ещё раз подтвердили эти факты.

Однако в данной работе мы впервые проанализировали влияние на формирование СГ ингибиторов элонгации другого типа — лактимидомицина, харрингтонина и Т-2 токсина. Их мишенью также является рибосома (Е-сайт или пептидилтрансферазный центр 60S субчастицы, как и, например, в случае циклогексимид или анизомицина), однако в силу некоторых структурных особенностей [68] они не способны конкурировать с тРНК на активно транслирующих рибосомах, поэтому связываются только с вакантными субчастицами. В результате на каждой мРНК они блокируют единственную 80S рибосому, только что приступившую к элонгации, останавливая её в

самом начале кодирующей части (подробно рассмотрено в обзоре Dmitriev et al. [56]). Остальные рибосомы при этом продолжают элонгацию, благополучно завершают и в итоге покидают мРНК. В случае харрингтонина и лактимидомицина это их свойство используется для картирования стартов трансляции методом рибосомного профайлинга [69, 83, 84]. Однако нас они заинтересовали потому, что в клетках, обработанных рибосомными ингибиторами этого типа, мРНК, с одной стороны, имеют освобождённые от рибосом протяжённые участки (как и после обработки клеток пуромицином), но с другой — на них находятся одиночные рибосомы, остановленные в начале кодирующих частей. Казалось бы, разборка полисом и появление таких «обнажённых» участков должны способствовать образованию СГ. Однако вместо этого мы обнаружили ингибирование их сборки. Таким образом, мы показали, что разборка полисом сама по себе не всегда способствует сборке СГ. Более того, наши данные позволяют предположить, что если на мРНК остаётся хотя бы одна 80S рибосома, даже когда вся остальная кодирующая часть освобождена от рибосом, вовлечение этой мРНК в СГ становится невозможным.

Мы не смогли найти иных объяснений нашему наблюдению. Поскольку все процедуры с клетками, обработанными разными ингибиторами, проводили по одинаковому протоколу, речь едва ли может идти об артефакте фиксации клеток. На всякий случай мы повторили наш эксперимент с некоторыми из ингибиторов в прижизненном формате (используя для визуализации другой маркер СГ — фьюжн-белок PABP-mCherry, данные не представлены) и получили такие же результаты. Используемые нами вещества были коммерческими препаратами сходной степени чистоты и оказывали ингибирующее действие на трансляцию, соответствующее ожидаемому, поэтому неспецифичные эффекты «неканонических» ингибиторов весьма маловероятны. Кроме того, одновременное добавление комбинации «классических» ингибиторов, пуромицина и циклогексимид, которая, согласно данным рибосомного профайлинга [87], также приводит к избирательному накоплению единичных рибосом на стартовом кодоне, оказывала такое же воздействие, как и добавление лактимидомицина, харрингтонина или Т-2 токсина (данные не представлены). Принимая во внимание все эти факты, мы считаем наше предположение о невозможности вовлечения мРНК с находящейся на ней единственной 80S рибосомой в СГ наиболее правдоподобным.

Этот результат особенно интересен в контексте хорошо задокументированных наблюдений об индукции образования СГ веществами, которые вызывают арест сканирующих 43S рибосомных комплексов на 5'-НТО мРНК, блокируя работу РНК-хеликазы eIF4A, — патеамином А, гиппуристаноном и рокаглатами типа сильвестрола [47–50]. Аналогичный эффект был описан также для эдеина [88], который приводит к накоплению 40S субчастиц на мРНК (однако следует заметить, что в норме это вещество не способно проникать в клетки [89] — в соответствии с чем в наших руках эдеин не оказывал ингибирующего действия на трансляцию в клетках, данные не представлены). Кроме того, ингибирование присоединения 60S субчастиц к 48S преинициаторному комплексу ещё одним веществом, МДМР, хотя и не индуцировало образование СГ, но и не влияло на их сборку [51]. Таким образом, наличие малых субчастиц рибосом на мРНК не препятствует их попаданию в СГ.

Объяснений того, почему наличие даже одной 80S рибосомы на мРНК препятствует её вовлечению в СГ, может быть несколько. Это может быть связано со свойствами 60S рибосомных субчастиц, которые могут активно исключаться из СГ, либо с белками, которые узнают остановленные 80S рибосомы [90] и препятствуют вхождению таких комплексов в СГ. Нельзя также исключать, что структура мРНК в состоянии, связанном с 80S рибосомами, но не с 40S субчастицами, топологически не способствует образованию РНК-РНК-взаимодействий и вовлечению мРНК в конденсаты (например, известно, что транслируемые мРНК имеют особую топологию как в структурном, так и в функциональном плане — см. обсуждение в работах Alekhina et al. и Baymukhametov et al. [91, 92] и ссылки в них). Наконец, пожалуй, самый интересный вариант объяснения наших результатов заключается в том, что вовлечение мРНК в СГ может требовать прямого контакта РНК-связывающих белков с межсубъединичным интерфейсом или другими областями 40S субчастицы, находящейся на мРНК, которые недоступны в случае ассоциированных субчастиц. Таким

белком может быть G3BP1/2, ключевой компонент СГ, для которого ранее было показано прямое связывание с 40S субчастицей рибосомы [93, 94].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наши данные позволяют сделать вывод, что для формирования стресс-гранул недостаточно появления в клетке большого количества протяжённых участков мРНК, свободных от рибосом, но требуется также освобождение как минимум части транскриптов от рибосомных 60S субчастиц. Это может быть связано с необходимостью ассоциации РНК-связывающих белков, необходимых для вовлечения мРНК в стресс-гранулы, с теми областями находящейся на мРНК 40S субчастицы, которые недоступны в 80S рибосоме.

Вклад авторов. А.Г. Федоровский, А.В. Бураков, И.М. Теренин, Д.А. Быков, К.А. Лашкевич, В.И. Попенко, Н.Е. Макарова, И.И. Соколин — постановка экспериментов; Д.А. Быков и С.Е. Дмитриев — концепция исследования; И.М. Теренин, П.В. Иванов, С.Е. Дмитриев — обсуждение результатов; В.С. Прасолов, С.Е. Дмитриев — предоставление инфраструктуры и руководство проектом; А.Г. Федоровский, А.В. Бураков, И.М. Теренин, А.П. Сухина, С.Е. Дмитриев — подготовка иллюстраций, написание, редактирование и перевод статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00291).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Евгении А. Пановой (ФББ МГУ) за препарат мРНК Actin-Fluc. В работе использован конфокальный микроскоп Zeiss LSM900, приобретённый по Программе развития МГУ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhattar, N., Dmitriev, S. E., and Ivanov, P. (2023) Cell death or survival: Insights into the role of mRNA translational control, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **154**, 138–154, doi: 10.1016/j.semcdb.2023.06.006.
2. Guzikowski, A. R., Chen, Y. S., and Zid, B. M. (2019) Stress-induced mRNP granules: Form and function of processing bodies and stress granules, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **10**, e1524, doi: 10.1002/wrna.1524.

3. Ivanov, P., Kedersha, N., and Anderson, P. (2019) Stress granules and processing bodies in translational control, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, a032813, doi: 10.1101/cshperspect.a032813.
4. Protter, D. S., and Parker, R. (2016) Principles and properties of stress granules, *Trends Cell Biol.*, **26**, 668-679, doi: 10.1016/j.tcb.2016.05.004.
5. Riggs, C. L., Kedersha, N., Ivanov, P., and Anderson, P. (2020) Mammalian stress granules and P bodies at a glance, *J. Cell Sci.*, **133**, jcs242487, doi: 10.1242/jcs.242487.
6. Anderson, P., and Kedersha, N. (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage, *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 141-150, doi: 10.1016/j.tibs.2007.12.003.
7. Lashkevich, K. A., and Dmitriev, S. E. (2021) mRNA targeting, transport and local translation in eukaryotic cells: from the classical view to a diversity of new concepts, *Mol. Biol.*, **55**, 507-537, doi: 10.1134/S0026893321030080.
8. Sorokin, I. I., Vassilenko, K. S., Terenin, I. M., Kalinina, N. O., Agol, V. I., and Dmitriev, S. E. (2021) Non-canonical translation initiation mechanisms employed by eukaryotic viral mRNAs, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1060-1094, doi: 10.1134/S0006297921090042.
9. Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I. J., Stahl, J., and Anderson, P. (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules, *Mol. Biol. Cell*, **13**, 195-210, doi: 10.1091/mbc.01-05-0221.
10. Makeeva, D. S., Riggs, C. L., Burakov, A. V., Ivanov, P. A., Kushchenko, A. S., Bykov, D. A., Popenko, V. I., Prassolov, V. S., Ivanov, P. V., and Dmitriev, S. E. (2023) Relocalization of translation termination and ribosome recycling factors to stress granules coincides with elevated stop-codon readthrough and reinitiation rates upon oxidative stress, *Cells*, **12**, 259, doi: 10.3390/cells12020259.
11. Harvey, R., Dezi, V., Pizzinga, M., and Willis, A. E. (2017) Post-transcriptional control of gene expression following stress: the role of RNA-binding proteins, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 1007-1014, doi: 10.1042/BST20160364.
12. Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules, *J. Cell Biol.*, **147**, 1431-1442, doi: 10.1083/jcb.147.7.1431.
13. Matsuki, H., Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G. N., Oie, M., and Fujii, M. (2013) Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation, *Genes Cells*, **18**, 135-146, doi: 10.1111/gtc.12023.
14. Mazroui, R., Huot, M. E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y., and Khandjian, E. W. (2002) Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression, *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 3007-3017.
15. Kedersha, N., Ivanov, P., and Anderson, P. (2013) Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem. Sci.*, **38**, 494-506, doi: 10.1016/j.tibs.2013.07.004.
16. Jain, S., Wheeler, J. R., Walters, R. W., Agrawal, A., Barsic, A., and Parker, R. (2016) ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure, *Cell*, **164**, 487-498, doi: 10.1016/j.cell.2015.12.038.
17. Youn, J. Y., Dunham, W. H., Hong, S. J., Knight, J. D. R., Bashkurov, M., Chen, G. I., Bagci, H., Rathod, B., MacLeod, G., Eng, S. W. M., Angers, S., Morris, Q., Fabian, M., Cote, J. F., and Gingras, A. C. (2018) High-density proximity mapping reveals the subcellular organization of mRNA-associated granules and bodies, *Mol. Cell*, **69**, 517-532.e511, doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.020.
18. Markmiller, S., Soltanieh, S., Server, K. L., Mak, R., Jin, W., Fang, M. Y., Luo, E. C., Krach, F., Yang, D., Sen, A., Fulzele, A., Wozniak, J. M., Gonzalez, D. J., Kankel, M. W., Gao, F. B., Bennett, E. J., Lecuyer, E., and Yeo, G. W. (2018) Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules, *Cell*, **172**, 590-604.e513, doi: 10.1016/j.cell.2017.12.032.
19. Youn, J. Y., Dyakov, B. J. A., Zhang, J., Knight, J. D. R., Vernon, R. M., Forman-Kay, J. D., and Gingras, A. C. (2019) Properties of stress granule and P-body proteomes, *Mol. Cell*, **76**, 286-294, doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.014.
20. Marmor-Kollet, H., Siany, A., Kedersha, N., Knafo, N., Rivkin, N., Danino, Y. M., Moens, T. G., Olender, T., Sheban, D., Cohen, N., Dadoosh, T., Addadi, Y., Ravid, R., Eitan, C., Toth Cohen, B., Hofmann, S., Riggs, C. L., Advani, V. M., Higginbottom, A., Cooper-Knock, J., et al. (2020) Spatiotemporal proteomic analysis of stress granule disassembly using APEX reveals regulation by SUMOylation and links to ALS pathogenesis, *Mol. Cell*, **80**, 876-891.e876, doi: 10.1016/j.molcel.2020.10.032.
21. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., and Rosen, M. K. (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 285-298, doi: 10.1038/nrm.2017.7.
22. Jain, A., and Vale, R. D. (2017) RNA phase transitions in repeat expansion disorders, *Nature*, **546**, 243-247, doi: 10.1038/nature22386.
23. Alberti, S., Gladfelter, A., and Mittag, T. (2019) Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates, *Cell*, **176**, 419-434, doi: 10.1016/j.cell.2018.12.035.
24. Shin, Y., and Brangwynne, C. P. (2017) Liquid phase condensation in cell physiology and disease, *Science*, **357**, doi: 10.1126/science.aaf4382.

25. Zhang, H., Elbaum-Garfinkle, S., Langdon, E. M., Taylor, N., Occhipinti, P., Bridges, A. A., Brangwynne, C. P., and Gladfelter, A. S. (2015) RNA controls PolyQ protein phase transitions, *Mol. Cell*, **60**, 220-230, doi: 10.1016/j.molcel.2015.09.017.
26. Langdon, E. M., Qiu, Y., Ghanbari Niaki, A., McLaughlin, G. A., Weidmann, C. A., Gerbich, T. M., Smith, J. A., Crutchley, J. M., Termini, C. M., Weeks, K. M., Myong, S., and Gladfelter, A. S. (2018) mRNA structure determines specificity of a polyQ-driven phase separation, *Science*, **360**, 922-927, doi: 10.1126/science.aar7432.
27. Van Treeck, B., and Parker, R. (2018) Emerging roles for intermolecular RNA-RNA interactions in RNP assemblies, *Cell*, **174**, 791-802, doi: 10.1016/j.cell.2018.07.023.
28. Kroschwald, S., Maharana, S., Mateju, D., Malinowska, L., Nuske, E., Poser, I., Richter, D., and Alberti, S. (2015) Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules, *eLife*, **4**, e06807, doi: 10.7554/eLife.06807.
29. Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., Mittag, T., and Taylor, J. P. (2015) Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization, *Cell*, **163**, 123-133, doi: 10.1016/j.cell.2015.09.015.
30. Patel, A., Lee, H. O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnelt, M., Hein, M. Y., Stoyanov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T. M., Pozniakovski, A., Poser, I., Maghelli, N., Royer, L. A., Weigert, M., Myers, E. W., Grill, S., Drechsel, D., Hyman, A. A., and Alberti, S. (2015) A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation, *Cell*, **162**, 1066-1077, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.047.
31. Van Treeck, B., Protter, D. S. W., Matheny, T., Khong, A., Link, C. D., and Parker, R. (2018) RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 2734-2739, doi: 10.1073/pnas.1800038115.
32. Panas, M. D., Ivanov, P., and Anderson, P. (2016) Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics, *J. Cell Biol.*, **215**, 313-323, doi: 10.1083/jcb.201609081.
33. Guillen-Boixet, J., Kopach, A., Holehouse, A. S., Wittmann, S., Jahnelt, M., Schlusser, R., Kim, K., Trussina, I., Wang, J., Mateju, D., Poser, I., Maharana, S., Ruer-Gruss, M., Richter, D., Zhang, X., Chang, Y. T., Guck, J., Honigsmann, A., Mahamid, J., Hyman, A. A., et al. (2020) RNA-induced conformational switching and clustering of G3BP drive stress granule assembly by condensation, *Cell*, **181**, 346-361. e317, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.049.
34. Yang, P., Mathieu, C., Kolaitis, R. M., Zhang, P., Messing, J., Yurtsever, U., Yang, Z., Wu, J., Li, Y., Pan, Q., Yu, J., Martin, E. W., Mittag, T., Kim, H. J., and Taylor, J. P. (2020) G3BP1 is a tunable switch that triggers phase separation to assemble stress granules, *Cell*, **181**, 325-345. e328, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.046.
35. Khong, A., Matheny, T., Jain, S., Mitchell, S. F., Wheeler, J. R., and Parker, R. (2017) The stress granule transcriptome reveals principles of mRNA accumulation in stress granules, *Mol. Cell*, **68**, 808-820. e805, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.015.
36. Namkoong, S., Ho, A., Woo, Y. M., Kwak, H., and Lee, J. H. (2018) Systematic characterization of stress-induced RNA granulation, *Mol. Cell*, **70**, 175-187. e178, doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.025.
37. Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D. E., and Anderson, P. (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules, *J. Cell Biol.*, **151**, 1257-1268, doi: 10.1083/jcb.151.6.1257.
38. Mollet, S., Cougot, N., Wilczynska, A., Dautry, F., Kress, M., Bertrand, E., and Weil, D. (2008) Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress, *Mol. Biol. Cell*, **19**, 4469-4479, doi: 10.1091/mbc.e08-05-0499.
39. Brengues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies, *Science*, **310**, 486-489, doi: 10.1126/science.1115791.
40. Kedersha, N., and Anderson, P. (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability, *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 963-969, doi: 10.1042/bst0300963.
41. Reineke, L. C., Dougherty, J. D., Pierre, P., and Lloyd, R. E. (2012) Large G3BP-induced granules trigger eIF2 α phosphorylation, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 3499-3510, doi: 10.1091/mbc.E12-05-0385.
42. Kimball, S. R., Horetsky, R. L., Ron, D., Jefferson, L. S., and Harding, H. P. (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **284**, C273-C284, doi: 10.1152/ajpcell.00314.2002.
43. Souquere, S., Mollet, S., Kress, M., Dautry, F., Pierron, G., and Weil, D. (2009) Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells, *J. Cell Sci.*, **122**, 3619-3626, doi: 10.1242/jcs.054437.
44. Moon, S. L., Morisaki, T., Khong, A., Lyon, K., Parker, R., and Stasevich, T. J. (2019) Multicolour single-molecule tracking of mRNA interactions with RNP granules, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 162-168, doi: 10.1038/s41556-018-0263-4.
45. Mateju, D., Eichenberger, B., Voigt, F., Eglinger, J., Roth, G., and Chao, J. A. (2020) Single-molecule imaging reveals translation of mRNAs localized to stress granules, *Cell*, **183**, 1801-1812. e1813, doi: 10.1016/j.cell.2020.11.010.

46. Seguin, S. J., Morelli, F. F., Vinet, J., Amore, D., De Biasi, S., Poletti, A., Rubinshtein, D. C., and Carra, S. (2014) Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly, *Cell Death Differ.*, **21**, 1838-1851, doi: 10.1038/cdd.2014.103.
47. Dang, Y., Kedersha, N., Low, W. K., Romo, D., Gorospe, M., Kaufman, R., Anderson, P., and Liu, J. O. (2006) Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A, *J. Biol. Chem.*, **281**, 32870-32878, doi: 10.1074/jbc.M606149200.
48. Mazroui, R., Sukarieh, R., Bordeleau, M. E., Kaufman, R. J., Northcote, P., Tanaka, J., Gallouzi, I., and Pelletier, J. (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4212-4219, doi: 10.1091/mbc.e06-04-0318.
49. Cencic, R., Carrier, M., Galicia-Vazquez, G., Bordeleau, M. E., Sukarieh, R., Bourdeau, A., Brem, B., Teodoro, J. G., Greger, H., Tremblay, M. L., Porco, J. A., Jr., and Pelletier, J. (2009) Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[*b*]benzofuran, silvestrol, *PLoS One*, **4**, e5223, doi: 10.1371/journal.pone.0005223.
50. Low, W. K., Dang, Y., Schneider-Poetsch, T., Shi, Z., Choi, N. S., Merrick, W. C., Romo, D., and Liu, J. O. (2005) Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A, *Mol. Cell*, **20**, 709-722, doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.008.
51. Mokas, S., Mills, J. R., Garreau, C., Fournier, M. J., Robert, F., Arya, P., Kaufman, R. J., Pelletier, J., and Mazroui, R. (2009) Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2673-2683, doi: 10.1091/mbc.e08-10-1061.
52. Emara, M. M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N., Hu, G. F., and Anderson, P. (2010) Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly, *J. Biol. Chem.*, **285**, 10959-10968, doi: 10.1074/jbc.M109.077560.
53. Fujimura, K., Sasaki, A. T., and Anderson, P. (2012) Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8099-8110, doi: 10.1093/nar/gks566.
54. Fukuda, T., Naiki, T., Saito, M., and Irie, K. (2009) hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions, *Genes Cells*, **14**, 113-128, doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01256.x.
55. Samir, P., Kesavardhana, S., Patmore, D. M., Gingras, S., Malireddi, R. K. S., Karki, R., Guy, C. S., Briard, B., Place, D. E., Bhattacharya, A., Sharma, B. R., Nourse, A., King, S. V., Pitre, A., Burton, A. R., Pelletier, S., Gilbertson, R. J., and Kanneganti, T. D. (2019) DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome, *Nature*, **573**, 590-594, doi: 10.1038/s41586-019-1551-2.
56. Dmitriev, S. E., Vladimirov, D. O., and Lashkevich, K. A. (2020) A quick guide to small-molecule inhibitors of eukaryotic protein synthesis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1389-1421, doi: 10.1134/S0006297920110097.
57. Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., Adyanova, Z. V., Terenin, I. M., and Shatsky, I. N. (2009) Efficient cap-dependent translation of mammalian mRNAs with long and highly structured 5'-untranslated regions *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **43**, 108-113, doi: 10.1134/S0026893309010154.
58. Akulich, K. A., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Anisimova, A. S., Makeeva, D. S., Arkhipova, V. I., Stolboushkina, E. A., Garber, M. B., Prokofjeva, M. M., Spirin, P. V., Prassolov, V. S., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. (2016) Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes, *Sci. Rep.*, **6**, 37905, doi: 10.1038/srep37905.
59. Panova, E. A., Kleymenov, D. A., Shcheblyakov, D. V., Bykonina, E. N., Mazunina, E. P., Dzharullaeva, A. S., Zolotar, A. N., Derkaev, A. A., Esmagambetov, I. B., Sorokin, I. I., Usachev, E. V., Noskov, A. N., Ivanov, I. A., Zatsepin, T. S., Dmitriev, S. E., Gushchin, V. A., Naroditsky, B. S., Logunov, D. Y., and Gintsburg, A. L. (2023) Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A, *Front. Immunol.*, **14**, 1098302, doi: 10.3389/fimmu.2023.1098302.
60. Andreev, D. E., O'Connor, P. B., Fahey, C., Kenny, E. M., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Cormican, P., Morris, D. W., Shatsky, I. N., and Baranov, P. V. (2015) Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression, *eLife*, **4**, e03971, doi: 10.7554/eLife.03971.
61. Fournier, M. J., Coudert, L., Mellaoui, S., Adjibade, P., Gareau, C., Cote, M. F., Sonenberg, N., Gaudreault, R. C., and Mazroui, R. (2013) Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 2285-2301, doi: 10.1128/MCB.01517-12.
62. Ying, S., and Khapersky, D. A. (2020) UV damage induces G3BP1-dependent stress granule formation that is not driven by mTOR inhibition-mediated translation arrest, *J. Cell Sci.*, **133**, jcs248310, doi: 10.1242/jcs.248310.
63. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., and Bolton, E. E. (2023) PubChem 2023 update, *Nucleic Acids Res.*, **51**, D1373-D1380, doi: 10.1093/nar/gkac956.
64. Tscherne, J. S., and Pestka, S. (1975) Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 479-487, doi: 10.1128/AAC.8.4.479.

65. Akulich, K. A., Sinitcyn, P. G., Lomakin, I. B., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Mironov, A. A., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. (2017) Peptidyl transferase inhibitors arrest the ribosome at specific amino acid codons: insights from an integrated approach, *FEBS J.*, **284**, 104-392, doi: 10.1111/febs.14174.
66. Dinos, G., Wilson, D. N., Teraoka, Y., Szaflarski, W., Fucini, P., Kalpaxis, D., and Nierhaus, K. H. (2004) Dissecting the ribosomal inhibition mechanisms of edeine and pactamycin: the universally conserved residues G693 and C795 regulate P-site RNA binding, *Mol. Cell*, **13**, 113-124, doi: 10.1016/s1097-2765(04)00002-4.
67. Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B., and Liu, J. O. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin, *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 209-217, doi: 10.1038/nchembio.304.
68. Garreau de Loubresse, N., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, M. V., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2014) Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome, *Nature*, **513**, 517-522, doi: 10.1038/nature13737.
69. Lee, S., Liu, B., Lee, S., Huang, S. X., Shen, B., and Qian, S. B. (2012) Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2424-E2432, doi: 10.1073/pnas.1207846109.
70. Fresno, M., Jimenez, A., and Vazquez, D. (1977) Inhibition of translation in eukaryotic systems by harringtonine, *Eur. J. Biochem.*, **72**, 323-330, doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11256.x.
71. Cundliffe, E., Cannon, M., and Davies, J. (1974) Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 30-34, doi: 10.1073/pnas.71.1.30.
72. Cannon, M., Smith, K. E., and Carter, C. J. (1976) Prevention, by ribosome-bound nascent polypeptidylalanine chains, of the functional interaction of t-2 toxin with its receptor site, *Biochem. J.*, **156**, 289-294, doi: 10.1042/bj1560289.
73. Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L. J., Sim, T., Sabatini, D. M., and Gray, N. S. (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1, *J. Biol. Chem.*, **284**, 8023-8032, doi: 10.1074/jbc.M900301200.
74. Brostrom, C. O., Prostko, C. R., Kaufman, R. J., and Brostrom, M. A. (1996) Inhibition of translational initiation by activators of the glucose-regulated stress protein and heat shock protein stress response systems. Role of the interferon-inducible double-stranded RNA-activated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 24995-25002, doi: 10.1074/jbc.271.40.24995.
75. Bernstam, L., and Nriagu, J. (2000) Molecular aspects of arsenic stress, *J. Toxicol. Environ. Health. Part B Crit. Rev.*, **3**, 293-322, doi: 10.1080/109374000436355.
76. Ruiz-Ramos, R., Lopez-Carrillo, L., Rios-Perez, A. D., De Vizcaya-Ruiz, A., and Cebrian, M. E. (2009) Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kappaB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells, *Mutat. Res.*, **674**, 109-115, doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.021.
77. Akulich, K. A., Sinitcyn, P. G., Makeeva, D. S., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Anisimova, A. S., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. (2019) A novel uORF-based regulatory mechanism controls translation of the human MDM2 and eIF2D mRNAs during stress, *Biochimie*, **157**, 92-101, doi: 10.1016/j.biochi.2018.11.005.
78. Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., and Shatsky, I. N. (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 836-841, doi: 10.1038/nsmb.1445.
79. Osterman, I. A., Wieland, M., Maviza, T. P., Lashkevich, K. A., Lukianov, D. A., Komarova, E. S., Zakalyukina, Y. V., Buschauer, R., Shiriaev, D. I., Leyn, S. A., Zlamal, J. E., Biryukov, M. V., Skvortsov, D. A., Tashlitsky, V. N., Polshakov, V. I., Cheng, J., Polikanov, Y. S., Bogdanov, A. A., Osterman, A. L., Dmitriev, S. E., et al. (2020) Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 1071-1077, doi: 10.1038/s41589-020-0578-x.
80. Prokhorova, I. V., Akulich, K. A., Makeeva, D. S., Osterman, I. A., Skvortsov, D. A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., Yusupova, G., Yusupov, M. M., and Dmitriev, S. E. (2016) Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome, *Sci. Rep.*, **6**, 27720, doi: 10.1038/srep27720.
81. Andreev, D. E., Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Prassolov, V. S., Merrick, W. C., and Shatsky, I. N. (2009) Differential contribution of the m7G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6135-6147, doi: 10.1093/nar/gkp665.
82. Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., and Sabatini, D. M. (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation, *Nature*, **485**, 109-113, doi: 10.1038/nature11083.
83. Ingolia, N. T., Lareau, L. F., and Weissman, J. S. (2011) Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes, *Cell*, **147**, 789-802, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002.
84. Gerashchenko, M. V., Peterfi, Z., Yim, S. H., and Gladyshev, V. N. (2021) Translation elongation rate

- varies among organs and decreases with age, *Nucleic Acids Res.*, **49**, e9, doi: 10.1093/nar/gkaa1103.
85. Anderson, P., and Kedersha, N. (2006) RNA granules, *J. Cell Biol.*, **172**, 803-808, doi: 10.1083/jcb.200512082.
 86. Ripin, N., and Parker, R. (2022) Are stress granules the RNA analogs of misfolded protein aggregates? *RNA*, **28**, 67-75, doi: 10.1261/rna.079000.121.
 87. Fritsch, C., Herrmann, A., Nothnagel, M., Szafranski, K., Huse, K., Schumann, F., Schreiber, S., Platzer, M., Krawczak, M., Hampe, J., and Brosch, M. (2012) Genome-wide search for novel human uORFs and N-terminal protein extensions using ribosomal footprinting, *Genome Res.*, **22**, 2208-2218, doi: 10.1101/gr.139568.112.
 88. Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Loschi, M., Pasquini, J. M., Correale, J., Kindler, S., and Boccaccio, G. L. (2005) Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 405-420, doi: 10.1091/mbc.e04-06-0516.
 89. Contreras, A., and Carrasco, L. (1979) Selective inhibition of protein synthesis in virus-infected mammalian cells, *J. Virol.*, **29**, 114-122, doi: 10.1128/JVI.29.1.114-122.1979.
 90. Schuller, A. P., and Green, R. (2018) Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 526-541, doi: 10.1038/s41580-018-0011-4.
 91. Alekhina, O. M., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., and Vassilenko, K. S. (2020) Functional cyclization of eukaryotic mRNAs, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1677, doi: 10.3390/ijms21051677.
 92. Baymukhametov, T. N., Lyabin, D. N., Chesnokov, Y. M., Sorokin, I. I., Pechnikova, E. V., Vasiliev, A. L., and Afonina, Z. A. (2023) Polyribosomes of circular topology are prevalent in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 908-918, doi: 10.1093/nar/gkac1208.
 93. Kedersha, N., Panas, M. D., Achorn, C. A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., Thomas, M., Lieberman, J., McInerney, G. M., Ivanov, P., and Anderson, P. (2016) G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits, *J. Cell Biol.*, **212**, 845-860, doi: 10.1083/jcb.201508028.
 94. Meyer, C., Garzia, A., Morozov, P., Molina, H., and Tuschl, T. (2020) The G3BP1-family-USP10 deubiquitinase complex rescues ubiquitinated 40S subunits of ribosomes stalled in translation from lysosomal degradation, *Mol. Cell*, **77**, 1193-1205.e1195, doi: 10.1016/j.molcel.2019.12.024.

A SOLITARY STALLED 80S RIBOSOME PREVENTS mRNA RECRUITMENT TO STRESS GRANULES

Artem G. Fedorovskiy^{1,2}, Anton V. Burakov¹, Ilya M. Terenin^{1,3}, Dmitry A. Bykov^{1,4,5},
Kseniya A. Lashkevich¹, Vladimir I. Popenko⁵, Nadezhda E. Makarova^{1#},
Ivan I. Sorokin^{1&}, Anastasia P. Sukhinina^{1,6}, Vladimir S. Prassolov⁵,
Pavel V. Ivanov⁷, and Sergey E. Dmitriev^{1,5,6*}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru

² Faculty of Materials Science, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

³ Sirius University of Science and Technology, 354340 Sirius, Krasnodar region, Russia

⁴ Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁵ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

⁶ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁷ Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, 02115 Boston, MA, USA

In response to stress stimuli, eukaryotic cells typically suppress protein synthesis. This leads to the mRNA release from polysomes, their condensation with RNA-binding proteins, and the formation of non-membrane-bound cytoplasmic compartments called stress granules (SGs). SGs contain 40S but generally lack 60S ribosomal subunits. It is known that cycloheximide, emetine, and anisomycin, the ribosome inhibitors which block the 80S ribosome progression along mRNA and stabilize polysomes, prevent SG assembly. Conversely, puromycin, which induces premature termination, releases mRNAs from polysomes and stimulates the formation of SGs. The same effect is caused by some translation initiation inhibitors, which lead to polysome disassembly and the accumulation of mRNAs in a form of stalled 48S preinitiation complexes. Based on these and other data, it is believed that the trigger for SG formation is the presence of mRNA with extended ribosome-free segments, which tend to form condensates in the cell. In this study, we evaluated the ability of various small-molecule translation inhibitors to block or stimulate the assembly of SGs under conditions of severe oxidative stress induced by sodium arsenite. Contrary to expectations, we found that ribosome-targeting elongation inhibitors of a specific type, that arrest solitary 80S ribosomes at the beginning of the mRNA coding regions but do not interfere with all subsequent ribosomes in completing

translation and leaving the transcripts (such as harringtonine, lactimidomycin, or T-2 toxin), completely prevented the formation of arsenite-induced SGs. These observations suggest that the presence of even a single 80S ribosome on mRNA is sufficient to prevent its recruitment into SGs, and the presence of extended ribosome-free regions of mRNA is not sufficient for SG formation. We propose that mRNA entry into SGs may be mediated by specific contacts between RNA-binding proteins and those regions on 40S subunits that remain inaccessible when ribosomes are associated.

Keywords: stress granules, liquid-liquid phase separation, small molecule inhibitors of translation, ribosome inhibitors, elongation, polysomes, harringtonine, lactimidomycin, T-2 toxin, stalled ribosome

ПЕПТИДНЫЕ НОСИТЕЛИ КАК СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. МЕХАНИЗМЫ И ПОТЕНЦИАЛ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Обзор

© 2023 Е.Д. Тимотиевич*, И.П. Шиловский, М.Р. Хаитов

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,
115522 Москва, Россия; электронная почта: ed0594@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.03.2023

После доработки 13.09.2023

Принята к публикации 15.09.2023

В настоящее время разрабатывается значительное количество лекарственных и профилактических средств, содержащих терапевтические нуклеиновые кислоты, для лечения онкологических, воспалительных, инфекционных заболеваний, а также заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ. Растёт число одобренных к использованию подобных препаратов, что демонстрирует перспективность генной терапии. Свой биологический эффект терапевтические нуклеиновые кислоты реализуют в цитоплазме клетки, при этом плазматическая мембрана является основным препятствием для их внутриклеточной доставки. Поэтому при разработке подобных препаратов зачастую используют специально созданные носители. Оптимальный носитель должен не только обеспечивать интернализацию нуклеиновых кислот, но и быть малотоксичным, стабильным, а также несложным и незатратным в производстве. Всем этим требованиям соответствуют так называемые проникающие пептиды (СРР), которые зарекомендовали себя как эффективные и малотоксичные носители нуклеиновых кислот. СРР представляют собой основные пептиды с положительным зарядом при физиологическом значении pH, которые способны формировать наноструктуры с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами. Многочисленные доклинические исследования, в которых СРР использовали в роли носителя, показали многообещающие результаты, что в отдельных случаях обеспечило успешное прохождение клинических испытаний и внедрение препарата в медицинскую практику. В данном обзоре мы рассматриваем многообразие терапевтических нуклеиновых кислот, а также обобщаем опыт использования СРР для их внутриклеточной доставки. Кроме того, обсуждается классификация и механизмы поглощения СРР клетками, понимание которых позволит ускорить разработку новых генно-терапевтических лекарственных средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: проникающие пептиды, пептидные средства доставки, средства доставки нуклеиновых кислот, миРНК.

DOI: 10.31857/S032097252311012X, **EDN:** MNWBMS

ВВЕДЕНИЕ

За последние два десятилетия существенно выросло количество разработок новых лекарственных средств, в составе которых в качестве фармацевтических субстанций используются нуклеиновые кислоты. Среди терапевтических

нуклеиновых кислот широкое распространение в медицине получают РНК- и ДНК-вакцины [1]. Также создаются олигонуклеотидные препараты, в состав которых входят антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), аптамеры, молекулы малых интерферирующих РНК (миРНК) и другие [2].

Принятые сокращения: АСО – антисмысловые олигонуклеотиды; миРНК – малые интерферирующие РНК; CeNA-нуклеотиды – циклогексеновые нуклеиновые кислоты; СРР – проникающие пептиды; DRBD – РНК-связывающий домен; EGS – внешняя направляющая последовательность; HBV – вирус гепатита В человека; LNA-нуклеотиды – замкнутые нуклеиновые кислоты; PIP2 – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; PNA-нуклеотиды – нуклеотиды, модифицированные с использованием пептидо-нуклеиновых кислот; РМО – фосфородиамидат-морфолиновый олигомер; RISC – сайленсинговый комплекс, индуцируемый молекулами РНК.

* Адресат для корреспонденции.

Несмотря на огромный потенциал, использование нуклеиновых кислот в качестве терапевтических средств сопряжено с рядом сложностей; они подвержены разрушению нуклеазами организма, могут элиминироваться фагоцитарной системой и ферментами печени. Однако главной сложностью остаётся эффективная доставка терапевтических молекул к месту действия [3]. Эта проблема частично решена путём использования различных векторов доставки как вирусной, так и невирусной природы. Известны вирусные векторы на основе лентивирусов и аденовирусов, однако, несмотря на высокую эффективность, вирусные векторы обладают рядом существенных недостатков [4, 5]. Среди невирусных векторов широко распространены наночастицы (в том числе липосомы, полимерные наночастицы) и пептиды [6].

В последние десятилетия активно разрабатывают пептидные носители для доставки различных терапевтических молекул в клетки-мишени. К настоящему моменту изучается возможность применения проникающих пептидов (cell penetrating peptides, CPP) в препаратах для лечения онкологических заболеваний (рак молочной железы, колоректальный рак, рак лёгких и пр.), для чего используют пептиды с собственной противоопухолевой (онколитической) активностью либо способных целенаправленно доставлять противоопухолевый препарат [7–9]. CPP способны доставлять терапевтические молекулы не только в определённые клетки, но и органеллы. Например, пептид на основе TAT способен проникать в митохондрии клеток и доставлять в них антиоксидантный белок hMT1A, который уменьшает образование активных форм кислорода и тем самым в экспериментальной модели предотвращает формирование проявлений болезни Паркинсона [10, 11]. Широко исследуется возможность применения CPP в целях ингибирования воспалительных процессов [9]. Известны CPP, направленные против STAT3, ингибирование которого значительно нивелирует воспаление при псориазе. Противовоспалительные препараты на основе CPP часто применяют трансдермально, что является оправданным, т.к. некоторые их модификации хорошо проникают через роговой слой кожных покровов [11, 12]. Ряд исследований описывает применение CPP в офтальмологии, т.к. их удобно использовать в форме глазных капель. Препарат XG-102, имеющий в своём составе пептид TAT, используется для уменьшения воспаления глаз после операции по удалению катаракты и успешно прошёл фазу 3

клинических испытаний (NCT02508337). Другие препараты на основе пептидов (KAI, POD, TAT-aFGF-His и TAT-μCL) находятся в стадии разработки [13]. Использование CPP является потенциальным методом улучшения биодоступности инсулина. Альтернативой подкожных инъекций является использование перорального инсулина, однако при таком способе применения он имеет низкую биодоступность. Доставка инсулина с использованием CPP является многообещающим подходом [11, 14]. Обширная область применения CPP — это разработка новых подходов для терапии и профилактики вирусных инфекций. К настоящему времени на основе CPP создают противовирусные препараты, а также вакцины [15] против таких патогенов как: вирус гепатита С, риновирус, коксакивирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус Эбола, грипп типа А, ВИЧ-1, папиллома вирус, герпесвирус, SARS-CoV-2 и др. [16].

В последние десятилетия активно развивается область использования пептидных векторных систем для доставки терапевтических нуклеиновых кислот. К достоинствам CPP, в сравнении с другими векторами, можно отнести биodeградируемость и биосовместимость, относительную простоту в получении, стандартизации и хранении. Кроме того, в отличие от вирусных векторов, они не иммуногенны и не приводят к мутациям [15]. В этом обзоре мы обобщаем последние разработки в области создания и использования векторов на основе пептидов для доставки терапевтических нуклеиновых кислот.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Благодаря своей высокой специфичности, функциональному разнообразию и низкой токсичности терапевтические нуклеиновые кислоты имеют огромные перспективы использования в медицине. Главным образом эти препараты способны специфично подавлять экспрессию целевых генов по различным механизмам: АСО, рибозимы, ДНКзимы, внешние направляющие последовательности (EGS), миРНК и т.д. (табл. 1). В настоящее время для медицинского применения одобрено не менее 15 препаратов, содержащих нуклеиновые кислоты [2], 7 из которых в своём составе содержат невирусные векторы доставки [2, 17].

АСО — это, как правило, одноцепочечные синтетические ДНК-олигонуклеотиды длиной 15–25 н. Их эффекты обусловлены

Таблица 1. Характеристика и молекулярные механизмы технологий специфического подавления генной экспрессии

Тип	Мишень	Характеристика агента	Механизм действия
АСО первого поколения	мРНК	одноцепочечные синтетические ДНК-олигонуклеотиды, состоящие из 15–25 фосфоротиоатных нуклеотидов	данный тип АСО после связывания с мРНК-мишенью способен рекрутировать клеточную РНКазу H, тем самым усиливать деградацию мРНК-мишени, что в итоге увеличивает супрессию гена; недостатки — неспецифический иммунный ответ, токсичность
АСО второго поколения	мРНК	одноцепочечные синтетические ДНК-олигонуклеотиды, состоящие из 15–25 2'МОЕ-нуклеотидов	взаимодействуют с мРНК-мишенью с увеличенной аффинностью, что приводит к подавлению генной экспрессии за счёт стерической блокады процесса трансляции; недостатки — не рекрутирует клеточный фермент РНКазу H, поэтому проявляет более слабый эффект супрессии гена в сравнении с АСО первого поколения
АСО третьего поколения	мРНК	одноцепочечные синтетические ДНК-олигонуклеотиды, состоящие из 15–25 PNA-, FANA-, CeNA-, LNA-нуклеотидов	стерическая блокада процесса трансляции; длительность биологического эффекта достигается за счёт устойчивости к ДНКазам
Аптамеры	белок	одноцепочечные синтетические молекулы ДНК или РНК длиной 56–120 н.	за счёт распознавания структуры с высокой аффинностью связываются с белковой мишенью
Рибозимы	мРНК	каталитически активные одноцепочечные молекулы РНК	рибозимы комплементарно связываются с молекулами мРНК и самостоятельно катализируют её расщепление
ДНКзимы	мРНК	каталитически активные одноцепочечные молекулы ДНК	ДНКзимы комплементарно связываются с молекулами мРНК и в присутствии двухвалентных ионов магния самостоятельно катализируют расщепление мРНК в участке между неспаренным пурином (R) и спаренным пиримидином (Y) гетеродуплекса ДНК/РНК
EGS	мРНК	синтетические одноцепочечные молекулы РНК размером 15–20 н.	EGS комплементарно связываются с молекулой мРНК, после чего расщепляет её посредством клеточного фермента РНКазы Р
ДНК-ловушки	белок (факторы транскрипции)	двухцепочечные ДНК-олигонуклеотиды	ДНК-ловушки имитируют участки промоторов, тем самым конкурируют с естественным геном за транскрипционные факторы
U1-адапторы	пре-мРНК	синтетический олигонуклеотид, состоящий из 30–50 РНК, ДНК или модифицированных нуклеотидов	в ядре клетки U1-адаптор за счёт целевого участка специфически взаимодействует с пре-мРНК-мишенью, а за счёт консервативного U1-домена взаимодействует с рибонуклеопротеиновым комплексом, который обеспечивает разрезание пре-мРНК-мишени в области сайта полиаденилирования; в результате этого пре-мРНК лишается поли-А-хвоста, защищающего её от действия РНКаз и быстро деградирует, что в итоге обеспечивает подавление экспрессии гена в целом
миРНК	мРНК	РНК-дуплексы размером 21–25 п.н.	при помощи комплекса RISC осуществляется специфическое разрезание мРНК гена-мишени в определённых участках

Таблица 1 (продолжение)

Тип	Мишень	Характеристика агента	Механизм действия
мРНК-препараты	—	одноцепочечные полноразмерные мРНК	напрямую вводятся в организм, кодируя целевой белок (например, антигены вакцин)
ДНК-препараты	—	рекомбинантные ДНК—плазмиды	

Примечание. PNA-нуклеотиды — нуклеотиды, модифицированные с использованием пептидо-нуклеиновых кислот; FANA-нуклеотиды — 2'-дезоксигуанозин-2'-фтор-β-D-арабинонуклеиновые кислоты; CeNA-нуклеотиды — циклогексенонуклеиновые кислоты; LNA-нуклеотиды — замкнутые нуклеиновые кислоты; 2'МОЕ-модификация — модифицированные нуклеотиды, содержащие алкил-модификацию в 2'-позиции рибозы.

гибридизацией с мРНК-мишенью по принципу комплементарности, в результате чего стерически затрудняется трансляция белка. Некоторые АСО проектируются таким образом, чтобы при взаимодействии с мРНК-мишенью активировалась РНКазы Н, которая расщепляет целевую мРНК, что позволяет увеличить активность. Разработано несколько поколений АСО.

АСО первого поколения состоят из модифицированных нуклеотидов (фосфоротиоатная модификация), благодаря чему они приобретают устойчивость к воздействию нуклеаз. Данный тип АСО рекрутирует РНКазу Н для деградации мРНК-мишени. Недостатками данного поколения АСО являются возможность запуска нежелательных иммунных реакций, а также способность неспецифически взаимодействовать с клеточными белками, что оказывает токсический эффект.

АСО второго поколения состоят из модифицированных нуклеотидов, содержащих алкил-модификацию в 2'-позиции рибозы (2'-O-methoxyethyl-oligonucleotides или так называемая 2'МОЕ-модификация). Данный тип АСО устойчив к действию нуклеаз, а также взаимодействует с мРНК-мишенью с увеличенной аффинностью. Однако этот тип АСО менее эффективен в сравнении с первым поколением, поскольку не привлекает клеточную РНКазу Н, а подавление генной экспрессии происходит за счёт стерической блокады ферментов трансляции.

Третье поколение АСО состоит из нуклеотидов с иными модификациями нуклеотидов. Например, проектируются АСО на основе пептидо-нуклеиновых кислот (PNA — peptide nucleic acids), 2'-дезоксигуанозин-2'-фтор-β-D-арабинонуклеиновых кислот (FANA — 2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinonucleic acids), «замкнутых» нуклеиновых кислот (LNA — locked nucleic acids), циклогексен-нуклеиновых кислот (CeNA — cyclohexene nucleic acids) и др. [3], ко-

торые практически не подвергаются деградации нуклеазами. Два препарата на основе АСО одобрены для медицинского применения: фомивирсен — на основе АСО первого поколения для лечения цитомегаловирусного ретинита и мипомерсен — на основе АСО второго поколения для лечения гиперхолестеринемии. Множество (более 50) подобных препаратов находится на стадии клинических исследований [18].

Аптамеры представляют собой одноцепочечные синтетические молекулы ДНК или РНК длиной 56–120 н., сходные по структуре с АСО. Аптамеры выступают в роли «ловушек» для белков; они могут с высокой аффинностью связываться целевыми белками, нарушая их функционирование. В отличие от АСО, аптамеры осуществляют свой эффект не посредством комплементарного взаимодействия оснований, а подобно антителам, взаимодействуя с белковой мишенью. Таким образом, они представляют собой привлекательную альтернативу моноклональным антителам, поскольку мало токсичны, неиммуногенны, хорошо проникают в ткани, относительно просты в получении и могут вводиться как внутривенно, так и подкожно [3].

Рибозимы — каталитически активные одноцепочечные молекулы РНК, способствующие специфичному расщеплению мРНК-мишеней. За счёт особой третичной структуры рибозимы формируют две петли, которые связываются с мРНК-мишенью и образуют каталитическое ядро, расщепляющее молекулы мРНК. Рибозимы имеют свои недостатки — они малоустойчивы к РНКазам, и поэтому требуют стабилизации, что увеличивает себестоимость синтеза.

ДНКзимы — это каталитически активные одноцепочечные молекулы ДНК. Как и рибозимы они имеют собственный каталитический центр, способный расщеплять молекулы мРНК без привлечения нуклеаз. ДНКзимы

более стабильны и менее затратны для производства, чем рибозимы, но в сравнении с миРНК обладают большими размерами и сложны в синтезе.

EGS (External guide sequence) — это синтетические одноцепочечные РНК-олигонуклеотиды размером 15–20 н. В цитоплазме клетки EGS связываются с мРНК-мишенью по принципу комплементарности, после чего мРНК разрезается в районе дуплекса посредством клеточного фермента РНКазы Р (RNase P). Благодаря активации этого фермента EGS эффективно подавляют ген-мишень, однако они неустойчивы к действию РНКаз [19].

ДНК-ловушки — это двуцепочечные ДНК-олигонуклеотиды, имитирующие участки промоторов. Благодаря такому сходству они связываются с транскрипционными факторами, тем самым конкурируют с естественным геном, подавляя его активность [20].

U1-адапторы — это синтетические олигонуклеотиды, состоящие из 30–50 н. РНК, ДНК или модифицированных нуклеотидов. Структурно U1-адаптор состоит из двух участков; целевой участок — располагается на 5'-конце U1-адаптора, он проектируется комплементарным 3'-концевому экзону мРНК-мишени, благодаря чему U1-адаптор способен распознавать мРНК-мишень; второй участок представляет собой консервативный U1-домен, который способен гибридизоваться с малой ядерной РНК (мяРНК), которая, в свою очередь, входит в состав рибонуклеопротеинового комплекса, обладающего нуклеазной активностью. Процесс подавления экспрессии посредством U1-адаптора происходит в ядре, а не в цитоплазме. U1-адаптор за счёт таргетного участка специфически взаимодействует с мРНК-предшественником (пре-мРНК), а за счёт консервативного U1-домена взаимодействует с рибонуклеопротеиновым комплексом, который обеспечивает разрезание пре-мРНК-мишени в области сайта полиаденилирования. В результате этого пре-мРНК лишается полиА-хвоста, защищающего её от действия РНКаз, и быстро деградирует, что в итоге обеспечивает подавление экспрессии целевого гена [21].

миРНК — двуцепочечные молекулы РНК размером 21–25 п.н., способные специфично подавлять экспрессию генов по механизму интерференции РНК [22] (рис. 1). Молекулярный механизм интерференции РНК включает два этапа: этап инициации и эффекторный этап [23]. На этапе инициации центральная роль принадлежит ферменту Dicer, который находится в цитоплазме и фрагментирует крупные молекулы двуцепочечной РНК, про-

никшие, например, в результате вирусной инфекции, на короткие дуплексы — миРНК. На эффекторном этапе миРНК соединяются с белковыми факторами, образуя мультисубъединичный комплекс RISC (RNA-induced silencing complex — сайленсинговый комплекс, индуцируемый молекулами РНК). В состав комплекса входит белок AGO, который обеспечивает специфичность взаимодействия с мРНК-мишенью. После связывания с целевой мРНК комплекс RISC осуществляет её первичное разрезание, а в дальнейшую деградацию вовлекаются экзонуклеазы клетки. Введение в клетки искусственных миРНК необходимого размера (в среднем 21 п.н.) с заданной последовательностью позволяет избежать процессинга ферментом Dicer, в результате чего они сразу же включаются в комплекс RISC и осуществляют специфическое подавление экспрессии гена-мишени. В отличие от одноцепочечных рибозимов, EGS и U1-адапторов, двуцепочечные молекулы миРНК более устойчивы к РНКазам, к тому же для увеличения их устойчивости и эффективности разработаны разные способы модификации нуклеотидов [24]. На сегодняшний день было инициировано более 30 клинических испытаний препаратов на основе миРНК. По данным на 2022 год, 6 препаратов на основе миРНК против вируса гепатита В (HBV) проходят клинические испытания: ARC-520, ARB-1467, AB-729, RG-6346, VIR-2218 и JNJ-3989 [25]. Недавно было зарегистрировано первое лекарственное средство — Inclesiran (разработчик Alnylam Pharmaceuticals, приобретена лицензия компанией «Novartis») для лечения пациентов с атеросклеротическим сердечно-сосудистым заболеванием и гиперхолестеринемией [26]. Позднее FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) одобрило ещё 3 препарата на основе миРНК (patisiran, givosiran и lumasiran) [27], а в РФ был зарегистрирован препарат МИР 19 для лечения COVID-19 [17, 28].

Препараты на основе мРНК. Основным классом препаратов, содержащих молекулы мРНК, являются вакцины [29]. Преимущество мРНК заключается в способности одной такой молекулы экспрессировать несколько целевых белков. К ограничениям мРНК-препаратов относят низкую стабильность и иммуногенность (т.к. часто мРНК содержат иммуностимулирующие последовательности). К тому же, в отличие от относительно небольших молекул миРНК и АСО, доставка крупных мРНК является более сложной задачей [3].

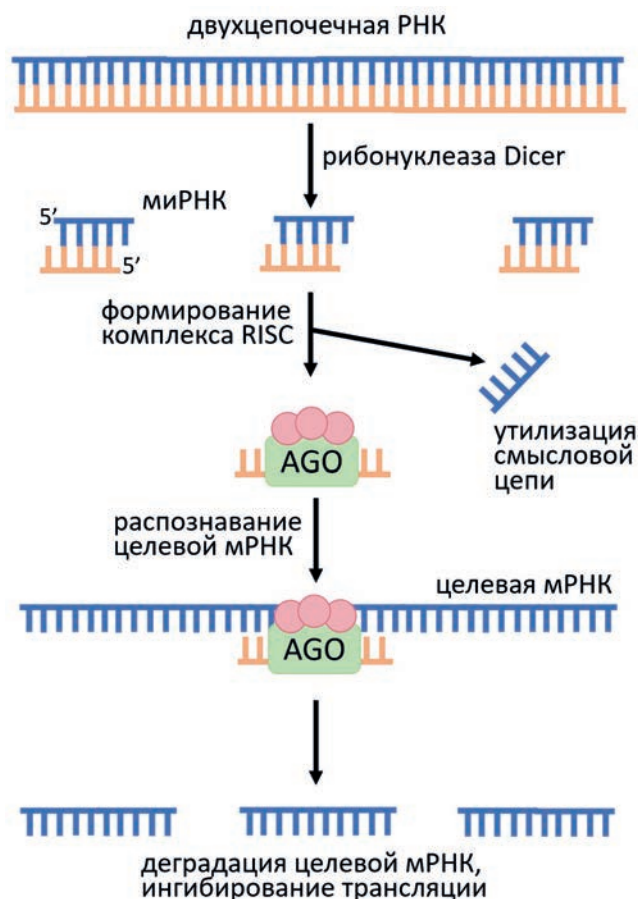


Рис. 1. Схема механизма РНК-интерференции. Молекулярный механизм интерференции РНК включает два этапа: этап инициации (I) и эффекторный этап (II). На этапе I дцРНК расщепляется ферментом Dicer с образованием миРНК. На этапе II миРНК связываются с нуклеазным комплексом RISC. Хеликаза, присутствующая в комплексе, расплетает молекулу миРНК, при этом анти-смысловая цепь остаётся в комплексе. Она направляет комплекс к родственной мРНК, что обеспечивает специфичность взаимодействия с мРНК-мишенью и приводит к её расщеплению

Тем не менее на основе этой технологии создано более 60 препаратов, включая мРНК-вакцины для профилактики COVID-19 от компаний «Pfizer-BioNTech» и «Moderna» [3, 30].

ДНК-препараты представляют собой плазмиды, несущие необходимый генетический материал. Такие плазмидные ДНК-препараты напрямую вводятся в организм, где экспрессируют целевой белок (антиген) [3]. Активно разрабатывались ДНК-вакцины, кодирующие белок-антиген. Однако они демонстрируют низкую эффективность, что побуждает множество научных коллективов по всему миру работать над оптимизацией состава и увеличением их иммуногенности. В настоящее время наиболее перспективным генотерапевтическим подходом для доставки ДНК является использование вирусных векторов. Этот подход реа-

лизован при создании таких препаратов как: Imlygic® (talimogene laherparepvec) на основе вируса простого герпеса для терапии меланом, Luxturna® (voretigene neparvovect) на основе аденоассоциированного вируса для лечения ретиальной дистрофии и Zolgensma® (onasemnogene aberparvovect) на основе аденоассоциированного вируса для терапии спинальной мышечной атрофии и других [31].

Из вышеописанных технологий самой перспективной с точки зрения эффективности и экономической целесообразности является технология РНК-интерференции. Сразу после открытия данного явления и выяснения молекулярного механизма начаты попытки его внедрения в медицинскую практику. Как уже упоминалось выше, внедрению технологии РНК-интерференции препятствует низкая стабильность молекул миРНК в сыворотке крови и отсутствие высокоэффективного и безопасного агента для их адресной доставки в цитоплазму клеток-мишеней. В настоящий момент ведутся исследования по созданию невирусных средств доставки на основе катионных липосом, пептидов и полимеров, а также создаются новые модификации молекул нуклеиновых кислот, устойчивых к действию РНКаз. Все эти разработки в скором времени увеличат возможности использования нуклеиновых кислот в терапевтических целях.

НЕВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Среди невирусных векторов можно выделить липосомы, экзосомы, наночастицы различной природы, катионные полимеры, пептиды и др. [4].

Липосомы — это один из наиболее часто используемых векторов для доставки нуклеиновых кислот. Они, как правило, состоят из катионных и/или амфифильных липидов и холестерина. Их «популярность» объясняется относительной простотой формирования комплекса с нуклеиновыми кислотами (часто за счёт электростатического взаимодействия), высокой эффективностью доставки в целевые клетки, а также тем фактом, что поверхность липосомы можно функционализировать различными лигандами для увеличения тропности к целевым клеткам и тканям. Однако липосомы не лишены таких недостатков, как низкая стабильность (из-за возможности седиментации частиц), высокая токсичность, а также необходимость в дополнительных методах контроля качества при производстве.

В настоящее время зарегистрировано не менее трёх РНК-препаратов на основе липосом, включая Patisiran компании «Alnylam», BNT162b2 компании «Pfizer» и мРНК-1273 компании «Moderna» [6].

Экзосомы представляют собой природные наночастицы (везикулы), инкапсулированные липидным бислоем, которые образуются в результате отпочкования от эукариотических клеток. Считается, что экзосомы осуществляют межклеточную коммуникацию путём транспорта макромолекул (нуклеиновых кислот, белков и липидов), по этой причине они представляют интерес с точки зрения доставки терапевтических олигонуклеотидов. Они, как правило, менее токсичны, в сравнении с липосомами, и способны проходить через биологические барьеры, например ГЭБ. Однако экзосомы менее эффективно (в сравнении с липосомами) связываются с транспортируемыми нуклеиновыми кислотами. Тем не менее несколько препаратов на их основе (производства компаний «Codiak Biosciences» и «Evov Therapeutics») находятся на стадии доклинических исследований [32].

Наночастицы различного рода также используют для доставки нуклеиновых кислот. Например, гибридные наночастицы, состоящие из различных материалов (липиды, полимеры и пептиды), объединяя преимущества каждого компонента [4]. Описаны также векторы на основе наночастиц золота [4], диоксида кремния и пр. материалов [6].

Векторы на основе полимеров имеют ряд преимуществ в сравнении с липосомами. В частности, они менее иммуногенны и легко поддаются модификации, за счёт чего можно формировать их физико-химические свойства (заряд, стабильность и молекулярную массу) и тем самым регулировать растворимость, тропность к тканям и фармакокинетику. Одним из первых полимеров для доставки нуклеиновых кислот начал использоваться полиэтиленмин и его производные. Однако широкое применение этих соединений ограничено их токсичностью [33, 34]. Другой полимер — PLGA (поли-(D,L-лактид-ко-гликолид) — нетоксичен и одобрен для использования в медицине. Однако ввиду отсутствия положительного заряда он электростатически не взаимодействует с нуклеиновыми кислотами. Тем не менее ведутся работы по созданию его производных, адаптированных для доставки терапевтических нуклеиновых кислот [34]. Дендритные (разветвлённые) полимеры (например, поли(амидоамин) дендритные полимеры (ПАМАМ-полимеры)) характеризуются большим коли-

чеством функциональных групп, которые можно модифицировать и задавать необходимые биологические свойства. Однако у таких полимеров есть некоторые недостатки: короткий период полувыведения и токсичность [4].

Основываясь на вышесказанном, можно сделать вывод, что для достижения терапевтического эффекта системы доставки должны быть нетоксичными, стабильными в биологических средах, успешно связываться нуклеиновыми кислотами и проникать в клетки-мишени. Кроме того, при внедрении в широкую медицинскую практику важными аспектами становятся относительная простота получения и контроля качества, а также возможность масштабирования производства. Большинству этих требований отвечают векторы для доставки терапевтических нуклеиновых кислот на основе СРР.

СТРУКТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ТРАНСПОРТНЫХ ПЕПТИДОВ

СРР обычно имеют размер 5–30 а.о., при этом в их составе присутствует значительное количество основных аминокислот (аргинин и лизин), которые обеспечивают позитивный заряд молекулы в водных растворах при физиологическом значении pH. Зачастую СРР имеют амфипатичную структуру, т.е. одна часть пептида обладает гидрофобными свойствами, а другая — гидрофильными. СРР способны не только самостоятельно проникать внутрь клетки, но и транспортировать в цитоплазму различные терапевтические агенты [35, 36], включая нуклеиновые кислоты [24].

История исследований СРР началась с открытия белка ВИЧ ТАТ, который способен проникать и транспортировать различные соединения в клетки млекопитающих. На сегодняшний день база данных CPPsite 2.0 (<http://crdd.osdd.net/raghava/cppsite/>) описывает более 1700 уникальных пептидов с транспортной активностью. Кроме того, описанию свойств и характеристик СРР посвящён ряд современных обзоров [37–39].

Существует несколько классификаций СРР. Согласно классификации, учитывающей размер и физико-химические свойства, СРР подразделяют на первичные амфипатические, вторичные амфипатические и неамфипатические пептиды.

Первичные амфипатические пептиды обычно содержат более 20 а.о. и имеют в своей структуре гидрофильные и гидрофобные аминокислоты. В эту группу входят MPG, пенетратин, CADY, pVes и другие пептиды [40].

Вторичные амфипатические пептиды обычно размером менее 20 а.о. и имеют вторичную структуру в форме α -спирали или β -слоя. Вторичные α -спиральные СРР, как правило, имеют гидрофобный участок на одном из концов, тогда как другой конец пептида может быть гидрофильным (катионный или анионный).

Неамфипатические пептиды представляют собой относительно короткие пептиды (например, HIV-TAT), которые имеют высокое содержание положительно заряженных аминокислот, таких как аргинин или лизин. Исследования показывают, что для эффективного поглощения необходимо не менее восьми положительных зарядов [40].

Катионные дендримерные пептиды, отличающиеся разветвлённой структурой и значительной плотностью положительного заряда за счёт высокого содержания лизина или аргинина, можно выделить в отдельную группу. Такие соединения обладают значительными преимуществами перед линейными пептидами, поскольку благодаря неприродным ε -амидным связям более устойчивы к протеолизу, а наличие большого количества концевых заряженных групп обеспечивает эффективное связывание с нуклеиновыми кислотами. Кроме того, дендримерные СРР также обладают гораздо меньшей цитотоксичностью, чем линейные, что имеет большое значение для их применения в медицине.

Таким образом, ввиду разнообразия структур и физико-химических свойств пептидные носители представляют собой перспективный класс соединений для внутриклеточной доставки терапевтических нуклеиновых кислот. Кроме того, такое разнообразие структур позволяет пептидам задействовать различные молекулярные механизмы для проникновения внутрь клетки-мишени.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ СРР

В настоящее время для изучения механизмов интернализации СРР используется множество различных методов, которые описаны в обзоре Holm et al. [41]. В частности, используют химические вещества — ингибиторы определённых путей эндоцитоза; способность (или неспособность) пептида проникать в эукариотические клетки в присутствии таких ингибиторов позволяет судить о механизмах его проникновения. Также СРР конъюгируют с флюоресцентными метками, что даёт возможность методом конфокальной микроскопии

идентифицировать компартменты клеток, в которых накапливаются СРР, а также оценить кинетику их накопления в клетке, что в итоге позволяет выявлять молекулярные механизмы интернализации.

Согласно современным представлениям [37, 40], выделяют несколько механизмов проникновения СРР в клетки: энергонезависимый (прямое проникновение) и энергозависимый (различные виды эндоцитоза).

Энергонезависимое прямое проникновение СРР. Энергонезависимое прямое проникновение включает два этапа: 1) взаимодействие СРР с мембраной клетки; 2) проникновение в цитоплазму путём образования пор, адаптивной транслокации или образования инвертированных мицелл (рис. 2, а). Такой механизм характерен для СРР, богатых аргинином и лизином [42], наличие которых обеспечивает положительный заряд, что позволяет пептиду электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными протеогликанами или гликозаминогликанами клеточной стенки и тем самым накапливаться на поверхности мембраны. При достижении предельной концентрации пептида происходит дестабилизация структуры липидов в бислое мембраны, в результате чего пептид проникает в цитоплазму через сформированные поры (рис. 2, б). Ввиду того, что в мембране образуются поры на относительно короткие промежутки времени, это позволяет пептиду проникать внутрь клетки, не приводя к её лизису и гибели. Однако формирование пор в клеточной мембране при высоких концентрациях СРР приводит к токсическим эффектам.

Существует несколько молекулярных моделей формирования пор.

Модель «бочка» (barrel-stave model) — модель формирования пор (рис. 2, б), описывающая проникновение амфипатических α -спиральных пептидов. После взаимодействия с клеточной мембраной пептиды образуют кластеры, в центре которых образуются каналы. Поры образованы обращёнными внутрь гидрофильными поверхностями и взаимодействием обращённых наружу гидрофобных остатков с липидной мембраной.

Тороидальная модель (toroidal model) формирования пор применима к пептидам, способным образовывать α -спирали при контакте с клеточными мембранами. Согласно этой модели, взаимодействие между положительными боковыми цепями пептида и фосфатными группами мембраны клетки приводит к накоплению пептида на внешнем её слое. Затем пептиды вызывают изгиб липидного монослоя

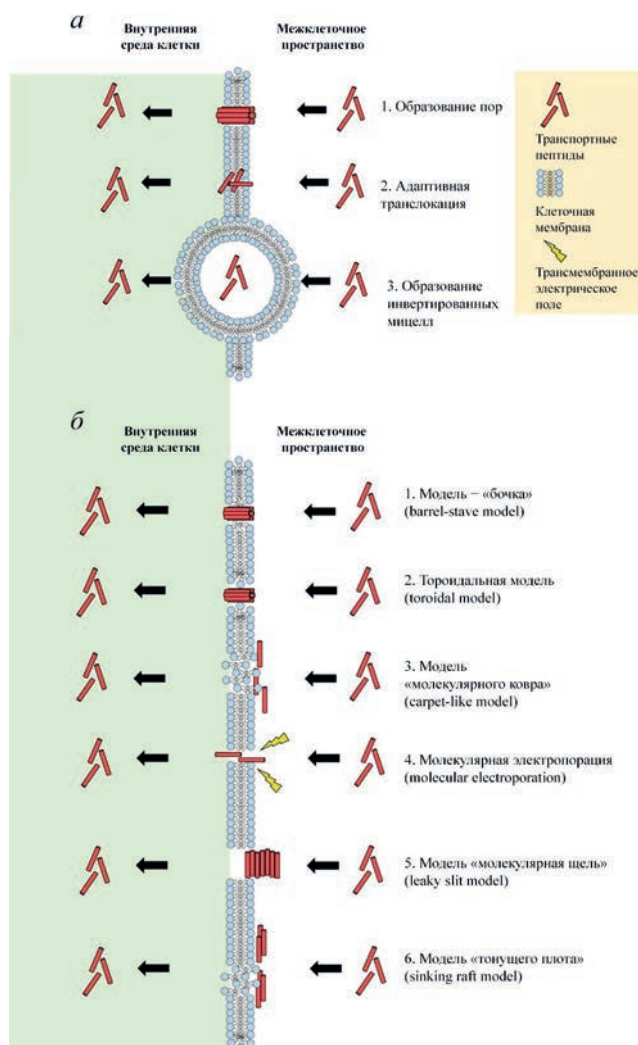


Рис. 2. Энергонезависимые механизмы проникновения СРР через клеточную мембрану. *а* – Пути энергонезависимого проникновения положительно заряженных СРР позволяют пептиду электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженной мембраной клетки с последующим проникновением путём: образования пор (1); адаптивной транслокации (2), при которой СРР как бы «протискиваются» через фосфолипиды клеточной мембраны; образования инвертированных мицелл (3), сопряжённого с инвагинацией мембраны под воздействием положительно заряженных пептидов, и захватыванием их из внеклеточной среды внутрь клетки. *б* – Механизмы молекулярных моделей формирования пор: модель «бочка» (1) предполагает образование пептидами кластеров, в центре которых образуются каналы, через которые СРР проникают в цитозоль; торoidalная модель (2) основана на взаимодействии между положительными цепями пептида и фосфатными группами мембраны клетки, что приводит к изгибанию липидного монослоя внутрь с образованием гидрофильной щели в мембране и проникновению СРР внутрь клетки; модель «молекулярного ковра» (3) предполагает накопление пептидов на поверхности клетки, которые образуют слой наподобие «ковра», с последующей перегруппировкой отрицательных зарядов фосфолипидов мембраны в результате их взаимодействия с катионными группами СРР, что вызывает снижение локального поверхностного натяжения и способствует интеркаляции СРР внутрь мембраны клетки; молекулярная электропорация (4) СРР внутрь клетки возможна за счёт связывания сильно заряженного пептида с мембраной, образования локального электрического поля и разрыва клеточной мембраны; в модели «молекулярной щели» (5) пептиды ориентируются перпендикулярно мембране и агрегируют между собой боковыми поверхностями, образуя «ленту», которая проникает в клетку через «щель» в фосфолипидах клеточной мембраны; модель «тонущего плотa» (6) описывает процесс, при котором пептиды образуют агрегаты, которые диффундируют через мембрану параллельно фосфолипидному бислою

внутрь, образуя гидрофильную щель в мембране, в которой находятся фосфолипидные головки и пептиды.

В модели «молекулярного ковра» (carpet-like model) положительно заряженные пептиды накапливаются на поверхности мембраны

клетки, образуя слой наподобие «ковра» с последующим искажением в результате взаимодействия отрицательно заряженных липидов наружного слоя мембраны и катионных групп СРР. Это вызывает перегруппировку отрицательных зарядов фосфолипидов и истон-

чение мембраны. Агрегация СРР на поверхности мембраны вызывает снижение локального поверхностного натяжения и способствует интеркаляции СРР внутрь мембраны клетки. После интернализации пептида в цитоплазму мембрана вновь восстанавливается [43].

Молекулярная электропорация (molecular electroporation) – другой предполагаемый механизм порообразования, при котором бислойная структура мембраны локально разрывается трансмембранным электрическим полем, образованным за счёт связывания заряженного пептида с мембраной (рис. 2, б).

Модель «молекулярная щель» (leaky slit). В данной модели пептиды ориентируются перпендикулярно мембране и агрегируют между собой боковыми поверхностями, образуя так называемую ленту. Затем другая сторона мембраны загибается сама на себя, образуя щель [40] (рис. 2, б).

Модель «тонущего плоты» (sinking raft model) – альтернативная модель, описывающая процесс, при котором пептиды образуют агрегаты, способные диффундировать через мембрану (рис. 2, б).

При адаптивной транслокации положительно заряженные СРР образуют переходные ионные комплексы с отрицательно заряженными компонентами мембраны (рис. 2, а). Сформированные комплексы обладают слабым положительным зарядом (т.к. происходит частичная нейтрализация заряда СРР), что позволяет пептиду адаптивно диффундировать через клеточную мембрану, при этом «движущей силой» диффузии служит мембранный потенциал [44].

Образование инвертированных мицелл. Прямое проникновение путём образования инвертированных мицелл первоначально было описано для пенетратина (рис. 2, а). Первым этапом процесса интернализации является формирование электростатического взаимодействия между пептидом и клеточной мембраной, что влияет на молекулярную организацию липидов и может приводить к изменению кривизны мембраны. Такие искривления или инвагинации мембраны могут привести к образованию инвертированных мицелл, которые захватывают пептид из внеклеточной среды. Гидрофильная среда внутри инвертированной мицеллы способствует накоплению пептида, после чего внутри клетки мицелла дестабилизируется и пептид высвобождается в цитозоль [40].

Энергозависимое проникновение СРР. Виды эндоцитоза. К энергозависимым способам проникновения пептидов в клетки относят

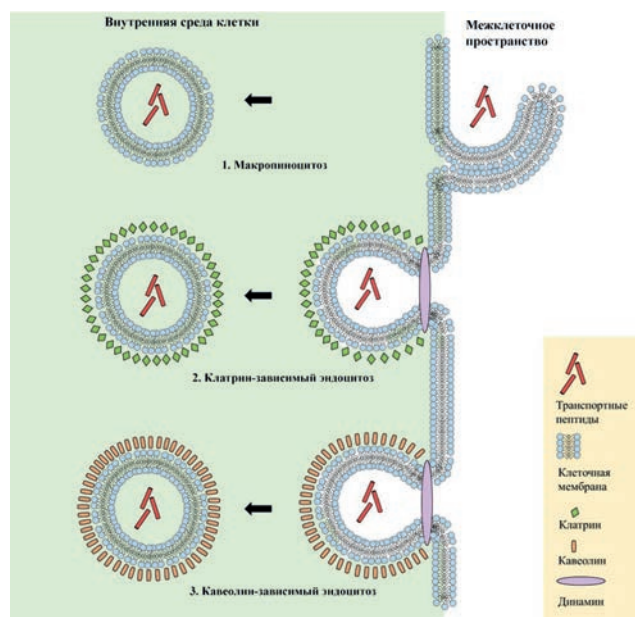


Рис. 3. Энергозависимые механизмы проникновения СРР через клеточную мембрану за счёт гидролиза АТФ: в ходе рецептор-независимого макропиноцитоза формируются выпячивания в мембране клетки, которые сливаются с плазматической мембраной, образуя макропиносомы, в которых инкапсулированный СРР взаимодействуют с протеогликанами на поверхности мембраны (1); при клатрин-зависимом эндоцитозе происходит полимеризация клатрина и актинового цитоскелета клетки, что приводит к инвагинации мембраны и формированию везикул с СРР, отделение которых от донорской мембраны катализируется динамином, затем происходит высвобождение везикулы в цитоплазму клетки и деполимеризация клатрина (2); кавеолин-зависимый эндоцитоз во многом сходен с клатрин-зависимым, однако образование везикулы обеспечивается белками Cav-1, -2 и -3 и кавинами (3)

различные виды эндоцитоза (рис. 3). Эндоцитоз – это процесс транспорта веществ в клетку, в котором задействованы различные её органеллы (мембрана, микротрубочки и пр.). Эндоцитоз подразделяют на 2 категории: фагоцитоз и пиноцитоз. Фагоцитоз используют специализированные виды клеток (макрофаги, дендритные клетки и пр.) для поглощения из внеклеточного пространства крупных макромолекул и частиц. Пиноцитоз используют все виды клеток для поглощения жидкостей из внеклеточного пространства. Он подразделяется на: макропиноцитоз, клатрин-, кавеолин-опосредованный эндоцитоз и клатрин/кавеолин-независимый эндоцитоз с привлечением таких рецепторов, как нейропилин-1 и протеогликанов гепаран сульфата [40, 45]. Вышеуказанные виды транспорта требуют затрат энергии, обычно получаемой за счёт гидролиза АТФ.

Макропиноцитоз – это рецептор-независимый вид транспорта, в котором важную роль

играют липидные рафты мембраны и актиновый цитоскелет клетки (рис. 3). Макропиноцитоз обычно индуцируется в ответ на стимуляцию клетки факторами роста (например, CSF-1, EGF и пр.). В ходе макропиноцитоза формируются выпячивания в мембране клетки, которые не «обволакивают» частицы (как в случае фагоцитоза), а сливаются с плазматической мембраной, образуя большие эндоцитарные везикулы, называемые макропиносомами. При макропиноцитозе СРР взаимодействуют с протеогликанами на поверхности мембраны и (после вовлечения Рас-белка и актина) мембрана реорганизуется, образуя макропиносому, в которых инкапсулирован СРР. Показано, что посредством этого механизма внутрь клеток проникают аргинин-богатые пептиды (R8, R9, R12) [40].

Клатрин-зависимый эндоцитоз является наиболее изученным механизмом (рис. 3). Формирование эндосомы происходит в определённых участках мембраны клетки — так называемые «горячие точки» образования везикул, которые обычно представляют собой участки клеточной мембраны, обогащенные фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатом (PIP₂). PIP₂, в свою очередь, взаимодействует с адаптерными белками, наиболее важный из них — AP2, который связывается с PIP₂ и рекрутирует каркасные белки плазматической мембраны, что приводит к началу сборки клатрина в икосаэдрические структуры на внутренней стороне мембраны [44]. Далее, при накоплении СРР в «горячих точках» формирования везикул происходит инвагинация мембраны. Считается, что полимеризация клатрина и актинового цитоскелета клетки способствует инвагинации и формированию везикулы размером 100–150 нм в диаметре [46]. Отделение везикул от донорской мембраны катализируется белком динамином. Динамин собирается в плотные олигомеры и сжимает мембрану наверху формирующейся везикулы в тонкую перемычку в виде «песочных часов», а затем полностью отделяет её. Далее происходит высвобожденные везикулы в цитоплазму клетки и деполимеризация клатрина. В итоге формируются так называемые ранние эндосомы, которые созревают до поздних эндосом, характеризующихся низким значением pH. Поздние эндосомы, в свою очередь, транспортируют поглощённое вещество в лизосомы — органеллы с ещё более низким pH и наличием ферментов деградации. Ввиду деградации транспортируемых веществ в лизосомах, клатрин-зависимый эндоцитоз является менее предпочтительным механизмом для доставки терапевтических нуклеино-

вых кислот. Для повышения эффективности транспорта используют вспомогательные соединения, которые инициируют ранний выход транспортируемого вещества из эндосомы в цитоплазму клетки (см. ниже). Экспериментально показано, что многие СРР используют данный механизм для проникновения в клетки, среди них TAT [47], MPG α , R8 [48] и др.

Кавеолин-зависимый эндоцитоз во многом сходен с клатрин-зависимым, однако имеет ряд отличительных особенностей (рис. 3). Кавеолы представляют собой колбовидные инвагинации мембраны клетки диаметром около 50–100 нм, присутствующие на многих типах клеток. Кавеолы формируются в участках мембраны, которые богаты холестерином и сфинголипидами; в этих участках также могут располагаться молекулярные рецепторы. Такие гидрофобные участки мембраны некоторые авторы называют липидными рафтами. Главными молекулярными компонентами кавеол являются белки Cav-1, -2 и -3; из них первые два экспрессируются совместно и представлены на широком спектре клеток. Cav-1 — это главный белок, определяющий форму кавеол, гидрофобные аминокислоты которого встроены в плазматическую мембрану. Вторая группа белков, необходимых для реализации кавеолин-опосредованного эндоцитоза, называется кавинами; они локализуются на внутренней стороне мембраны клетки, обращенной к цитозолю, и необходимы для взаимодействия с цитоскелетом клетки. Показано, что кавин-1, связываясь с кавеолинами, холестерином и фосфатидилсеринем, стабилизирует кривизну мембраны и поддерживает колбовидную форму кавеол. Другими важными молекулярными компонентами кавеол являются актиновый цитоскелет клетки и холестерин, а также динамин, который взаимодействует непосредственно с Cav-1 в основании кавеолы и обеспечивает её отпочковывание с последующим образованием внутриклеточной везикулы [40]. Интернализация кавеол приводит к образованию кавеосом — везикул с гетерогенной морфологией и нейтральным pH внутри, что отличает их от поздних эндосом с низким pH. По всей видимости, транспортируемое содержимое кавеосом не подвергается деградации, как это происходит в лизосомах при клатрин-опосредованном эндоцитозе. Однако каким образом происходит высвобождение транспортируемого вещества в цитоплазму, не известно [40]. Ряд СРР задействуют данный механизм для проникновения в клетки: TAT-пептид, пролин-богатые пептиды [49], TP10 [50] и др.

Клатрин- и кавеолин-независимый эндоцитоз. Ещё одним путём энергозависимого входа СРР в клетки является клатрин- и кавеолин-независимый эндоцитоз. В реализацию этого механизма вовлечены липидные рафты — участки на поверхности мембраны клетки, богатые стеринами и сфинголипидами, размером 40–50 нм. Эти рафты могут содержать не только клатрин и кавеолин, но и другие макромолекулы (например, белки-рецепторы), которые распознают транспортируемые вещества во внешней среде и способствуют их поглощению. Было показано, что ряд СРР проникает в клетки при помощи этого механизма, например, азурин и его фрагменты p18 и p28 [51], транспортан, транспортан-10 [50] и LMWP в комплексе с молекулами мРНК [52]. Примечательно, что ранее для транспортана и транспортана-10 было показано проникновение в клетки посредством кавеолин-зависимого эндоцитоза. По всей видимости, пептиды могут задействовать одновременно несколько путей проникновения в клетку.

В целом механизм проникновения СРР зависит от физико-химических свойств пептида и транспортируемой молекулы, а также от концентрации и структурных особенностей плазматической мембраны. Например, при физиологических условиях и низкой концентрации пептиды проникают в клетки при помощи эндоцитоза, тогда как при высокой концентрации СРР непосредственно взаимодействуют с клеточной мембраной и задействуют энергонезависимые механизмы для попадания в клетки [40].

Выход СРР из эндосомы. После проникновении внутрь клетки при помощи эндоцитоза СРР (и транспортируемые ими терапевтические нуклеиновые кислоты) накапливаются в эндосомах, которые созревают и превращаются в лизосомы, что приводит к деградации содержимого эндосом гидролазами. Следовательно, своевременный выход СРР из эндосомы является необходимым условием эффективной доставки переносимой молекулы в клетку [39].

Разрушение мембраны эндосомы. Выход СРР из эндосом достигается при помощи разных молекулярных механизмов. Один из возможных механизмов — разрушение мембраны эндосомы, что обеспечивается СРР с альфа-спиральной структурой [44]. Позитивно заряженный СРР взаимодействует с негативно заряженными фосфолипидами мембраны, что приводит к образованию в ней пор и высвобождению содержимого в цитозоль [53].

Образование ионных пар. Другим возможным механизмом выхода из эндосом является

образование ионных пар между СРР и отрицательно заряженными липидами мембраны, после чего пептиды диффундируют через мембрану. Это характерно для аргинин-богатых пептидов.

Фузогенные липиды. Выход из эндосомы может быть индуцирован фузогенными липидами (например, DOPE). Такие липиды при низких значениях pH сливаются с мембраной эндосомы, что в итоге дестабилизирует её и приводит к высвобождению содержимого в цитозоль. Показано, что добавление DOPE к комплексу СРР–нуклеиновая кислота значительно увеличивало эффективность проникновения этого комплекса в цитозоль [33]. Эндосомальное ускользание также может быть достигнуто за счёт использования pH-чувствительных полимеров и pH-чувствительных липосом [54].

Модель «протонной губки» описывает выход из эндосом полиплексов, содержащих полиэтиленимин. Данный механизм подразумевает присутствие в эндосоме протон-связывающих молекул (рис. 4). Касаемо СРР, механизм «протонной губки», в частности, использует пептиды, содержащие гистидин. Имидазольная группа гистидина протонируется, а поскольку в эндосоме присутствует протонная помпа, то в эндосому «закачивается» дополнительное количество протонов. Вслед за протонами в эндосому проникают хлор-анионы. В результате осмотическое давление разрушает мембрану эндосомы, а её содержимое оказывается в цитозоли. Выход из эндосомы может быть активирован эндосомолитическими агентами, например хлорохином, который представляет собой слабое основание. Находясь в эндосоме, хлорохин связывает протоны, тем самым препятствует её закислению, а в высокой концентрации хлорохин вызывает набухание и разрушение. Ещё один способ задействовать эффект протонной губки для высвобождения СРР из эндосом — применение протон-связывающих полимеров, например полиэтиленимина. Такие полимеры могут быть присоединены к СРР ковалентно (или использоваться в виде комплекса), что незначительно снижает их способность к интернализации, но облегчает выход из эндосомы, обеспечивая в итоге более эффективную доставку [39].

Модель «зонтика» описывает выход из эндосомы крупных полимерных соединений (рис. 4). Согласно этой гипотезе, полимер-носитель образует комплексы с терапевтическими нуклеиновыми кислотами за счёт электростатических взаимодействий, в результате происходит их уплотнение (конденсация ком-

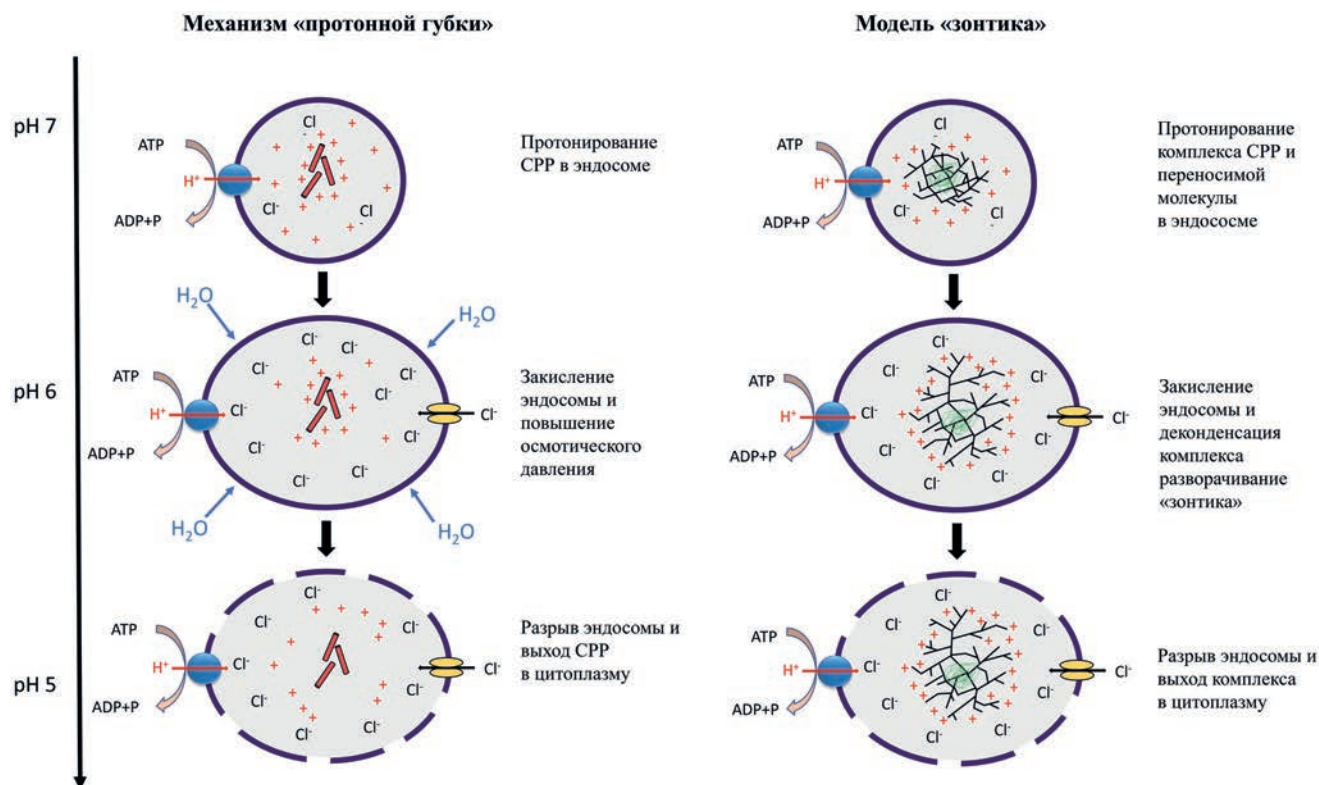


Рис. 4. Механизм выхода CPP из эндосомы

плекса). Находясь в эндосоме, при достижении низких значений pH ($\text{pH} = 5\text{--}6$) происходит протонирование аминокислот полимера-носителя, что приводит к его деконденсации и объёмному расширению за счёт электростатического отталкивания соседних одноимённо заряженных аминокислот. Все эти процессы приводят к увеличению объёма эндосомы и последующему разрыву её мембраны, что сопровождается попаданием содержимого в цитозоль. Данный механизм выхода из эндосомы присущ не только крупным полимерным носителям, но и CPP (например, разветвлённым пептидам).

Модель «протонной губки» (рис. 4, слева) подразумевает протонирование аминокислот в составе CPP. Дополнительное количество протонов попадает в эндосому при помощи протонной помпы. Вслед за протонами в эндосому проникают хлор-анионы, в результате чего осмотическое давление разрушает мембрану эндосомы, а её содержимое выходит в цитозоль. Модель «зонтика» (рис. 4, справа) описывает выход из эндосомы крупных полимерных или дендримерных соединений. CPP-носитель образует комплексы с переносимыми молекулами за счёт электростатических взаимодействий, в результате происходит конденсация комплекса. Находясь в эндосоме, при достижении низких значений pH происходит протони-

рование аминокислот носителя, что приводит к его деконденсации и объёмному расширению за счёт электростатического отталкивания соседних одноимённо заряженных аминокислот, увеличению объёма эндосомы и последующему разрыву её мембраны, что сопровождается попаданием содержимого в цитозоль.

Проникновение CPP в ядро. В некоторых случаях терапевтические нуклеиновые кислоты следует доставлять в ядро клетки, для чего требуется преодолеть 2 барьера — клеточную и ядерную мембраны. Некоторые CPP (ТАТ, полиаргинин и др.) способны проникать в ядро клеток [54]. Для увеличения тропности к ядру CPP модифицируют путём конъюгации с определёнными пептидными последовательностями (как правило, содержащими остатки лизина, аргинина и пролина), распознающимися ядерными транспортными белками (импортин- α и импортин- β) [55]. Такая модификация усиливает ядерную локализацию CPP.

Комплекс ядерных пор (КЯП) представляет собой цилиндрические структуры с внутренним диаметром около 30 нм и длиной 50 нм, обеспечивающие транспорт веществ в ядро. Молекулы малого размера (вода, сахара и ионы) проникают через КЯП пассивно. Однако крупные молекулы (мРНК, белки, пептиды и пр.) проходят через КЯП энергозависимым способом с помощью последова-

тельностью ядерной локализации (NLS) [54]. Они представляют собой короткие последовательности из 5–12 а.о., полученные из ядерных белков эукариот и вирусов. СРР могут быть конъюгированы с ними и таким образом нацеливаться на проникновение в ядро. Наиболее известными NLS-пептидами являются: большой Т-антиген SV40 и *Xenopus* из белка нуклеоплазмينا [54], а также 29-членный пептид белка рUL53 цитомегаловируса [56] и др. [57]. Таким образом, разнообразие структур и физико-химических свойств СРР, а также относительная простота их модификации позволяет использовать пептидные векторы для доставки терапевтических нуклеиновых кислот в ядро.

Факторы, влияющие на интернализацию СРР. Во многих экспериментах было показано, что применяемая концентрация СРР влияет на путь интернализации. Считается, что эндоцитоз обычно возникает при низкой концентрации пептида, а прямое проникновение возможно при более высокой концентрации [40]. Напротив, для пенетрации было показано, что прямое проникновение происходит при низких концентрациях. Другим фактором, влияющим на интернализацию, является заряд пептидов, особенно высокий положительный заряд, преимущественно обеспечивающийся наличием остатков аргинина. Амфипатичность — ещё один известный фактор, влияющий на поглощение. Первичные и вторичные амфипатические пептиды могут напрямую проникать через клеточную мембрану в низких концентрациях, в то время как неамфипатические СРР используют эндоцитоз. Температура, при которой проводится эксперимент, также может влиять на механизм интернализации. При низких температурах (4 °С) предпочтительна прямая транслокация, однако при повышении (37 °С) — задействуется эндоцитоз. Переносимые молекулы могут сильно влиять на путь поглощения. Размер присоединяемого соединения влияет на размер всего комплекса, что приводит к механизму поглощения, отличному от такового для свободного СРР. Чем меньше размер, тем больше вероятность, что комплекс интернализуется в клетку прямой транслокацией. Однако при больших размерах комплекса преобладает эндоцитоз [40]. К настоящему моменту накапливаются знания об эффективности доставки СРР на различных линиях клеток [58].

Резюмируя вышесказанное, механизмы интернализации СРР разнообразны и зависят как от химического состава пептида, так и от свойств клеточной мембраны. Молекулярный

механизм того, как структурные изменения в локальных участках мембраны могут вызывать транслокацию пептидов внутрь, ещё предстоит выяснить. Новые знания о взаимодействии пептида и клетки необходимы для разработки эффективных векторных систем доставки терапевтических молекул.

СТРАТЕГИИ ПРИМЕНЕНИЯ СРР

Выделяют две основные стратегии применения СРР для доставки терапевтических молекул (включая нуклеиновые кислоты) в клетки.

Первая — ковалентная стратегия подразумевает конъюгацию СРР с транспортируемым соединением, что происходит при образовании ковалентной химической связи между соединениями. Такая стратегия подходит для транспорта молекул с нейтральным зарядом, например, некоторых белков, пептидов, пептидных нуклеиновых кислот и др. Перспективным направлением в ковалентной стратегии является использование так называемой деградируемой ковалентной связи между СРР и транспортируемой молекулой. Такой конъюгат способен проникать в клетку, после чего распадаться внутри неё и высвобождать терапевтическую молекулу в цитоплазму. Примером служит деградируемый линкер с дисульфидной связью между пептидом ТАТ и нуклеиновыми кислотами [59]. В ряде случаев ковалентная стратегия не оправдана, так как в результате конъюгации СРР и терапевтической молекулы происходит химическая модификация последней, что приводит к уменьшению (или полной утрате) её биологической активности. Кроме того, ковалентная стратегия не подходит для доставки кольцевых плазмидных ДНК ввиду отсутствия у них свободных валентностей для конъюгации с СРР [60].

В соответствии со второй — не ковалентной стратегией — пептид-носитель образует комплекс с транспортируемой молекулой, например, за счёт электростатических или гидрофобных взаимодействий. Данная стратегия хорошо подходит для доставки терапевтических нуклеиновых кислот, т.к. СРР чаще всего обладают позитивным зарядом, а нуклеиновые кислоты — отрицательным.

Применение СРР для доставки нуклеиновых кислот в доклинических исследованиях. Опубликовано множество работ, в которых описаны СРР, доставляющие различные нуклеиновые кислоты в клетки млекопитающих. Подавляющее большинство таких работ описывает эксперименты *in vitro* [43, 61, 62].

Применение СРР для доставки нуклеиновых кислот сопряжено с рядом сложностей, главные из которых — относительно короткий период полувыведения СРР и отсутствие специфичности к тканям и органам. Тем не менее регулярно публикуются работы, в которых СРР применяют для доставки терапевтических нуклеиновых кислот лабораторным животным с индуцированной патологией (воспалением, опухолями или инфекцией). В данном разделе обобщён опыт применения СРР в экспериментах *in vivo* (табл. 2).

Укороченная версия амфипатического пептидного носителя MPG (MPG-8) была использована для доставки молекул миРНК против мРНК гена, кодирующего циклин В1. Этот регуляторный белок участвует в митозе и демонстрирует повышенную экспрессию при различных формах рака. Показано, что MPG-8 образует наноразмерные комплексы с молекулами миРНК. Внутривенное введение этих комплексов мышам с ксенотрансплантированными опухолями приводило к значительному уменьшению их размера [63].

В исследовании Michiue et al. [64] для доставки молекул миРНК авторы использовали производное пептида ТАТ (пептид ТАТ–DRBD), который представлял собой пептид ТАТ, слитый с РНК-связывающим доменом — DRBD. Такой гибридный пептид образовывал комплекс с миРНК за счёт домена DRBD и проникал внутрь клеток за счёт ТАТ-фрагмента, при этом транспортируя связанную с ним миРНК. Такой подход был апробирован в эксперименте *in vivo* на модели внутримозговой глиобластомы у мышей. Пептид ТАТ–DRBD доставлял в клетки опухоли молекулы миРНК против генов *Egfr* и *Akt2*, которые вовлечены в онкогенез. В свою очередь, инактивация этих генов молекулами миРНК приводила к апоптозу опухолевых клеток, что значительно увеличивало выживаемость модельных мышей [64].

Был создан конъюгат пептида-носителя ТАТ и пептидной нуклеиновой кислоты (ТАТ–PNA-DR), которая направлена против генома вируса гепатита В. Конъюгат ингибировал репликацию HBV в клетках HepG2.2.15, а также на модели HBV у мышей происходило снижение вирусной нагрузки на 80%. Примечательно, что ТАТ–PNA-DR показал низкую токсичность и иммуногенность, вместе с тем высокую стабильность в сыворотке [65].

Для доставки одноцепочечной ДНК — молекул фосфородиамидат-морфолинового олигомера (РМО, phosphorodiamidate morpholino oligomer), направленных против генома герпес-вируса человека типа 1 (HSV-1) — также исполь-

зован пептидный носитель. Применение комплекса РМО–пептид снижало репликацию вируса на 70–98% *in vitro*. Местное нанесение 10 мкг РМО–пептид на роговицу глаз мышей, инфицированных вирусом герпеса, снижало частоту заболевания на 37–50% [66].

Пептиды также применяются для доставки ДНК-вакцин. В частности, иммунизация мышей комплексом пептида MPG и плазмидных ДНК, несущих антигены вируса гепатита С, приводила к появлению специфических антител классов IgG1 и IgG2a [67].

В исследовании использовали пептид (R-X-R)4XB (X представляет собой 6-аминогексановую кислоту, а В — β-аланин). Его конъюгаты с молекулами РМО, направленными против гена, кодирующего дистрофин, были успешно применены в модели мышечной дистрофии Дюшенна у мышей и собак (мышечная дистрофия золотистых ретриверов) [68].

Так как роговица глаза является одной из наиболее часто трансплантируемых тканей, то доклинические испытания безопасности и эффективности препарата AVI-5126 проводили на модели трансплантации роговиц крыс. Исследуемый препарат представляет собой пептид (R-X-R)4, конъюгированный с РМО, подавляющими экспрессию фактора транскрипции с-Мус, ключевого фактора отторжения трансплантата. По результатам исследования выявлено, что отторжение трансплантата происходило значительно хуже после хранения донорской роговицы перед трансплантацией в AVI-5126 и последующего местного нанесения AVI-5126 после трансплантации [69].

Пептид T9(dR), являющийся производным транспортана, был использован для доставки миРНК, направленных против гена нуклеопротеина вируса гриппа. Данный комплекс снижал репликацию вируса как *in vitro*, так и в модели у мышей, предотвращая случаи летального исхода [70].

Пептид R007, богатый аргинином, был конъюгирован с РМО, направленной против генома вируса Коксаки В3. Для данного конъюгата показан противовирусный эффект в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* [71]. Другой богатый аргинином пептид, R9F2, конъюгированный с молекулами РМО, направленными против генома вируса Эбола, обеспечивал полную защиту мышей после введения летальной дозы вируса [72].

Нашим коллективом авторов выпущен ряд публикаций, посвящённых катионному дендримерному пептиду LTP, богатому остатками аргинина и лизина, за счёт чего он имеет высокий положительный заряд и способен

Таблица 2. Применение СРР для доставки нуклеиновых кислот в экспериментах *in vivo*

Пептид	Последовательность	Транспортируемая нуклеиновая кислота	Модель	Биологическая активность	Ссылка
MPG-8	AFLGWLGAWGTMGWSPKKKRK	миРНК	ксенотрансплантированные опухоли у мышей	после внутриопухолевого введения 1 мкг комплекса (по содержанию миРНК) происходило замедление роста опухоли в сравнении с отрицательным контролем на 75%; введение 5 мкг комплекса (по содержанию миРНК) предотвращало рост опухоли	[63]
TAT-DRBD	НД	миРНК	модели внутримозговой глиобластомы у мышей	подавление экспрессии гена <i>Egfr</i> привело к увеличению медианы выживаемости мышей с 14 до 19 дней; одновременное подавление экспрессии генов <i>Egfr</i> и <i>Akt2</i> значительно увеличивало медиану выживаемости мышей с 14 до 31,5 дней	[64]
TAT	GRKKRRQRRRPPGC-MPA-GCAGAGGTGAA	пептидная нуклеиновая кислота	модель острого гепатита В (HBV) у мышей	происходило снижение концентрации антигенов HBV в сыворотке мышей на 73% и 66%	[65]
(RXR)4XB	(RXR)4XB (где R обозначает аргинин, X обозначает 6-аминогексановую кислоту и В обозначает β-аланин)	РМО	модель HSV-1 у мышей	местное нанесение 10 мкг конъюгата РМО–пептид на роговицу глаз мышей, инфицированных вирусом герпеса, снижало частоту заболеваний на 37–50%	[66]
MPG	GALFLGLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	молекулы ДНК, кодирующие антигены HCV (вирус гепатита С)	мыши линии BALB/c	уровни антител IgG1 и IgG2a, специфичных к антигенам HCV, значительно возрастали через 3 недели после курса иммунизаций	[67]
(R-X-R)4XB	(R-X-R)4XB, в составе которого X представляет собой 6-аминогексановую кислоту, а В - β-аланин	РМО	модель мышечной дистрофии Дюшенна у собак и мышей	конъюгат (R-X-R)4XB–РМО корректировал мутантные транскрипты дистрофина в миобластах как мышей, так и собак с дистрофией Дюшенна; при концентрациях 300 нМ наблюдались высокие уровни скорректированного транскрипта	[68]
(R-X-R)4	(R-X-R)4, в составе которого X представляет собой 6-аминогексановую кислоту	РМО	модель трансплантации роговиц крыс ACI (August Copenhagen Irish)	хранение донорской роговицы перед трансплантацией в AVI-5126, а также последующее местное нанесение AVI-5126 после трансплантации улучшает приживаемость трансплантата до 40%	[69]

Таблица 2 (продолжение)

Пептид	Последовательность	Транспортируемая нуклеиновая кислота	Модель	Биологическая активность	Ссылка
T9(dR)	GWTLNSAGYLLGKINLKALAAALA KKILdRdRdRdRdRdRdRdRdR, где dR – D-arginine	миРНК	модель инфекции вирусом гриппа H1N1 у мышей	происходило восстановление массы тела мышей, а также их полное выздоровление на 14-й день после заражения	[70]
P007	CH ₃ CONH-(R-аминоксановая кислота- R)4-аминоксановая кислота-βAla	PMO	модель инфекции вирусом Коксаки у мышей линии A/J	введение комплекса P007–PMO в дозе 200 мкг на мышью уменьшало: потерю веса на 5%, количество инфекционных вирусных частиц в тканях миокарда – в 2 раза, повреждение тканей сердца – в 4 раза	[71]
R9F2	NH ₂ -RRRRRRRRRFFFC-CONH ₂	PMO	летальная модель инфекции вирусом Эбола на мышах линии C57Bl/6	доза 500 мкг на мышью комплекса R9F2–PMO, введенная однократно через 24 часа после введения летальной дозы вируса, полностью защищает от гибели	[72]
LTP	R ₈ K ₄ K ₂ KAC-NH ₂	миРНК	модель аллергического ринита у мышей; модель нейтрофильной бронхиальной астмы у мышей	модель AP: курс из 7 интраназальных аппликаций LTP–миРНК в дозе 10 мкг на мышью в сутки приводил к снижению: уровней специфических антител классов IgE и IgG1 на 50% и 25%, назальной гиперреактивности – в 2 раза, инфильтрации эозинофилов в слизистую оболочку носа – на 30%; введение нБА: 3-кратное ингаляционное введение комплекса миРНК–LTP приводило к подавлению экспрессии целевого гена в клетках БАЛ в 2 раза и к уменьшению инфильтрации лёгких нейтрофилами – в 3 раза	[74–76]
KK-46	R8K4W4T4P4E4V4K2H2KFC	плазмидная ДНК, миРНК	модель инфекции SARS-CoV-2 у сирийских хомячков	6-дневный курс siR-7-EM/KK-46 дозозависимо снижал титр вируса и воспаление в лёгких; на второй день количество вирусных копий в лёгочной ткани мышей, получавших комплекс в различных концентрациях, уменьшилось в 1,5–3 раза	[28]

Примечание. БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; НД – нет данных.

связывать отрицательно заряженные молекулы нуклеиновых кислот [73]. С помощью этого пептида была осуществлена доставка молекул миРНК против генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-4 и IL-13, в клетки респираторного тракта мышей с индуцированным аллергическим ринитом. Интраназальное введение комплекса миРНК–LTP приводило к снижению продукции целевых цитокинов клетками региональных лимфоузлов и к уменьшению основных проявлений патологии: уменьшению уровня IgE-антител, выраженности инфильтрации верхних дыхательных путей провоспалительными клетками и ремоделирования респираторного тракта [74]. В другой работе при помощи пептида LTP доставляли молекулы миРНК, направленные против гена *Stat3*, который вовлечён в нейтрофильное воспаление лёгких при бронхиальной астме. Показано, что 3-кратное ингаляционное введение этого комплекса миРНК–LTP приводило к подавлению экспрессии целевого гена в клетках бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) в 2 раза и к уменьшению инфильтрации лёгких нейтрофилами – в 3 раза [75].

Ещё один разветвлённый (дендримерный) пептид КК-46 был использован в качестве носителя молекул миРНК, направленных против геномной РНК вируса SARS-CoV-2. Нашим коллективом проведён скрининг библиотеки миРНК, специфичных к разным участкам генома SARS-CoV-2, на предмет их способности подавлять репродукцию вируса. Наиболее активный вариант миРНК, направленный против участка генома, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса, был модифицирован путём замены пяти РНК-нуклеотидов на LNA-нуклеотиды, что существенно (в 3,7 раза) повысило устойчивость миРНК к ферментам деградации без потери антивирусной активности. В исследованиях *in vitro* на культуре клеток комплекс миРНК–КК-46 обеспечивал подавление вирусной репликации до 10 000 раз. В модели инфекции SARS-CoV-2 сирийских хомячков ингаляционное введение препарата в дозах 0,7–5,6 мг на кг веса приводило к уменьшению вирусной нагрузки в лёгких до 200 раз. Более того, снижение репликации вируса в лёгких приводило к улучшению их состояния, что выражалось в уменьшении уровня перибронхальной инфильтрации провоспалительными клетками и уменьшении толщины стенок бронхов. В ходе доклинических исследований безопасности установлено, что препарат относится к классу малотоксичных соединений [28].

Применение СРР для доставки нуклеиновых кислот в клинических исследованиях. Ряд СРР достиг клинических исследований, что свидетельствует о перспективности их применения в медицинской практике. С их помощью осуществляется доставка терапевтических молекул различной природы (белки, пептиды, циклоспорин, ботулин и пр.). Некоторые СРР-содержащие препараты достигли клинических исследований (см. обзоры Guidotti et al. [62] и Stiltner et al. [77]). При этом в двух препаратах СРР использовали для доставки терапевтических нуклеиновых кислот [27].

После успешного прохождения доклинических испытаний на модели трансплантации роговиц крыс проведены клинические исследования безопасности и эффективности препарата AVI-5126. Препарат представляет собой пептид (R-Ahx-R)₄, конъюгированный с РМО, нацеленным на фактор транскрипции с-Мус человека. Блокада данного транскрипционного фактора помогает избежать отторжение трансплантированной вены после коронарного шунтирования сосудов сердца. В ходе испытания после иссечения вены её погружали в раствор, содержащий 10 мкМ AVI-5126, а затем имплантировали в качестве шунта [78]. Однако клиническое исследование было terminated, а его результаты не опубликованы.

На основе пептидных носителей был разработан и одобрен для медицинского применения первый в мире этиотропный препарат (МИР 19) для терапии COVID-19, который представляет собой комплекс LNA-модифицированных молекул миРНК и пептида-носителя – КК-46. Проведены клинические исследования фазы II, в ходе которых препарат вводили ингаляционно пациентам со средней тяжестью COVID-19 в условиях стационара [17]. Пациенты контрольной группы (52 пациента) получали стандартную терапию, согласно клиническим рекомендациям Министерства здравоохранения РФ. Отдельная группа пациентов со средней тяжестью COVID-19 (52 пациента) получала препарат МИР 19 ингаляционно в дозе 3,7 и 11,1 мг в сутки (эти пациенты были лишены любой другой этиотропной терапии). Клинические исследования показали, что препарат безопасен, хорошо переносится и значительно сокращает время до клинического улучшения состояния пациентов, по сравнению со стандартной терапией, что выражалось в облегчении лихорадки, нормализации частоты дыхания, уменьшении кашля и восстановлении сатурации кислорода >95% [17]. По результатам исследования, препарат показал свою клиническую эффек-

тивность и был зарегистрирован для медицинского применения (рег. № ЛП-007720).

Подводя итог, разработка безопасной и эффективной системы доставки нуклеиновых кислот на основе СРР, простота производства и низкая стоимость имеют большой потенциал и значительные перспективы с точки зрения их клинического применения. В ближайшее время ожидается появление на рынке одобренных препаратов терапевтических нуклеиновых кислот, доставляемых векторами на основе СРР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента открытия пептида ТАТ в 1988 году было разработано большое количество СРР. Эти пептиды широко используются для доставки различных видов терапевтических средств. К настоящему времени накоплен значительный опыт их применения как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*.

Главные преимущества СРР состоят в относительной простоте их получения и хранения, хорошо разработанных методах очистки и стандартизации. Кроме того, ввиду биосовместимости, СРР зачастую не обладают токсическими свойствами, а по причине небольшого размера, как правило, не вызывают нежелательных иммунных реакций. Основными препятствиями для широкого применения СРР в медицине являются низкая специфичность к типу клеток и короткий период полувыведения.

Несмотря на вышеуказанные сложности, существуют способы их преодоления. В первую очередь, это стабилизация структуры пептидов за счёт введения точечных аминокислотных замен или дополнительных химических связей. Также путём дендримеризации пептидов (синтез разветвлённых пептидов) можно добиться повышения их стабиль-

ности за счёт наличия неприродных ε-связей. Более высокая стабильность может быть достигнута за счёт использования неприродных аминокислот или энантиомеров D, которые менее чувствительны к ферментативной деградации, чем L-форма. Ведутся разработки в области улучшения специфичности СРР к целевому сайту, такие как связывание СРР со специфическими лигандами в форме ковалентных или нековалентных комплексов. Кроме того, направленности доставки можно достичь за счёт локального применения пептидов, например, ингаляционное применение СРР-содержащих препаратов для доставки в лёгкие.

В итоге проведено множество доклинических исследований, в которых при помощи СРР доставлялись различные терапевтические молекулы, включая нуклеиновые кислоты. Из них не менее девяти лекарственных препаратов достигли клинических исследований, при этом в двух из них при помощи СРР осуществляется доставка терапевтических нуклеиновых кислот. Один из таких препаратов одобрен для медицинского применения. Всё это свидетельствует о перспективности использования СРР для создания генно-терапевтического лекарственных средств.

Вклад авторов. М.Р. Хаитов — концепция и руководство работой; Е.Д. Тимотиевич — написание текста; И.П. Шиловский — написание текста, редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00182, <https://rscf.ru/project/22-25-00182/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaudhary, N., Weissman, D., and Whitehead, K. A. (2021) mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **20**, 817–838, doi: 10.1038/S41573-021-00283-5.
2. Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Thomson, S. B., Chen, S., Leavitt, B. R., Cullis, P. R., and van der Meel, R. (2021) The current landscape of nucleic acid therapeutics, *Nat. Nanotechnol.*, **16**, 630–643, doi: 10.1038/s41565-021-00898-0.
3. Talap, J., Zhao, J., Shen, M., Song, Z., Zhou, H., Kang, Y., Sun, L., Yu, L., Zeng, S., and Cai, S. (2021) Recent advances in therapeutic nucleic acids and their analytical methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **206**, 114368, doi: 10.1016/J.JPBA.2021.114368.
4. Wang, Y., Zhang, R., Tang, L., and Yang, L. (2022) Nonviral delivery systems of mRNA vaccines for cancer gene therapy, *Pharmaceutics*, **14**, 512, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14030512.

5. Shirley, J. L., de Jong, Y. P., Terhorst, C., and Herzog, R. W. (2020) Immune responses to viral gene therapy vectors, *Mol. Ther.*, **28**, 709-722, doi: 10.1016/J.YMTHE.2020.01.001.
6. Yan, Y., Liu, X. Y., Lu, A., Wang, X. Y., Jiang, L. X., and Wang, J. C. (2022) Non-viral vectors for RNA delivery, *J. Control. Rel.*, **342**, 241, doi: 10.1016/J.JCONREL.2022.01.008.
7. Zou, Z., Shen, Q., Pang, Y., Li, X., Chen, Y., Wang, X., Luo, X., Wu, Z., Bao, Z., Zhang, J., Liang, J., Kong, L., Yan, L., Xiong, L., Zhu, T., Yuan, S., Wang, M., Cai, K., Yao, Y., Wu, J., Jiang, Y., Liu, H., Liu, J., Zhou, Y., Dong, Q., Wang, W., Zhu, K., Li, L., Lou, Y., Wang, H., Li, Y., and Lin, H. (2019) The synthesized transporter K16APoE enabled the therapeutic HAYED peptide to cross the blood-brain barrier and remove excess iron and radicals in the brain, thus easing Alzheimer's disease, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **9**, 394-403, doi: 10.1007/s13346-018-0579-4.
8. Matijass, M., and Neundorff, I. (2021) Cell-penetrating peptides as part of therapeutics used in cancer research, *Med. Drug Discov.*, **10**, 100092, doi: 10.1016/j.medidd.2021.100092.
9. Derakhshankhah, H., and Jafari, S. (2018) Cell penetrating peptides: a concise review with emphasis on biomedical applications, *Biomed. Pharmacother.*, **108**, 1090-1096, doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.097.
10. Kang, Y. C., Son, M., Kang, S., Im, S., Piao, Y., Lim, K. S., Song, M. Y., Park, K. S., Kim, Y. H., and Pak, Y. K. (2018) Cell-penetrating artificial mitochondria-targeting peptide-conjugated metallothionein 1A alleviates mitochondrial damage in Parkinson's disease models, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 1-13, doi: 10.1038/s12276-018-0124-z.
11. Xie, J., Bi, Y., Zhang, H., Dong, S., Teng, L., Lee, R. J., and Yang, Z. (2020) Cell-penetrating peptides in diagnosis and treatment of human diseases: from preclinical research to clinical application, *Front. Pharmacol.*, **11**, 697, doi: 10.3389/fphar.2020.00697.
12. Lopuszynski, J., Agrawal, V., and Zahid, M. (2022) Tissue-specific cell penetrating peptides for targeted delivery of small interfering RNAs, *Med. Res. Arch.*, doi: 10.18103/mra.v10i8.2998.
13. Nhàn, N. T. T., Maidana, D. E., and Yamada, K. H. (2023) Ocular delivery of therapeutic agents by cell-penetrating peptides, *Cells*, **12**, 1071, doi: 10.3390/cells12071071.
14. Zorko, M., Jones, S., and Langel, Ü. (2022) Cell-penetrating peptides in protein mimicry and cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **180**, 114044, doi: 10.1016/J.ADDR.2021.114044.
15. Jiang, J. (2021) Cell-penetrating peptide-mediated nanovaccine delivery, *Curr. Drug Targets*, **22**, 896-912, doi: 10.2174/1389450122666210203193225.
16. Delcroix, M., and Riley, L. W. (2010) Cell-penetrating peptides for antiviral drug development, *Pharmaceuticals*, **3**, 448-470, doi: 10.3390/ph3030448.
17. Khaitov, M., Nikonova, A., Kofiadi, I., Shilovskiy, I., Smirnov, V., Elisytina, O., Maerle, A., Shatilov, A., Shatilova, A., Andreev, S., Sergeev, I., Trofimov, D., Latysheva, T., Ilyna, N., Martynov, A., Rabdano, S., Ruzanova, E., Savelev, N., Pletiukhina, I., Safi, A., Ratnikov, V., Gorelov, V., Kaschenko, V., Kucherenko, N., Umarova, I., Moskaleva, S., Fabrichnikov, S., Zuev, O., Pavlov, N., Kruchko, D., Berzin, I., Goryachev, D., Merkulov, V., Shipulin, G., Udin, S., Trukhin, V., Valenta, R., and Skvortsova, V. (2023) Treatment of COVID-19 patients with a SARS-CoV-2-specific siRNA-peptide dendrimer formulation, *Allergy*, **78**, 1639-1653, doi: 10.1111/ALL.15663.
18. Sridharan, K., and Gogtay, N. J. (2016) Therapeutic nucleic acids: current clinical status, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **82**, 659-672, doi: 10.1111/BCP.12987.
19. Davies-Sala, C., Soler-Bistué, A., Bonomo, R. A., Zorreguieta, A., and Tolmasky, M. E. (2015) External guide sequence technology: a path to development of novel antimicrobial therapeutics, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1354**, 98-110, doi: 10.1111/NYAS.12755.
20. Gadgil, H., and Jarrett, H. W. (2002) Oligonucleotide trapping method for purification of transcription factors, *J. Chromatogr. A*, **966**, 99-110, doi: 10.1016/S0021-9673(02)00738-0.
21. Vickers, T. A., Sabripour, M., and Crooke, S. T. (2011) U1 adaptors result in reduction of multiple pre-mRNA species principally by sequestering U1snRNP, *Nucleic Acids Res.*, **39**, e71, doi: 10.1093/NAR/GKR150.
22. Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., and Mukherjee, S. K. (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**, 657, doi: 10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003.
23. Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., and Hannon, G. J. (2001) Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi, *Science*, **293**, 1146-1150, doi: 10.1126/science.1064023.
24. Gangopadhyay, S., and Gore, K. R. (2022) Advances in siRNA therapeutics and synergistic effect on siRNA activity using emerging dual ribose modifications, *RNA Biol.*, **19**, 452-467, doi: 10.1080/15476286.2022.2052641.
25. Wan-Hin Hui, R., Mak, L. Y., Seto, W. K., and Yuen, M. F. (2022) RNA interference as a novel treatment strategy for chronic hepatitis B infection, *Clin. Mol. Hepatol.*, **28**, 408, doi: 10.3350/CMH.2022.0012.
26. Ray, K. K., Wright, R. S., Kallend, D., Koenig, W., Leiter, L. A., Raal, F. J., Bisch, J. A., Richardson, T., Jaros, M., Wijngaard, P. L. J., and Kastelein, J. J. P. (2020) Two phase 3 trials of inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol, *New Eng. J. Med.*, **382**, 1507-1519, doi: 10.1056/nejmoa1912387.
27. Zhang, M. M., Bahal, R., Rasmussen, T. P., Manautou, J. E., and Zhong, X.-Bo (2021) The growth of siRNA-based therapeutics: updated clinical studies,

- Biochem. Pharmacol.*, **189**, 114432, doi: 10.1016/J.BCP.2021.114432.
28. Khaitov, M., Nikonova, A., Shilovskiy, I., Kozhikhova, K., Kofiadi, I., Vishnyakova, L., Nikolskii, A., Gattinger, P., Kovchina, V., Barvinskaya, E., Yumashev, K., Smirnov, V., Maerle, A., Kozlov, I., Shatilov, A., Timofeeva, A., Andreev, S., Koloskova, O., Kuznetsova, N., Vasina, D., Nikiforova, M., Rybalkin, S., Sergeev, I., Trofimov, D., Martynov, A., Berzin, I., Gushchin, V., Kovalchuk, A., Borisevich, S., Valenta, R., Khaitov, R., and Skvortsova, V. (2021) Silencing of SARS-CoV-2 with modified siRNA-peptide dendrimer formulation, *Allergy*, **76**, 2840-2854, doi: 10.1111/all.14850.
29. Pardi, N., Hogan, M. J., and Weissman, D. (2020) Recent advances in mRNA vaccine technology, *Curr. Opin. Immunol.*, **65**, 14-20, doi: 10.1016/J.COI.2020.01.008.
30. Ledford, H. (2020) Moderna COVID vaccine becomes second to get US authorization, *Nature*, doi: 10.1038/D41586-020-03593-7.
31. Blind, J. E., McLeod, E. N., Brown, A., Patel, H., and Ghosh, S. (2020) Biosafety practices for *in vivo* viral-mediated gene therapy in the health care setting, *Appl. Biosaf.*, **25**, 194, doi: 10.1177/1535676020942195.
32. Roberts, T. C., Langer, R., and Wood, M. J. A. (2020) Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 673, doi: 10.1038/S41573-020-0075-7.
33. Chen, H., Ren, X., Xu, S., Zhang, D., and Han, T. (2022) Optimization of lipid nanoformulations for effective mRNA delivery, *Int. J. Nanomed.*, **17**, 2893-2905, doi: 10.2147/IJN.S363990.
34. Paunovska, K., Loughrey, D., and Dahlman, J. E. (2022) Drug delivery systems for RNA therapeutics, *Nat. Rev. Genet.*, **23**, 265, doi: 10.1038/S41576-021-00439-4.
35. Khan, M. M., Filipczak, N., and Torchilin, V. P. (2021) Cell penetrating peptides: A versatile vector for co-delivery of drug and genes in cancer, *J. Controll. Rel.*, **330**, 1220-1228, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.11.028.
36. Taylor, R. E., and Zahid, M. (2020) Cell penetrating peptides, novel vectors for gene therapy, *Pharmaceutics*, **12**, 225, doi: 10.3390/pharmaceutics12030225.
37. Falato, L., Gustin, M., and Langel, Ü. (2021) Cell-penetrating peptides delivering siRNAs: An overview, *Methods Mol. Biol.*, **2282**, 329-352, doi: 10.1007/978-1-0716-1298-9_18.
38. Rádis-Baptista, G. (2021) Cell-penetrating peptides derived from animal venoms and toxins, *Toxins (Basel)*, **13**, 147, doi: 10.3390/toxins13020147.
39. Zorko, M., and Langel, Ü. (2022) Cell-penetrating peptides, *Methods Mol. Biol.*, **2383**, 3-32, doi: 10.1007/978-1-0716-1752-6_1.
40. Ruseska, I., and Zimmer, A. (2020) Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides, *Beilstein J. Nanotechnol.*, **11**, 101-123, doi: 10.3762/bjnano.11.10.
41. Holm, T., Andaloussi, S. El, and Langel, Ü. (2011) Comparison of CPP uptake methods, *Methods Mol. Biol.*, **683**, 207-217, doi: 10.1007/978-1-60761-919-2_15.
42. Li, Z., Zhang, Y., Zhu, D., Li, S., Yu, X., Zhao, Y., Ouyang, X., Xie, Z., and Li, L. (2017) Transporting carriers for intracellular targeting delivery via non-endocytic uptake pathways, *Drug Deliv.*, **24**, 45-55, doi: 10.1080/10717544.2017.1391889.
43. Sadeghian, I., Heidari, R., Sadeghian, S., Raei, M. J., and Negahdaripour, M. (2022) Potential of cell-penetrating peptides (CPPs) in delivery of antiviral therapeutics and vaccines, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **169**, 106094, doi: 10.1016/J.EJPS.2021.106094.
44. Trabulo, S., Cardoso, A. L., Mano, M., and de Lima, M. C. P. (2010) Cell-penetrating peptides – mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems, *Pharmaceutics*, **3**, 961-993, doi: 10.3390/PH3040961.
45. Nath, A. (2021) Prediction for understanding the effectiveness of antiviral peptides, *Comput. Biol. Chem.*, **95**, 107588, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2021.107588.
46. Kaksonen, M., and Roux, A. (2018) Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 313-326, doi: 10.1038/NRM.2017.132.
47. Kawaguchi, Y., Takeuchi, T., Kuwata, K., Chiba, J., Hatanaka, Y., Nakase, I., and Futaki, S. (2016) Syndecan-4 is a receptor for clathrin-mediated endocytosis of arginine-rich cell-penetrating peptides, *Bioconjug. Chem.*, **27**, 1119-1130, doi: 10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.6B00082.
48. Futaki, S., and Nakase, I. (2017) Cell-surface interactions on arginine-rich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization, *Acc. Chem. Res.*, **50**, 2449-2456, doi: 10.1021/ACS.ACCOUNTS.7B00221.
49. Pujals, S., and Giralt, E. (2008) Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 473-484, doi: 10.1016/J.ADDR.2007.09.012.
50. Säälik, P., Padari, K., Niinep, A., Lorents, A., Hansen, M., Jokitalo, E., Langel, Ü., and Pooga, M. (2009) Protein delivery with transportans is mediated by caveolae rather than flotillin-dependent pathways, *Bioconjug. Chem.*, **20**, 877-887, doi: 10.1021/BC800416F.
51. Taylor, B. N., Mehta, R. R., Yamada, T., Lekmine, F., Christov, K., Chakrabarty, A. M., Green, A., Bratescu, L., Shilkaitis, A., Beattie, C. W., and das Gupta, T. K. (2009) Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells, *Cancer Res.*, **69**, 537-546, doi: 10.1158/0008-5472.can-08-2932.
52. Ye, J., Pei, X., Cui, H., Yu, Z., Lee, H., Wang, J., Wang, X., Sun, L., He, H., and Yang, V. C. (2018) Cellular uptake mechanism and comparative in vitro cytotoxicity studies of monomeric LMWP-siRNA conjugate, *J. Industr. Engineer. Chem.*, **63**, 103-111, doi: 10.1016/J.JIEC.2018.02.005.

53. Yang, S. T., Zaitseva, E., Chernomordik, L. V., and Melikov, K. (2010) Cell-penetrating peptide induces leaky fusion of liposomes containing late endosome-specific anionic lipid, *Biophys. J.*, **99**, 2525-2533, doi: 10.1016/J.BPJ.2010.08.029.
54. Cerrato, C. P., and Langel, Ü. (2022) An update on cell-penetrating peptides with intracellular organelle targeting, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **19**, 133-146, doi: 10.1080/17425247.2022.2034784.
55. Wang, H. Y., Chen, J. X., Sun, Y. X., Deng, J. Z., Li, C., Zhang, X. Z., and Zhuo, R. X. (2011) Construction of cell penetrating peptide vectors with N-terminal stearylated nuclear localization signal for targeted delivery of DNA into the cell nuclei, *J. Control Rel.*, **155**, 26-33, doi: 10.1016/J.JCONREL.2010.12.009.
56. Alkhashrom, S., Kicuntod, J., Stillger, K., Lützenburg, T., Anzenhofer, C., Neundorff, I., Marschall, M., and Eichler, J. (2022) A peptide inhibitor of the human cytomegalovirus core nuclear egress complex, *Pharmaceuticals*, **15**, 1040, doi: 10.3390/PH15091040.
57. Huang, S., Zhu, Z., Jia, B., Zhang, W., and Song, J. (2021) Design of acid-activated cell-penetrating peptides with nuclear localization capacity for anticancer drug delivery, *J. Pept. Sci.*, **27**, e3354, doi: 10.1002/PSC.3354.
58. Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., and Boissguerin, P. (2008) Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines, *Bioconjug. Chem.*, **19**, 2363-2374, doi: 10.1021/BC800194E.
59. Chiu, Y. L., Ali, A., Chu, C. Y., Cao, H., and Rana, T. M. (2004) Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells, *Chem. Biol.*, **11**, 1165-1175, doi: 10.1016/j.chembiol.2004.06.006.
60. Tai, W., and Gao, X. (2017) Functional peptides for siRNA delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **110-111**, 157-168, doi: 10.1016/J.ADDR.2016.08.004.
61. Wang, F., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, W., Guo, S., and Jin, F. (2014) Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery, *J. Control Rel.*, **174**, 126-136, doi: 10.1016/J.JCONREL.2013.11.020.
62. Guidotti, G., Brambilla, L., and Rossi, D. (2017) Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics, *Trends Pharmacol. Sci.*, **38**, 406-424, doi: 10.1016/J.TIPS.2017.01.003.
63. Crombez, L., Morris, M. C., Dufort, S., Aldrian-Herrada, G., Nguyen, Q., Mc Master, G., Coll, J. L., Heitz, F., and Divita, G. (2009) Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4559-4569, doi: 10.1093/NAR/GKP451.
64. Michiue, H., Eguchi, A., Scadeng, M., and Dowdy, S. F. (2009) Induction of *in vivo* synthetic lethal RNAi responses to treat glioblastoma, *Cancer Biol. Ther.*, **8**, 2304-2311, doi: 10.4161/CBT.8.23.10271.
65. Zeng, Z., Han, S., Hong, W., Lang, Y., Li, F., Liu, Y., Li, Z., Wu, Y., Li, W., Zhang, X., and Cao, Z. (2016) A Tat-conjugated peptide nucleic acid Tat-PNA-DR inhibits hepatitis B virus replication *in vitro* and *in vivo* by targeting LTR direct repeats of HBV RNA, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **5**, e295, doi: 10.1038/MTNA.2016.11.
66. Moerdyk-Schauwecker, M., Stein, D. A., Eide, K., Blouch, R. E., Bildfell, R., Iversen, P., and Jin, L. (2009) Inhibition of HSV-1 ocular infection with morpholino oligomers targeting ICP0 and ICP27, *Antiviral Res.*, **84**, 131-141, doi: 10.1016/J.antiviral.2009.07.020.
67. Mehrlatifan, S., Mirnurollahi, S. M., Motevalli, F., Rahimi, P., Soleymani, S., and Bolhassani, A. (2016) The structural HCV genes delivered by MPG cell penetrating peptide are directed to enhance immune responses in mice model, *Drug Deliv.*, **23**, 2852-2859, doi: 10.3109/10717544.2015.1108375.
68. Moulton, H. M., Fletcher, S., Neuman, B. W., McClorey, G., Stein, D. A., Abes, S., Wilton, S. D., Buchmeier, M. J., Lebleu, B., and Iversen, P. L. (2007) Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication *in vivo*, *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 826-828, doi: 10.1042/BST0350826.
69. Hosseini, A., Lattanzio, F. A., Samudre, S. S., Disandro, G., Sheppard, J. D., and Williams, P. B. (2012) Efficacy of a phosphorodiamidate morpholino oligomer antisense compound in the inhibition of corneal transplant rejection in a rat cornea transplant model, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **28**, 194-201, doi: 10.1089/JOP.2011.0135.
70. Zhang, C., Ren, W., Liu, Q., Tan, Z., Li, J., and Tong, C. (2019) Transportan-derived cell-penetrating peptide delivers siRNA to inhibit replication of influenza virus *in vivo*, *Drug Des. Devel. Ther.*, **13**, 1059-1068, doi: 10.2147/DDDT.S195481.
71. Yuan, J., Stein, D. A., Lim, T., Qiu, D., Coughlin, S., Liu, Z., Wang, Y., Blouch, R., Moulton, H. M., Iversen, P. L., and Yang, D. (2006) Inhibition of Coxsackievirus B3 in cell cultures and in mice by peptide-conjugated morpholino oligomers targeting the internal ribosome entry site, *J. Virol.*, **80**, 11510, doi: 10.1128/JVI.00900-06.
72. Enterlein, S., Warfield, K. L., Swenson, D. L., Stein, D. A., Smith, J. L., Gamble, C. S., Kroeker, A. D., Iversen, P. L., Bavari, S., and Mühlberger, E. (2006) VP35 knockdown inhibits Ebola virus amplification and protects against lethal infection in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 984, doi: 10.1128/AAC.50.3.984-993.2006.
73. Kozhikhova, K. V., Shilovskiy, I. P., Shatilov, A. A., Timofeeva, A. V., Turetskiy, E. A., Vishniakova, L. I., Nikolskii, A. A., Barvinskaya, E. D., Karthikeyan, S., Smirnov, V. V., Kudlay, D. A., Andreev, S. M., and Khaitov, M. R. (2020) Linear and dendrimeric antiviral

- peptides: design, chemical synthesis and activity against human respiratory syncytial virus, *J. Mater. Chem. B*, **8**, 2607-2617, doi: 10.1039/c9tb02485a.
74. Shilovskiy, I., Nikonova, A., Barvinskaia, E., Kaganova, M., Nikolskii, A., Vishnyakova, L., Kovchina, V., Yumashev, K., Korneev, A., Petukhova, O., Kudlay, D., Smirnov, V., Andreev, S., Kozhikhova, K., Shatilov, A., Shatilova, A., Maerle, A., Sergeev, I., Trofimov, D., and Khaitov, M. (2022) Anti-inflammatory effect of siRNAs targeted *il-4* and *il-13* in a mouse model of allergic rhinitis, *Allergy*, **77**, 2829-2832, doi: 10.1111/ALL.15366.
 75. Nikolskii, A. A., Shilovskiy, I. P., Yumashev, K. V., Vishniakova, L. I., Barvinskaia, E. D., Kovchina, V. I., Korneev, A. V., Turenko, V. N., Kaganova, M. M., Brylina, V. E., Nikonova, A. A., Kozlov, I. B., Kofiadi, I. A., Sergeev, I. V., Maerle, A. V., Petukhova, O. A., Kudlay, D. A., and Khaitov, M. R. (2021) Effect of local suppression of Stat3 gene expression in a mouse model of pulmonary neutrophilic inflammation, *Immunologiya*, **42**, 600-614, doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-6-600-614.
 76. Shilovskiy, I., Sundukova, M., Korneev, A., Nikolskii, A., Barvinskaya, E., Kovchina, V., Vishniakova, L., Turenko, V., Yumashev, K., Kaganova, M., Brilina, V., Sergeev, I., Maerle, A., Kudlay, D., Petukhova, O., Khaitov, M. (2022) The mixture of siRNAs targeted to IL-4 and IL-13 genes effectively reduces the airway hyperreactivity and allergic inflammation in a mouse model of asthma, *Int. Immunopharmacol.*, **103**, 108432, doi: 10.1016/J.INTIMP.2021.108432.
 77. Stiltner, J., McCandless, K., and Zahid, M. (2021) Cell-penetrating peptides: applications in tumor diagnosis and therapeutics, *Pharmaceutics*, **13**, 890, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13060890.
 78. Abes, R., Arzumanov, A. A., Moulton, H. M., Abes, S., Ivanova, G. D., Iversen, P. L., Gait, M. J., and Lebleu, B. (2007) Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview, *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 775-779, doi: 10.1042/BST0350775.

PEPTIDE CARRIERS AS DELIVERY VEHICLES FOR THERAPEUTIC NUCLEIC ACIDS. MECHANISMS AND POTENTIAL APPLICATIONS IN MEDICINE

Review

E. D. Timotievich*, I. P. Shilovskiy, and M. R. Khaitov

*Institute of Immunology, National Research Center, Federal Medical-Biological Agency of Russia
115522 Moscow, Russia; e-mail: ed0594@yandex.ru*

Currently, a significant number of drugs based on therapeutic nucleic acids are being under development for the treatment of oncological, inflammatory, infectious diseases, and metabolic disorders. A growing number of approved nucleic acid therapeutics demonstrate the potential of gene therapy approaches. Therapeutic nucleic acids realize their biological effect in the cytoplasm, while plasma membrane is the main barrier to their intracellular delivery. Therefore, specially designed carriers are often used during the development of such drugs. The optimal carrier should not only facilitate the internalization of nucleic acids, but also exhibit no toxic effects, provide stabilization, and must be suitable for large scale production at low cost. Cell penetrating peptides (CPPs) match all these requirements. CPPs are effective and low-toxic carriers of nucleic acids. They usually represent basic peptides with a positive charge at physiological pH that capable to form nanostructures with negatively charged nucleic acids. Numerous preclinical studies in which CPP has been used as a carrier have shown promising results. In some cases, CPP-containing drugs successfully passed through clinical trials and the implemented into clinical practice. In this review, we consider the variety of therapeutic nucleic acids and summarize the experience of using CPP for their intracellular delivery. In addition, the classification and mechanisms of CPP cellular uptake are discussed, the understanding of which will accelerate the development of new gene therapy drugs.

Keywords: cell penetrating peptides, peptide delivery systems, nucleic acid delivery vehicles, siRNA

ИММУННЫЕ ПРИВИЛЕГИИ КАК РЕЗУЛЬТАТ ВЗАИМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОЙ И СТЕЛОВОЙ СИСТЕМ

Обзор

© 2023 Д.В. Карпенко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России,
лаборатория эпигенетической регуляции кроветворения,
125167 Москва, Россия; электронная почта: d_@list.ru

Поступила в редакцию 19.06.2023

После доработки 09.10.2023

Принята к публикации 10.10.2023

Иммунные привилегии раковых стволовых клеток — хорошо известная и широко изучаемая проблема, поскольку наличие таких клеток в опухолях ассоциируется с рефрактерностью, рецидивированием и метастазированием. Накапливающиеся данные также свидетельствуют о наличии иммунных привилегий у непатологических стволовых клеток в дополнение к другим механизмам их защиты от повреждающих факторов. Такое сходство между патологическими и нормальными стволовыми клетками ставит вопрос о том, почему стволовые клетки обладают таким потенциально опасным свойством. Регуляции жизненно важных процессов контроля аутоиммунитета и регенерации при взаимодействии между иммунными клетками, стволовыми клетками и их микроокружением рассматриваются в обзоре как определяющие для формирования иммунных привилегий стволовых клеток. Отмечается глубокая взаимная интеграция в регуляции стволовых и иммунных клеток. Исходя из многообразия и сложности взаиморегуляции стволовых клеток, их микроокружения и иммунной системы, я предлагаю использовать термин «стволовая система».

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аутоиммунитет, регенерация, стволовая клетка, раковая стволовая клетка, стволовая система, иммунные привилегии, нестин.

DOI: 10.31857/S0320972523110131, **EDN:** MMKBQY

ВВЕДЕНИЕ

Развитие хирургии и, в частности, техник по трансплантации привело к необходимости обучаться на моделях животных. Это привело естественным образом к обнаружению реакций отторжения аллогенных трансплантатов и обнаружению иммунных привилегий. Так, первые упоминания по иммунопривилегированности относятся к концу XIX века [1, 2], когда офтальмолог заметил, что трансплантат кожи мыши, посаженный в переднюю камеру глаза собаки, демонстрировал более длительное выживание. В своей работе Shirai [3] показал приживление раковых клеток, посаженных от стороннего донора в головной мозг, в противовес отторжению при подсадке в

другие ткани. Другая работа [4] показала, что подсадка фрагмента аутологичной селезенки в головной мозг вместе с опухолевыми клетками приводит к гибели последних. Также было показано, что предварительная иммунизация реципиента приводит к отторжению трансплантата кожи в мозг мыши [5]. Трансплантации до сих пор являются важным звеном, позволяющим *in vivo* изучение деталей иммунных привилегий во взаимодействии сложных систем организма, дополняющим методы современной молекулярной биологии и биоинформатики.

Изначально основной гипотезой, объясняющей формирование иммунных привилегий в органах, являлось существование области, изолированной от клеток иммунной системы.

Принятые сокращения: CSC — раковые стволовые клетки; GFP — зеленый флуоресцентный белок; HSC — стволовые кроветворные клетки; MC — мезенхимные клетки; MHC — главный комплекс гистосовместимости; MSC — мезенхимные стволовые клетки; MUSE — мультилинейно-дифференцирующиеся стрессоустойчивые клетки; T-reg — регуляторные Т-лимфоциты.

Однако показанная миграция периферических иммунных клеток через целостный гемато-энцефалический барьер и активная регуляция макрофагов и лимфоцитов нейронами и глией [6] заставила пересмотреть взгляд на иммунопривилегированность как на свойство изолированной от иммунной системы области органа. Более того, территория мозга может быть выделена как особая иммунная территория [7]. Также широко известно, что нарушение целостности одного глаза может привести к возникновению иммунной реакции и атаке на контралатеральный глаз [8]. Помимо барьерных механизмов, особое внимание уделяется микроокружению внутри глаза, а также участию иммунных клеток и, в частности, регуляторных Т-лимфоцитов (T-reg) в качестве ключевых факторов формирования иммунопривилегированной территории глаза [9, 10]. Согласно современным данным, в формировании иммунных привилегий глаза участвуют субпопуляции CD8 и CD4 T-reg как в передней камере самого глаза, так и в селезёнке [10]. Для плаценты и плода одна из теорий их иммунопривилегированности также ассоциируется со слоем регуляторных Т-клеток, экспрессирующих факторы HO-1, LIF, TGF- β и IL-10 [11]. Имуногенность аутологичной спермы, показанная на свинье [12], также означает, что семенники являются иммунопривилегированными. К механизмам иммунной привилегированности семенников относят как клеточные барьеры, выстроенные клетками Сертоли [13], так и механизмы цитокиновых регуляций, супрессирующих иммунную реакцию [14, 15]. Меланоциты способны мигрировать в волосяные фолликулы, где они не подвергаются уничтожению иммунной системой при гетеротипической трансплантации [16]. Это позволяет отнести волосяные фолликулы к иммунопривилегированным областям организма [16, 17]. Механизмы иммунной привилегированности обнаруживают также в суставных хрящах [18–20].

Отдельный интерес представляют случаи использования механизмов иммунной привилегии опухолями [21–24]. Иммуносупрессивное микроокружение рака может значительно варьироваться, используя широкий спектр регуляции, включающий экспрессию сигнальных цитокинов, метаболическое изменение микроокружения, иммунные контрольные точки на раковых клетках и вовлечение иммунных клеток, поляризованных в противовоспалительные [23, 25–28]. При этом изученность механизмов и количество литературных данных по ним сильно варьируется, полный обзор механизмов, для которых продемонстрирова-

но участие в формировании иммунных привилегий при онкологических заболеваниях, требует отдельного рассмотрения.

Накопленные экспериментальные данные позволяют выделить широкий спектр как механизмов иммунных привилегий, так и областей организма с иммунными привилегиями, не ограничивающихся барьерными органами. Сила иммунных привилегий при этом является не абсолютным понятием и может в значительной степени варьироваться и находится в зависимости от многих факторов [29, 30]. В зависимости от силы иммунных привилегий могут выделяться промежуточные термины. Например, способность иммунного ускользания (*immune evasive*) отражает способность временно избегать иммунного ответа, что выражается в относительно более длительной выживаемости аллогенного трансплантата, но неспособности избежать воздействия иммунитета полностью [31].

ИММУННЫЕ ПРИВИЛЕГИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Более ранние исследования демонстрируют ускользание стволовых клеток от цитотоксического действия иммунных клеток для кроветворных стволовых клеток [32], эмбриональных стволовых клеток [33], а далее — для мезенхимных [34] и нейральных стволовых клеток [35]. Работы показывают, что снижение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) снимает надзор от цитотоксических (CD8⁺) Т-лимфоцитов, а также, что естественные киллеры (NK) не атакуют стволовые клетки независимо от экспрессии МНС.

Недавняя работа Agudo et al. [36] демонстрирует иммунную привилегированность как собственное свойство рассмотренных в работе стволовых клеток. В работе были использованы трансгенные мыши, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP) в LGR5⁺ стволовых клетках, и CD8⁺ Т-клетки с Т-клеточным рецептором, аффинным к пептидам GFP, в составе комплекса МНС I, т.е. уничтожающие GFP-продуцирующие клетки *in vivo*. Авторы проделали тщательную работу и показали, что можно выделить субпопуляции стволовых клеток, не подверженных иммунному надзору в волосяных фолликулах и мышцах, но не в кишечнике, яичниках или молочной железе. Состояние покоя было выделено как определяющее свойство субпопуляций стволовых клеток, ускользающих от иммунного надзора. В покоящихся стволо-

вых клетках снижена экспрессия МНС I и β_2 -микроглобулина (B2m). Также было показано значительное снижение экспрессии рецепторов и транскрипционных факторов Irf3, Irf5, Stat1 и Stat3, отвечающих на воспаление. Авторы показали, что данная субпопуляция стволовых клеток не активирует эффекторные Т-клетки и не подвергается воздействию иммунной системы, однако при стимулах, активирующих пролиферацию покоящихся стволовых клеток, эти свойства утрачиваются. Отсутствие или значительное снижение МНС I на поверхности клеток должно приводить к активации NK и уничтожению ими таких клеток, чего не наблюдалось в описываемой работе. Это подразумевает существование и иных механизмов защиты покоящихся стволовых клеток от иммунитета.

Исходя из приведённых результатов [36], особый интерес представляют длительно-репопулирующие стволовые кроветворные клетки (HSC), которые редко делятся и в основном пребывают в покоящемся состоянии [37]. Иммуногенность общей массы клеток аллогенного костного мозга не вызывает сомнений [31, 38], однако это не исключает возможности присутствия минорных клеточных популяций, обладающих иммунопривилегированностью. Так, в работе на мышах показано, что нишевые CD150^{high} T-reg участвуют в формировании иммунных привилегий аллогенных HSC [39]. Одновременно с этим авторы показывают участие нишевых T-reg в защите HSC от оксидативного стресса и удержании их в состоянии покоя посредством аденозина, генерируемого рецепторами CD39 на поверхности T-reg. Однако авторы не связывают состояние покоя стволовых клеток и иммунную привилегированность как причину и следствие.

Значительный интерес вызывает также субпопуляция мезенхимных стволовых клеток (MSC), которые служат источником стромы как в костном мозге, так и органах, и тканях по всему организму, из-за их иммуносупрессивной активности и склонности находиться в покоящемся состоянии *in vivo* [40, 41]. Научная позиция относительно иммунных привилегий мезенхимных клеток (MC) неоднозначна. Несмотря на предпосылки и демонстрацию значительного иммуномодулирующего потенциала [34], MC и MSC классифицировались как клетки, не имеющие иммунных привилегий [31, 42–45]. Вместе с тем работы, демонстрирующие иммунные привилегии покоящихся стволовых клеток [36, 39], в том числе и раковых [46, 47], приводят к обратному заключению и ассоциации мезенхимного фено-

типа клетки с иммунными привилегиями [48]. В нашей недавней работе мы показали иммунные привилегии MSC [49]. Мы использовали модель очагов эктопического кроветворения, взяв в качестве донора костного мозга трансгенных мышей Nestin–GFP, экспрессирующих GFP в стволовых клетках под промоторной активностью нестина, и сажая трансплантат под капсулу почки изогенных мышей дикого типа с полной некомпрометированной иммунной системой. Иммунные привилегии также отмечаются для мультилинейно-дифференцирующихся стрессоустойчивых клеток (MUSE), выделяемых как SSEA-3⁺ субпопуляция MC [50]. Было показано выживание в течение нескольких недель аллогенных и ксеногенных MUSE, введённых внутривенно кроликам без иммунной супрессии [51]. Несмотря на различия в подходах к фенотипированию субпопуляций, сходство функциональных характеристик SSEA-3⁺ MUSE и NES–GFP⁺ MSC [40, 49, 50] даёт основания предполагать, что они представляют одну общую субпопуляцию. Согласно литературным данным, MUSE экспрессируют нестин [52]. Ранее, основываясь на наших результатах и литературных данных, мы указывали на связь между экспрессией нестина и популяцией иммунопривилегированных клеток. Такие нестин-экспрессирующие стволовые клетки обнаруживаются в различных частях взрослого организма и органах различного эмбрионального происхождения: как на примере изученных нами иммунопривилегированных клеток, в частности MSC, так и других иммунопривилегированных стволовых клеток, таких как мышечные стволовые клетки и стволовые клетки волосяного фолликула [49], а также стволовых клеток других иммунопривилегированных территорий: яичка [53], хряща [54], головного мозга [55] и сетчатки глаза [56]. Вопрос участия нестина в механизмах иммунных привилегий не затрагивался в работе напрямую, как и вопрос механизмов иммунных привилегий в целом.

Нестин — промежуточный филамент VI типа [57]. Нестин известен как маркер стволовых клеток [57]. Наряду с другими промежуточными филаментами, нестин участвует в ряде сигнальных путей, ключевых для стволовых клеток как нормальных, так и раковых [58]. Повышение экспрессии нестина выделяют как негативный прогностический фактор для ряда видов рака эпителиального, мезенхимного и нейрального происхождения: колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, различных видов рака центральной нервной системы, немелкоклеточного рака лёгкого, рака молочной

железы, меланомы и множественной миеломы [59]. Более того, нестин ассоциируется с незрелым фенотипом опухолей и раковыми стволовыми клетками (CSC) [60]. Гиперэкспрессия нестина ассоциируется с более агрессивным течением и метастазированием опухолей, их рефрактерностью к терапии [61]. Вопрос о том, является ли нестин прямым регулятором в процессах формирования иммунных привилегий или лишь является пассивным маркером, ассоциированным с регуляцией стволового состояния, остается открытым.

Дополнительные аргументы об общности стволовых клеток различных тканей происходят из работ, посвященных плюрипотентным стволовым клеткам взрослого организма [62–65]. Такие плюрипотентные клетки имеют насыщенную событиями историю их изучения с использованием различных протоколов и упоминаются в литературе под различными названиями: MAPCs/spore-like cells/STAP/MUSE/VSEL [62]. VSEL – очень малые эмбриоподобные стволовые клетки и позиционируются как предшественники тканеспецифичных стволовых клеток. Для таких клеток показано участие в репаративных процессах: увеличение их числа и выход в периферическую кровь под действием факторов повреждения тканей. MUSE демонстрируют способность к кросс-дифференцировке между направлениями зародышевых листков [52, 66]. Так, для малой субпопуляции MSC, которые можно найти в соединительных тканях почти всех органов, авторы продемонстрировали способность клеток к дифференцировке во всех трёх направлениях зародышевых листков, их самоподдержание и их миграцию к областям повреждения [52]. Показано, что такие стволовые клетки мигрируют в ткани при эмбриогенезе, не принимают непосредственного участия в формировании ткани и остаются покоящимися во взрослом организме [64, 67–70]. При этом такие стволовые клетки обладают устойчивостью к облучению и химиотерапевтическому воздействию [71–73]. В экспериментах по аллогенной и ксеногенной трансплантации MUSE показано наличие у них иммунных привилегий [50, 51]. Таким образом, можно обобщить, что субпопуляции стволовых клеток различных органов и тканей взрослого организма имеют множество общих функций и характеристик. Маловероятно, что для одинаковых функций эволюционно возникло множество различных и независимых механизмов, однако необходима строгая проверка этой гипотезы.

Состояние покоя стволовых клеток выделяется как ключевая характеристика, регуляция

которой выполняется множеством механизмов и связана с функциями самоподдержания, дифференцировки и активации в ответ на повреждение [65, 74–79]. Нарушение регуляции состояния покоя стволовых клеток зачастую сопровождается их истощением и ассоциируется с дегенеративными патологиями и старением [80–83]. Таким образом, связь состояния покоя стволовых клеток с иммунными привилегиями [36] и, более того, участие T-reg в поддержании состояния покоя [39] свидетельствуют о глубокой интеграции механизмов иммунных привилегий в регуляцию стволовых клеток.

СТВОЛОВАЯ СИСТЕМА

Описанные выше функции и характеристики стволовых клеток в значительной степени определяются эндогенно – эпигенетическими метками, продуктами метаболизма, внутренними сигнальными каскадами, РНК-интерференцией и другими клеточными механизмами [58, 84–86]. Вместе с тем стволовая клетка и её окружение представляют собой сложную систему взаимной их регуляции [87, 88]. Практическое отделение стволовой клетки от ниши затруднительно ввиду нарушения клеточных регуляций [36, 63, 89–92]. Культивирование выделенной субпопуляции стволовых клеток требует специальных решений [93]. Например, демонстрируется эффективность использования методов культивирования, направленных на удержание стволовых клеток мышц в состоянии покоя, для увеличения последующего терапевтического эффекта на мышцах [94]. Эти методы включают в себя локальную регуляцию стволовых клеток за счёт ниши, включающей в себя матрикс и специальную ростовую среду. Продукты метаболизма вносят существенный вклад в регуляцию стволовых клеток и их окружения [39, 95]. Лиганд-рецепторные межклеточные контакты и нанотрубки, обеспечивающие прямой обмен цитоплазматическим содержимым, также играют важную роль в регуляции стволовых клеток и их окружения [96–99]. Помимо потомства стволовых клеток, важную роль в поддержании стволовых клеток играют иммунные и другие клетки ниши стволовых клеток [39, 100, 101]. Микровезикулы, секретируемые MSC, содержат как мембранный репертуар рецепторов и лигандов, способных к взаимодействию на поверхности клетки, так и внутреннее содержимое с его внутриклеточным разнообразием сигнальных молекул и способны взаимодействовать с мишенями в других частях тела [102–104].

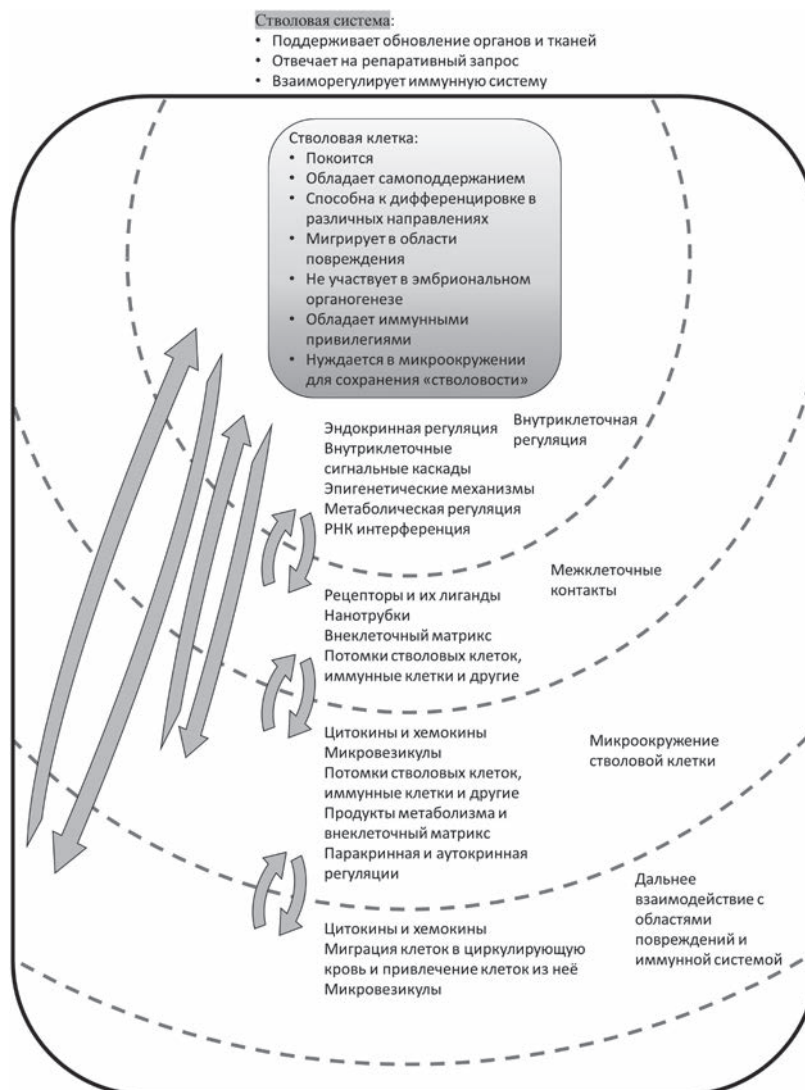


Рис. 1. Схема показывает идею обобщения стволовых клеток, их микроокружения и механизмов их регуляций в стволовую систему. Пунктирные линии разделяют области взаимодействия, подписанные в правой части. В центральных подписях указаны основные элементы, участвующие во взаимодействии, включая как клетки, так и различные неклеточные компоненты. Стрелки в левой части указывают на процессы, происходящие между выделенными областями взаимодействия

На примере стволовых клеток мышц демонстрируется их переход в состояние готовности как реакция на повреждение в другой части организма, а для VSEL — выход в периферическую кровь [69, 105]. Приведённые примеры упоминают лишь небольшую часть изученных механизмов, при этом демонстрируют существование сложной сети регуляции, связанной с функциями стволовых клеток (рис. 1). Терминологически уместно говорить о существовании стволовой системы, отвечающей за регуляцию её клеточных и иных компонент. Эта система выполняет функцию поддержки клеточного состава органов взрослого организма, реагирует репаративным ответом в случае повреждения, осуществляет взаиморегуляцию с иммунной системой (рис. 1). Термин «стволовая система»

позволит более точно отражать структуру объекта изучения, что должно благоприятно сказываться на общем представлении. Вместе с тем разделение понятий «стволовая клетка» и «ниша стволовых клеток» имеет принципиальное значение в понимании их функционирования. Схемы экспериментов, способных различать вклад индивидуальных клеток или их субпопуляций, способны предложить принципиально новый взгляд на объект изучения [49, 65, 88]. Так, например, сокращение МС предоставляет лучшее отличие от сокращения MSC. Такое различие мы выделили как ключевой момент, позволивший показать иммунные привилегии мезенхимных стволовых клеток среди общей популяции мезенхимных клеток, не обладающих иммунными привилегиями [49].

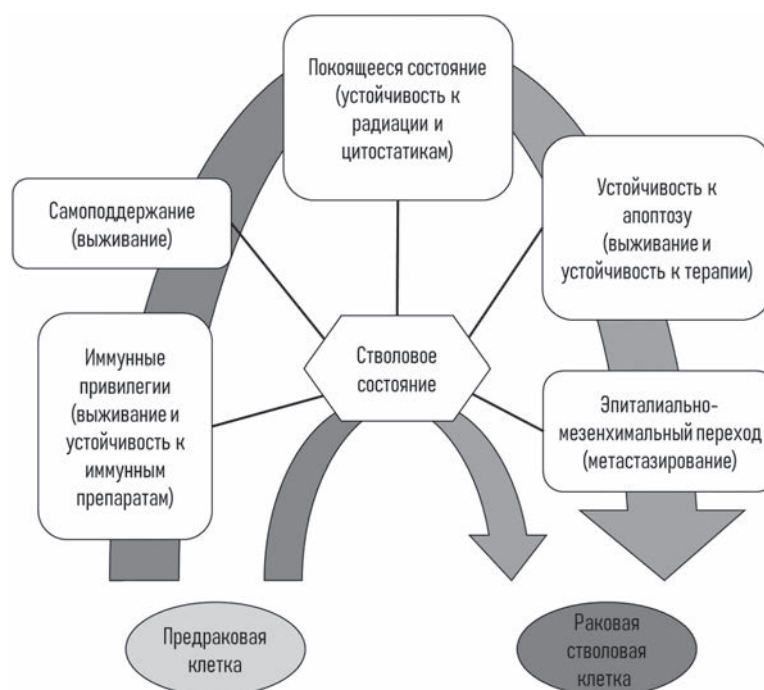


Рис. 2. Показана идея, что в ряде случаев рака, возможно, происходит получение комплекса признаков, необходимых для выживания раковой стволовой клетки через стволовое состояние нежелательно через независимые события

Обобщение признаков стволовых клеток организма и признание иммунных привилегий как основного свойства субпопуляций стволовых клеток даёт новый взгляд на процессы канцерогенеза. Известно, CSC ассоциируются с рефрактерностью к терапии, метастазированием, рецидивированием [106, 107]. В литературе демонстрируется системное сходство между CSC и нормальными стволовыми клетками, выраженное в состоянии глубокого покоя, способности к миграции и дифференцировке, устойчивости к гипоксии, самоподдержанию и экспрессии нестина [49, 57, 58, 60, 64, 66, 106]. Иммунная система способна оказывать подавляющее действие на раковые клетки и тормозить развитие рака [108, 109]. Наличие иммунных привилегий у CSC как стволовых предоставляет патологическим клеткам значимые преимущества, что демонстрируется в экспериментах [46, 110]. Как и в нашей работе с непатологическими стволовыми клетками [49], демонстрируется длительное выживание раковых стволовых клеток и сохранение их функций давать метастазы при подавлении иммунной системы [46]. Как и для непатологических стволовых клеток в исследованиях отмечается роль T-reg и состояния покоя CSC в формировании иммунных привилегий CSC [46, 47, 110, 111]. Таким образом, раковые клетки могут получить целый набор преимуществ, характерных стволовым клеткам, включая иммунные привилегии, посредством смещения в стволо-

вое состояние вместо независимого последовательного их накопления (рис. 2).

Отдельным фактором риска, связанным с иммунными привилегиями, является возможность их использования инфекционными патогенами для укрытия от действия иммунной системы [112]. Инфицирование стволовых клеток и их ниш приводит к нарушению функций стволовой системы и выражается клинически патологиями в виде фиброзов, нарушения кроветворения, нарушений костной и хрящевой тканей, повреждения барьерных функций в сосудах мозга [112].

Наличие столь потенциально опасного механизма, как иммунные привилегии стволовых клеток, должно быть эволюционно уравновешено не менее значимыми причинами, чтобы не быть отвергнутым в процессе эволюции. Контроль над аутоиммунитетом – подходящая значимая причина. В дополнение к механизмам центрального контроля аутоиммунитета в организме представлены механизмы периферического контроля [113, 114]. Основными исполнителями периферического контроля считаются T-reg, однако отмечается также участие и других механизмов контроля иммунитета. Иммунные привилегии стволовых клеток могут быть частью таких механизмов [29] (рис. 3). Это предположение подтверждается тем, что во время воспалительного процесса MSC не просто уклоняются от действия иммунных клеток, но и активизируются, выделяя хемокины,

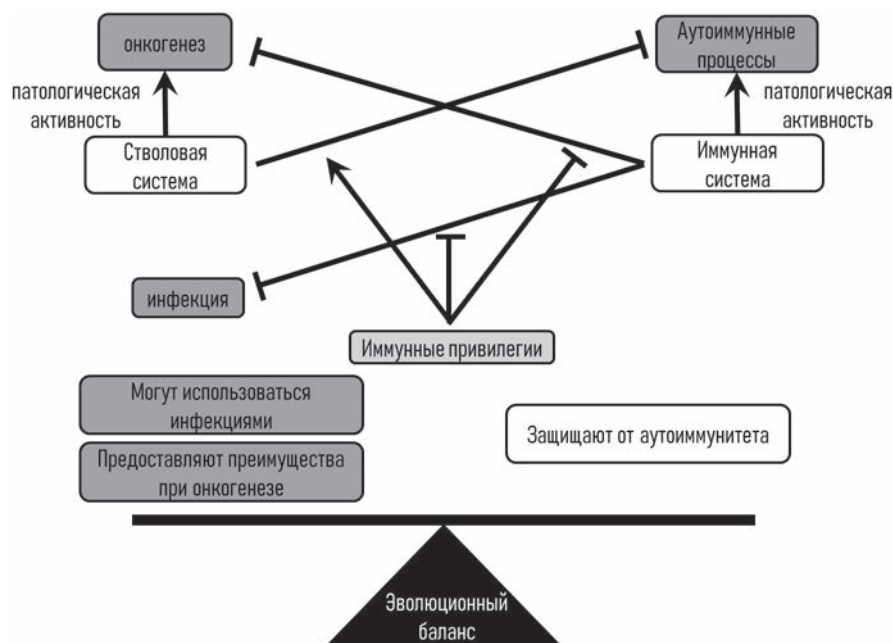


Рис. 3. Схема показывает возможную роль иммунных привилегий в регуляции стволовой и иммунной систем как результат эволюционного баланса

которые привлекают иммунные клетки [115, 116]. Вовлечение стволовых клеток в процесс периферического контроля иммунитета может быть обусловлено высокой ценностью таких клеток и необходимостью их защиты. Также периферический контроль может быть необходим в дополнение к центральному контролю, особенно для сложных долгоживущих организмов, которые могут накопить мутационные различия в геноме периферических тканей и центральной иммунной системы в течение жизни [117].

В дополнение к аутоиммунному контролю, взаимодействие стволовой системы и иммунной системы необходимо в месте повреждения [118]. Правильно оркестрированная активация восстановительных и воспалительных программ является важной биологической регуляцией [102, 119, 120]. Взаимодействие между этими функциями представляется еще более весомым для эволюционного равновесия, и оно может использовать те же механизмы, что и контроль аутоиммунитета (рис. 4).

Участие иммунной системы в регуляции стволовой системы отмечается не только в активных патологических процессах, но и в норме с участием Т-reg и макрофагов. Для Т-reg продемонстрировано существование тканевых Т-reg с профилем экспрессии и транскриптомом, сходным с таковым у стволовых клеток [120]. Показано участие Т-reg в процессах восстановления тканей, поддержания покоящегося состояния стволовых клеток и их диф-

ференцировки [39, 121, 122]. Для Т-reg резидентов стволовых ниш волосяных фолликулов показана экспрессия JAG1-сигнала, что демонстрирует участие передачи Notch-сигнала как в иммунных регуляциях, так и в регуляции стволовых клеток [123–126]. Для макрофагов показана их роль в процессах восстановления различных тканей, а их дисфункция приводит к нарушению регуляции дифференцировки стволовых клеток и фиброзу [119, 127, 128]. Макрофаги также оказывают поддержку

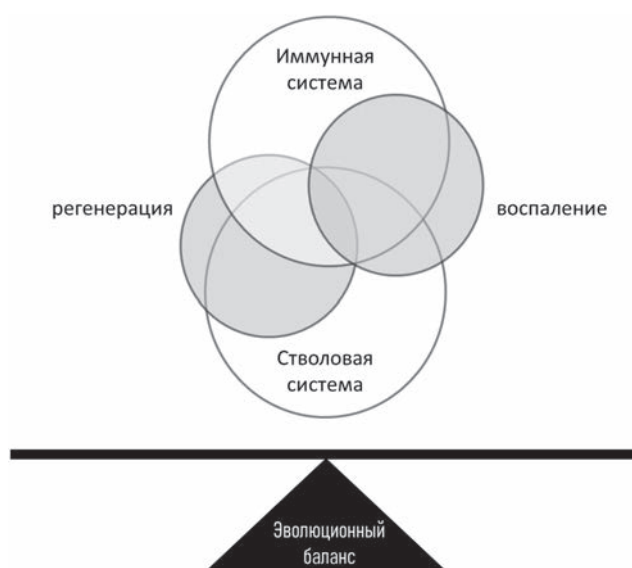


Рис. 4. Схема отображает баланс между регенерацией и воспалением как часть эволюционного баланса между механизмами стволовой и иммунной систем

MSC в борьбе с оксидативным стрессом посредством утилизации деполяризованных митохондрий [101]. Участие иммунных клеток в поддержании стволовых клеток в норме демонстрирует глубину взаимной интеграции стволовой и иммунной систем.

В свою очередь, стволовые клетки, наряду с иммуносупрессивным воздействием, способны стимулировать воспалительный ответ. Так, MSC, активированные воспалительными сигналами, выделяют хемокины, привлекающие иммунные клетки к области повреждения, где стволовые клетки способны модулировать их дальнейшую активность [115, 116]. Гормон прокальцитонин, вырабатываемый MSC, является одним из лучших и самых ранних маркеров различных групп инфекционных заболеваний [112, 129]. Уровень прокальцитонина значительно повышается задолго до повышения уровня С-реактивного белка, что используется в отделениях интенсивной терапии. MSC также экспрессируют функциональные Toll-подобные рецепторы (TLR), активирующие миграцию, дифференцировку, секрецию цитокинов и хемокинов в ответ на патоген-ассоциированные лиганды [130]. Было показано, что такие MSC в зависимости от сигналов окружения могут утрачивать способность к ингибированию Т-лимфоцитов вследствие нарушения сигнального пути Notch посредством активации TLR3 и TLR4 [131]. Более того, набор генов, специфически активируемый в стволовых клетках, предоставляет собственную защиту от вирусных инфекций [86]. Таким образом, MSC имеют сложный паттерн поведения и могут как блокировать иммунный ответ, так и активно участвовать в нём.

Представленные примеры взаимной регуляции стволовой и иммунной систем не являются исчерпывающими. Например, отмечается влияние гипоксии, часто следующей за повреждением, как на подавление иммунитета, так и на поддержание стволовых клеток [95, 111, 132]. Также аденозин играет важную роль в регуляции обеих систем [133]. Причем в механизмах регуляции участвуют различные клетки, в том числе потомки стволовых клеток или дендритные клетки [88, 134]. Как видно из обзора литературы, иммунные привилегии стволовых клеток обусловлены рекрутированием Т-лимфоцитов из циркулирующей крови, их перепрограммированием, состоянием покоя и другими механизмами, которые одновременно регулируют как иммунный ответ, так и поддержание стволовых клеток. Таким образом, иммунные привилегии стволовых клеток глубоко интегрированы в регуляцию стволовой систе-

мы, которая, как уже отмечалось, регулируется различными механизмами, действующими как при межклеточном контакте, так и через системные и локальные механизмы, включающие в качестве промежуточных звеньев иммунные и другие клетки, образуя сложную систему, рассматриваемую в обзоре (рис. 1). Подробное рассмотрение механизмов заслуживает отдельного обзора, а наиболее изученные механизмы могут стать предметом отдельных обзоров.

Важным обобщением является то, что между стволовой и иммунной системами существует тесная и сложная взаимосвязь. Понимание механизмов этой связи позволит применять комплексные подходы в трансляционной медицине и в уже существующих видах терапии. Таким примером может быть использование мезенхимальных клеток и их продуктов для подавления аутоиммунных патологий [50, 103, 135]. В трансплантологии для профилактики и лечения реакций «трансплантат против хозяина» могут использоваться мезенхимальные клетки и их неклеточные продукты [115, 136]. Другим примером является стимуляция стволовых ниш и их механизмов периферической защиты от аутоиммунитета вместо общей иммуносупрессии, которая может сопровождаться инфекционными осложнениями [137]. Эксперименты на мышах с T-reg, несущими искусственный химерный антигенный рецептор против заданного МНС I, демонстрируют потенциал в борьбе с отторжением трансплантата [138]. Воспалительные процессы играют ключевую роль в запуске регенерации, однако их избыточная активность замедляет восстановление [133]. Понимание механизмов иммунной регуляции процессов регенерации может предложить инструменты для терапевтического управления иммунной системой и новые решения для регенеративной медицины [133, 139, 140]. Поскольку наличие иммунных привилегий в норме является результатом сложной корегуляции различных механизмов, в случае рака может потребоваться ингибирование различных сигнальных путей в зависимости от конкретного пациента для достижения большей эффективности персонализированной терапии [27, 141, 142].

Интеграция нового механизма в систему создаёт потенциальную точку поломки. Для каждого механизма существуют причины, которые перевешивают связанные с ним риски, иначе он отвергается естественным отбором. Такая глубокая интеграция стволовой системы и иммунной системы означает наличие эволюционной необходимости и сложной тонко

настроенной регуляции. Как видно из обзора, фундаментальное значение иммунных привилегий непатологических стволовых клеток и особенно MSC трудно переоценить. Ведь MSC распространены по всему организму и демонстрируют сильный вклад в иммунную регуляцию [67, 102, 103, 115, 116]. Взаимодействие стволовых и иммунных систем играет важную роль для различных аспектов регенерации повреждений и контроля аутоиммунитета [17, 39, 66, 101, 103, 119, 122]. Иммунорегулирующие свойства MSC используются для поддерживающей трансплантационной терапии, а регенеративный потенциал MSC применяется в регенеративной медицине [66, 102, 104, 115, 136]. Также иммунные привилегии могут быть вовлечены в развитие рака и инфекционных заболеваний [46, 47, 110, 112]. Таким образом, предмет обзора затрагивает широкий круг медицинских проблем, в том числе и тех, которые не рассматриваются в данном обзоре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ассоциация иммунных привилегий с основным свойством покоящихся стволовых клеток предлагает точку зрения на вопросы регуляции аутоиммунитета, инфекционных заболеваний, регенеративной медицины, трансплантации и онкологии. Таким образом, в ряде случаев наличие у раковых клеток стволового состояния может предоставить целый ряд преимуществ, включая защиту от иммунитета. Это понимание может оказаться важным для лечения случаев рака, осложнённых наличием CSC. Изучение взаимодействия стволовых

клеток с иммунными клетками свидетельствует о существовании сложной сети взаимного регулирования, нарушение которой может привести к раку, аутоиммунным патологиям, дисфункции тканей органов и ускоренному старению. Исходя из наличия сложной сети регуляции стволовых клеток, я предлагаю использовать термин «стволовая система», который включает в себя как регуляцию самих стволовых клеток и их микроокружения, так и механизмы их взаимодействия с иммунной системой. Термин «стволовая система» позволяет более точно отражать структуру объекта изучения, что будет благоприятно сказываться на общем представлении. Изучение механизмов регуляции стволовой и иммунной систем открывает широкие возможности для изучения, результаты которого позволят лучше понять биологию и применить полученные результаты в медицине.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00459; <https://rscf.ru/project/22-25-00459/>).

Благодарности. Автор благодарит Бигильдеева Алексея, заведующего лабораторией эпигенетической регуляции кроветворения НМИЦ гематологии, за критическое прочтение работы.

Конфликт интересов. Автор объявляет об отсутствии финансового или иного конфликта интересов в представленной работе.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Dooremaal, J. C. (1873) The development of living tissue transplanted to foreign soil [in German], *Arch. Ophthalmol.*, **19**, 358-373.
2. Niederkorn, J. Y. (2006) See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege, *Nat. Immunol.*, **7**, 354-359, doi: 10.1038/NI1328.
3. Shirai, Y. (1921) On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogeneous animals, *Japan Med. World*, **1**, 14-15.
4. Murphy, J. B., and Sturm, E. (1923) Conditions determining the transplantability of tissues in the brain, *J. Exp. Med.*, **38**, 183-197, doi: 10.1084/jem.38.2.183.
5. Medawar, P. B. (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts, *Br. J. Exp. Pathol.*, **29**, 58-69.
6. Carson, M. J., Dose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., and Ploix, C. C. (2006) CNS immune privilege: hiding in plain sight, *Immunol. Rev.*, **213**, 48-65, doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x.
7. Negi, N., and Das, B. K. (2018) CNS: not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ, *Int. Rev. Immunol.*, **37**, 57-68, doi: 10.1080/08830185.2017.1357719.
8. Chang, G. C., and Young, L. H. (2011) Sympathetic ophthalmia, *Semin. Ophthalmol.*, **26**, 316-320, doi: 10.3109/08820538.2011.588658.
9. Hori, J., Yamaguchi, T., Keino, H., Hamrah, P., and Maruyama, K. (2019) Immune privilege in corneal transplantation, *Prog. Retin. Eye Res.*, **72**, 100758, doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.04.002.

10. Keino, H., Horie, S., and Sugita, S. (2018) Immune privilege and eye-derived T-regulatory cells, *J. Immunol. Res.*, **2018**, 1679197, doi: 10.1155/2018/1679197.
11. Zenclussen, A. C., Schumacher, A., Zenclussen, M. L., Wafula, P., and Volk, H. D. (2007) Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus, *Expert Rev. Mol. Med.*, **9**, 1-14, doi: 10.1017/S1462399407000294.
12. Katsh, S. (1957) *In vitro* demonstration of uterine anaphylaxis in guinea pigs sensitized with homologous testis or sperm, *Nature*, **180**, 1047-1048, doi: 10.1038/1801047a0.
13. Kaur, G., Thompson, L. A., and Dufour, J. M. (2014) Sertoli cells – immunological sentinels of spermatogenesis, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **30**, 36-44, doi: 10.1016/j.semedb.2014.02.011.
14. Kern, S., Robertson, S. A., Mau, V. J., and Maddocks, S. (1995) Cytokine Secretion by macrophages in the rat testis, *Biol. Reprod.*, **53**, 1407-1416, doi: 10.1095/biolreprod53.6.1407.
15. O'Bryan, M. K., Gerdprasert, O., Nikolic-Paterson, D. J., Meinhardt, A., Muir, J. A., Foulds, L. M., Phillips, D. J., De Kretser, D. M., and Hedger, M. P. (2005) Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal localized suppression of inflammatory responses, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **288**, 1744-1755, doi: 10.1152/ajpregu.00651.2004.
16. Billingham, R. E., and Silvers, W. K. (1971) A biologist's reflections on dermatology, *J. Invest. Dermatol.*, **57**, 227-240, doi: 10.1111/1523-1747.ep12261543.
17. Paus, R., Bulfone-Paus, S., and Bertolini, M. (2018) Hair follicle immune privilege revisited: the key to alopecia areata management, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **19**, 12-17, doi: 10.1016/j.jisp.2017.10.014.
18. Sun, Z., Zhang, M., Zhao, X. H., Liu, Z. H., Gao, Y., Samartzis, D., Wang, H. Q., and Luo, Z. J. (2013) Immune cascades in human intervertebral disc: the pros and cons, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **6**, 1009-1014.
19. Fujihara, Y., Takato, T., and Hoshi, K. (2014) Macrophage-inducing FasL on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing *in vivo* regeneration, *Stem Cells*, **32**, 1208-1219, doi: 10.1002/stem.1636.
20. Sun, Z., Liu, B., and Luo, Z. J. (2020) The immune privilege of the intervertebral disc: implications for intervertebral disc degeneration treatment, *Int. J. Med. Sci.*, **17**, 685-692, doi: 10.7150/ijms.42238.
21. Joyce, J. A., and Fearon, D. T. (2015) T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment, *Science*, **348**, 74-80, doi: 10.1126/science.aaa6204.
22. Chen, D. S., and Mellman, I. (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle, *Immunity*, **39**, 1-10, doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
23. Kalavska, K., Kucerova, L., Schmidtova, S., Chovanec, M., and Mego, M. (2020) Cancer stem cell niche and immune-active tumor microenvironment in testicular germ cell tumors, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1226**, 111-121, doi: 10.1007/978-3-030-36214-0_9.
24. Nguyen, P. H. D., Wasser, M., Tan, C. T., Lim, C. J., Lai, H. L. H., et al. (2022) Trajectory of immune evasion and cancer progression in hepatocellular carcinoma, *Nat. Commun.*, **13**, 1441, doi: 10.1038/S41467-022-29122-W.
25. Duan, Q., Zhang, H., Zheng, J., and Zhang, L. (2020) Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment, *Trends Cancer*, **6**, 605-618, doi: 10.1016/J.TRECAN.2020.02.022.
26. Lim, A. R., Rathmell, W. K., and Rathmell, J. C. (2020) The tumor microenvironment as a metabolic barrier to effector T cells and immunotherapy, *eLife*, **9**, 1-13, doi: 10.7554/ELIFE.55185.
27. Li, B., Chan, H. L., and Chen, P. (2019) Immune checkpoint inhibitors: basics and challenges, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 3009-3025, doi: 10.2174/0929867324666170804143706.
28. Xia, L., Oyang, L., Lin, J., Tan, S., Han, Y., et al. (2021) The cancer metabolic reprogramming and immune response, *Mol. Cancer*, **20**, 28, doi: 10.1186/S12943-021-01316-8.
29. Ichiryu, N., and Fairchild, P. J. (2013) Immune privilege of stem cells, *Methods Mol. Biol.*, **1029**, 1-16, doi: 10.1007/978-1-62703-478-4_1.
30. Agudo, J. (2021) Immune privilege of skin stem cells: what do we know and what can we learn? *Exp. Dermatol.*, **30**, 522-528, doi: 10.1111/EXD.14221.
31. Ankrum, J. A., Ong, J. F., and Karp, J. M. (2014) Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 252-260, doi: 10.1038/nbt.2816.
32. Aguila, H. L., and Weissman, I. L. (1996) Hematopoietic stem cells are not direct cytotoxic targets of natural killer cells, *Blood*, **87**, 1225-1231, doi: 10.1182/blood.V87.4.1225.bloodjournal8741225.
33. Drukker, M., Katz, G., Urbach, A., Schuldiner, M., Markel, G., Itskovitz-Eldor, J., Reubinoff, B., Mandelboim, O., and Benvenisty, N. (2002) Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9864-9869, doi: 10.1073/PNAS.142298299.
34. Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2003) Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells, *Transplantation*, **76**, 1208-1213, doi: 10.1097/01.TP.0000082540.43730.80.
35. Mammolenti, M., Gajavelli, S., Tsoulfas, P., and Levy, R. (2004) Absence of major histocompatibility complex class I on neural stem cells does not permit natural killer cell killing and prevents recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes *in vitro*, *Stem Cells*, **22**, 1101-1110, doi: 10.1634/stemcells.22-6-1101.
36. Agudo, J., Park, E. S., Rose, S. A., Alibo, E., Sweeney, R., et al. (2018) Quiescent tissue stem cells

- evade immune surveillance, *Immunity*, **48**, 271-285, doi: 10.1016/j.immuni.2018.02.001.
37. Bernitz, J. M., Kim, H. S., MacArthur, B., Sieburg, H., and Moore, K. (2016) Hematopoietic stem cells count and remember self-renewal divisions, *Cell*, **167**, 1296-1309, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.022.
38. Fürst, D., Neuchel, C., Tsamadou, C., Schrezenmeier, H., and Mytilineos, J. (2019) HLA matching in unrelated stem cell transplantation up to date, *Transfus. Med. Hemother.*, **46**, 326-336, doi: 10.1159/000502263.
39. Hirata, Y., Furuhashi, K., Ishii, H., Li, H. W., Pinho, S., Ding, L., Robson, S. C., Frenette, P. S., and Fujisaki, J. (2018) CD150 high bone marrow Tregs maintain hematopoietic stem cell quiescence and immune privilege via adenosine, *Cell Stem Cell*, **22**, 445-453, doi: 10.1016/j.stem.2018.01.017.
40. Méndez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N., and Frenette, P. S. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche, *Nature*, **466**, 829-834, doi: 10.1038/nature09262.
41. Naji, A., Eitoku, M., Favier, B., Deschaseaux, F., Rouas-Freiss, N., and Suganuma, N. (2019) Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 3323-3348, doi: 10.1007/S00018-019-03125-1.
42. Zangi, L., Margalit, R., Reich-Zeliger, S., Bachar-Lustig, E., Beilhack, A., Negrin, R., and Reisner, Y. (2009) Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells, *Stem Cells*, **27**, 2865-2874, doi: 10.1002/stem.217.
43. Miura, Y., Yoshioka, S., Yao, H., Takaori-Kondo, A., Maekawa, T., and Ichinohe, T. (2013) Chimerism of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation: is it clinically relevant? *Chimerism*, **4**, 78-83, doi: 10.4161/chim.25609.
44. Badillo, A. T., Beggs, K. J., Javazon, E. H., Tebbets, J. C., and Flake, A. W. (2007) Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an *in vivo* cellular and humoral alloimmune response, *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **13**, 412-422, doi: 10.1016/j.bbmt.2006.12.447.
45. Berglund, A. K., Fortier, L. A., Antczak, D. F., and Schnabel, L. V. (2017) Immunoprivileged no more: measuring the immunogenicity of allogeneic adult mesenchymal stem cells, *Stem Cell Res. Ther.*, **8**, 288, doi: 10.1186/s13287-017-0742-8.
46. Malladi, S., MacAlinao, D. G., Jin, X., He, L., Basnet, H., Zou, Y., De Stanchina, E., and Massagué, J. (2016) Metastatic latency and immune evasion through autocrine inhibition of WNT, *Cell*, **165**, 45, doi: 10.1016/J.CELL.2016.02.025.
47. Galassi, C., Musella, M., Manduca, N., Maccafeo, E., and Sistigu, A. (2021) The immune privilege of cancer stem cells: a key to understanding tumor immune escape and therapy failure, *Cells*, **10**, 2361, doi: 10.3390/CELLS10092361.
48. Babaei, G., Aziz, S. G. G., and Jaghi, N. Z. Z. (2021) EMT, cancer stem cells and autophagy; the three main axes of metastasis, *Biomed. Pharmacother.*, **133**, 110909, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2020.110909.
49. Karpenko, D., Kapranov, N., and Bigildeev, A. (2022) Nestin-GFP transgene labels immunoprivileged bone marrow mesenchymal stem cells in the model of ectopic foci formation, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 993056, doi: 10.3389/FCELL.2022.993056.
50. Kuroda, Y., Oguma, Y., Hall, K., and Dezawa, M. (2022) Endogenous reparative pluripotent muse cells with a unique immune privilege system: hint at a new strategy for controlling acute and chronic inflammation, *Front. Pharmacol.*, **13**, 1027961, doi: 10.3389/FPHAR.2022.1027961.
51. Yamada, Y., Wakao, S., Kushida, Y., Minatoguchi, S., Mikami, A., et al. (2018) S1P-S1PR2 axis mediates homing of muse cells into damaged heart for long-lasting tissue repair and functional recovery after acute myocardial infarction, *Circ. Res.*, **122**, 1069-1083, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311648.
52. Li, H., Wei, J., Liu, X., Zhang, P., and Lin, J. (2022) Muse Cells: ushering in a new era of stem cell-based therapy for stroke, *Stem Cell Res. Ther.*, **13**, 421, doi: 10.1186/S13287-022-03126-1.
53. Jiang, M. H., Cai, B., Tuo, Y., Wang, J., Zang, Z. J., et al. (2014) Characterization of nestin-positive stem leydig cells as a potential source for the treatment of testicular leydig cell dysfunction, *Cell Res.*, **24**, 1466-1485, doi: 10.1038/CR.2014.149.
54. Jaramillo-Rangel, G., Chávez-Briones, M. D. L., Ancer-Arellano, A., and Ortega-Martínez, M. (2021) Nestin-expressing cells in the lung: the bad and the good parts, *Cells*, **10**, 3413, doi: 10.3390/cells10123413.
55. Li, L., Mignone, J., Yang, M., Matic, M., Penman, S., Enikolopov, G., and Hoffman, R. M. (2003) Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9958-9961, doi: 10.1073/PNAS.1733025100.
56. Bhatia, B., Singhal, S., Lawrence, J. M., Khaw, P. T., and Limb, G. A. (2009) Distribution of Müller stem cells within the neural retina: evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye, *Exp. Eye Res.*, **89**, 373-382, doi: 10.1016/J.EXER.2009.04.005.
57. Bernal, A., and Arranz, L. (2018) Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications, *Cell. Mol. Life Sci.*, **75**, 2177-2195, doi: 10.1007/S00018-018-2794-Z.
58. Sharma, P., Alsharif, S., Fallatah, A., and Chung, B. M. (2019) Intermediate filaments as effectors of cancer development and metastasis: a focus on keratins, vimentin, and nestin, *Cells*, **8**, 497, doi: 10.3390/CELLS8050497.
59. Szymańska-Chabowska, A., Świątkowski, F., Janowska-Polańska, B., Mazur, G., and Chabowski, M. (2021) Nestin expression as a diagnostic and prognostic

- marker in colorectal cancer and other tumors, *Clin. Med. Insights Oncol.*, **15**, doi: 10.1177/11795549211038256.
60. Neradil, J., and Veselska, R. (2015) Nestin as a marker of cancer stem cells, *Cancer Sci.*, **106**, 803-811, doi: 10.1111/CAS.12691.
 61. Ishiwata, T., Matsuda, Y., and Naito, Z. (2011) Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis, *World J. Gastroenterol.*, **17**, 409-418, doi: 10.3748/WJG.V17.I4.409.
 62. Bhartiya, D. (2017) Pluripotent stem cells in adult tissues: struggling to be acknowledged over two decades, *Stem Cell. Rev. Rep.*, **13**, 713-724, doi: 10.1007/S12015-017-9756-Y.
 63. Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., and Kucia, M. (2019) Very small embryonic-like stem cells (VSELs), *Circ. Res.*, **124**, 208-210, doi: 10.1161/circresaha.118.314287.
 64. Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., Suszynska, M., Miller, D. M., Kucia, M., and Shin, D. M. (2017) A novel view of the adult stem cell compartment from the perspective of a quiescent population of very small embryonic-like stem cells, *Circ. Res.*, **120**, 166-178, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309362.
 65. Bhartiya, D., Jha, N., Tripathi, A., and Tripathi, A. (2023) Very small embryonic-like stem cells have the potential to win the three-front war on tissue damage, cancer, and aging, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **10**, 1061022, doi: 10.3389/FCELL.2022.1061022.
 66. Dezawa, M. (2016) Muse cells provide the pluripotency of mesenchymal stem cells: direct contribution of muse cells to tissue regeneration, *Cell Transplant.*, **25**, 849-861, doi: 10.3727/096368916X690881.
 67. Isern, J., García-García, A., Martín, A. M., Arranz, L., Martín-Pérez, D., Torroja, C., Sánchez-Cabo, F., and Méndez-Ferrer, S. (2014) The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function, *eLife*, **3**, 03696, doi: 10.7554/ELIFE.03696.
 68. Gleiberman, A. S., Michurina, T., Encinas, J. M., Roig, J. L., Krasnov, P., Balordi, F., Fishell, G., Rosenfeld, M. G., and Enikolopov, G. (2008) Genetic approaches identify adult pituitary stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6332, doi: 10.1073/PNAS.0801644105.
 69. Dumont, N. A., Wang, Y. X., and Rudnicki, M. A. (2015) Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function, *Development*, **142**, 1572-1581, doi: 10.1242/DEV.114223.
 70. Neo, W. H., Lie-A-Ling, M., Fadlullah, M. Z. H., and Lacaud, G. (2021) Contributions of embryonic HSC-independent hematopoiesis to organogenesis and the adult hematopoietic system, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 631699, doi: 10.3389/FCELL.2021.631699.
 71. Shaikh, A., Bhartiya, D., Kapoor, S., and Nimkar, H. (2016) Delineating the effects of 5-fluorouracil and follicle-stimulating hormone on mouse bone marrow stem/progenitor cells, *Stem Cell Res. Ther.*, **7**, 59, doi: 10.1186/S13287-016-0311-6.
 72. Anand, S., Bhartiya, D., Sriraman, K., and Mallick, A. (2016) Underlying mechanisms that restore spermatogenesis on transplanting healthy niche cells in busulphan treated mouse testis, *Stem Cell Rev. Rep.*, **12**, 682-697, doi: 10.1007/S12015-016-9685-1.
 73. Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Zuba-Surma, E., Wan, W., Kucia, M., et al. (2011) Adult murine bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells differentiate into the hematopoietic lineage after co-culture over OP9 stromal cells, *Exp. Hematol.*, **39**, 225-237, doi: 10.1016/j.exphem.2010.10.007.
 74. Sousa-Victor, P., García-Prat, L., and Muñoz-Cánoves, P. (2021) Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 204-226, doi: 10.1038/s41580-021-00421-2.
 75. Chen, Z., Guo, Q., Song, G., and Hou, Y. (2022) Molecular regulation of hematopoietic stem cell quiescence, *Cell. Mol. Life Sci.*, **79**, 218, doi: 10.1007/S00018-022-04200-W.
 76. Cavallucci, V., Fidaleo, M., and Pani, G. (2016) Neural stem cells and nutrients: poised between quiescence and exhaustion, *Trends Endocrinol. Metab.*, **27**, 756-769, doi: 10.1016/J.TEM.2016.06.007.
 77. Ance, S., Stuelsatz, P., and Feige, J. N. (2021) Muscle stem cell quiescence: controlling stemness by staying asleep, *Trends Cell Biol.*, **31**, 556-568, doi: 10.1016/J.TCB.2021.02.006.
 78. Ayyaz, A., Kumar, S., Sangiorgi, B., Ghoshal, B., Gosio, J., Ouladan, S., Fink, M., Barutcu, S., Trcka, D., Shen, J., Chan, K., Wrana, J. L., and Gregorieff, A. (2019) Single-cell transcriptomes of the regenerating intestine reveal a revival stem cell, *Nature*, **569**, 121-125, doi: 10.1038/S41586-019-1154-Y.
 79. Dias, I. B., Bouma, H. R., and Henning, R. H. (2021) Unraveling the big sleep: molecular aspects of stem cell dormancy and hibernation, *Front. Physiol.*, **12**, 624950, doi: 10.3389/FPHYS.2021.624950.
 80. Ibrayeva, A., Bay, M., Pu, E., Jörg, D. J., Peng, L., Jun, H., Zhang, N., Aaron, D., Lin, C., Resler, G., Hidalgo, A., Jang, M. H., Simons, B. D., and Bonaguidi, M. A. (2021) Early stem cell aging in the mature brain, *Cell Stem Cell*, **28**, 955-966, doi: 10.1016/J.STEM.2021.03.018.
 81. Choi, K., Park, S. H., Park, S. Y., and Yoon, S. K. (2022) The stem cell quiescence and niche signaling is disturbed in the hair follicle of the hairpoor mouse, an MUHH model mouse, *Stem Cell Res. Ther.*, **13**, 211, doi: 10.1186/S13287-022-02898-W.
 82. Chakkalakal, J. V., Jones, K. M., Basson, M. A., and Brack, A. S. (2012) The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence, *Nature*, **490**, 355-360, doi: 10.1038/nature11438.
 83. Singh, S., Jakubison, B., and Keller, J. R. (2020) Protection of hematopoietic stem cells from stress-induced exhaustion and aging, *Curr. Opin. Hematol.*, **27**, 225-231, doi: 10.1097/MOH.0000000000000586.

84. Zhang, Z., Zhuang, L., and Lin, C. P. (2019) Roles of microRNAs in establishing and modulating stem cell potential, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3643, doi: 10.3390/IJMS20153643.
85. Ren, R., Ocampo, A., Liu, G. H., and Izpisua Belmonte, J. C. (2017) Regulation of stem cell aging by metabolism and epigenetics, *Cell Metab.*, **26**, 460-474, doi: 10.1016/J.CMET.2017.07.019.
86. Wu, X., Dao Thi, V. L., Huang, Y., Billerbeck, E., Saha, D., et al. (2018) Intrinsic immunity shapes viral resistance of stem cells, *Cell*, **172**, 423-438, doi: 10.1016/J.CELL.2017.11.018.
87. Fuchs, E., and Blau, H. M. (2020) Tissue stem cells: architects of their niches, *Cell Stem Cell*, **27**, 532-556, doi: 10.1016/J.STEM.2020.09.011.
88. Cancedda, R., and Mastrogiacomio, M. (2023) Transit Amplifying Cells (TACs): a still not fully understood cell population, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **11**, 1189225, doi: 10.3389/FBIOE.2023.1189225.
89. Chertkov, J. L., Drize, N. J., and Gurevitch, O. A. (1983) Hemopoietic stromal precursors in long-term culture of bone marrow: II. Significance of initial packing for creating a hemopoietic microenvironment and maintaining stromal precursors in the culture, *Exp. Hematol.*, **11**, 243-248.
90. Nie, Y., Han, Y.-C., and Zou, Y.-R. (2008) CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells, *J. Exp. Med.*, **205**, 777-783, doi: 10.1084/jem.20072513.
91. Greenbaum, A., Hsu, Y. M. S., Day, R. B., Schuettpelz, L. G., Christopher, M. J., Borgerding, J. N., Nagasawa, T., and Link, D. C. (2013) CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance, *Nature*, **495**, 227-230, doi: 10.1038/nature11926.
92. Boyd, A. L., Campbell, C. J. V., Hopkins, C. I., Fiebig-Comyn, A., Russell, J., Ulemek, J., Foley, R., Leber, B., Xenocostas, A., Collins, T. J., and Bhatia, M. (2014) Niche displacement of human leukemic stem cells uniquely allows their competitive replacement with healthy HSPCs, *J. Exp. Med.*, **211**, 1925-1935, doi: 10.1084/jem.20140131.
93. Lahlil, R., Scrofani, M., Barbet, R., Tancredi, C., Aries, A., and Hénon, P. (2018) VSELs maintain their pluripotency and competence to differentiate after enhanced *ex vivo* expansion, *Stem Cell Rev. Rep.*, **14**, 510-524, doi: 10.1007/S12015-018-9821-1.
94. Quarta, M., Brett, J. O., DiMarco, R., De Morree, A., Boutet, S. C., Chacon, R., Gibbons, M. C., Garcia, V. A., Su, J., Shrager, J. B., Heilshorn, S., and Rando, T. A. (2016) An artificial niche preserves the quiescence of muscle stem cells and enhances their therapeutic efficacy, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 752-759, doi: 10.1038/nbt.3576.
95. Elashry, M. I., Kinde, M., Klymiuk, M. C., Eldaey, A., Wenisch, S., and Arnhold, S. (2022) The effect of hypoxia on myogenic differentiation and multipotency of the skeletal muscle-derived stem cells in mice, *Stem Cell Res. Ther.*, **13**, 56, doi: 10.1186/S13287-022-02730-5.
96. Kann, A. P., Hung, M., and Krauss, R. S. (2021) Cell-cell contact and signaling in the muscle stem cell niche, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **73**, 78-83, doi: 10.1016/J.CEB.2021.06.003.
97. Zamfirescu, A. M., Yatsenko, A. S., and Shcherbata, H. R. (2022) Notch signaling sculpts the stem cell niche, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **10**, 1027222, doi: 10.3389/FCELL.2022.1027222.
98. Whitehead, J., Zhang, J., Harvestine, J. N., Kothambawala, A., Liu, G. Yu, and Leach, J. K. (2020) Tunneling nanotubes mediate the expression of senescence markers in mesenchymal stem/stromal cell spheroids, *Stem Cells*, **38**, 80-89, doi: 10.1002/stem.3056.
99. Jackson, M. V., Morrison, T. J., Doherty, D. F., McAuley, D. F., Matthay, M. A., Kissenpfennig, A., O'Kane, C. M., and Krasnodembskaya, A. D. (2016) Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the *in vitro* and *in vivo* models of ARDS, *Stem Cells*, **34**, 2210-2223, doi: 10.1002/STEM.2372.
100. Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M. M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011) Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche, *Cell*, **147**, 1146-1158, doi: 10.1016/J.CELL.2011.09.053.
101. Phinney, D. G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., et al. (2015) Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs, *Nat. Commun.*, **6**, 8472, doi: 10.1038/ncomms9472.
102. Toh, W. S., Zhang, B. I. N., Lai, R. C., and Lim, S. K. (2018) Immune regulatory targets of mesenchymal stromal cell exosomes/small extracellular vesicles in tissue regeneration, *Cytotherapy*, **20**, 1419-1426, doi: 10.1016/J.JCYT.2018.09.008.
103. Kahmini, F. R., and Shahgaldi, S. (2021) Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as novel cell-free therapy for treatment of autoimmune disorders, *Exp. Mol. Pathol.*, **118**, 104566, doi: 10.1016/J.YEXMP.2020.104566.
104. Nakazaki, M., Lankford, K. L., Yamamoto, H., Mae, Y., and Kocsis, J. D. (2023) Human mesenchymal stem-derived extracellular vesicles improve body growth and motor function following severe spinal cord injury in rat, *Clin. Transl. Med.*, **13**, 1284, doi: 10.1002/CTM2.1284.
105. Ratajczak, M. Z., Liu, R., Marlicz, W., Blogowski, W., Starzynska, T., Wojakowski, W., and Zuba-Surma, E. (2011) Identification of very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELS) circulating in peripheral blood during organ/tissue injuries, *Methods Cell Biol.*, **103**, 31-54, doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00003-6.

106. Barbato, L., Bocchetti, M., Di Biase, A., and Regad, T. (2019) Cancer stem cells and targeting strategies, *Cells*, **8**, 926, doi: 10.3390/CELLS8080926.
107. Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., and Allavena, P. (2017) Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **14**, 399-416, doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217.
108. Rollan, M. P., Cabrera, R., and Schwartz, R. A. (2022) Current knowledge of immunosuppression as a risk factor for skin cancer development, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **177**, 103754, doi: 10.1016/j.critrevonc.2022.103754.
109. Dugué, P. A., Rebolj, M., Garred, P., and Lynge, E. (2013) Immunosuppression and risk of cervical cancer, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **13**, 29-42, doi: 10.1586/ERA.12.159.
110. You, Y., Li, Y., Li, M., Lei, M., Wu, M., Qu, Y., Yuan, Y., Chen, T., and Jiang, H. (2018) Ovarian cancer stem cells promote tumour immune privilege and invasion via CCL5 and regulatory T cells, *Clin. Exp. Immunol.*, **191**, 60-73, doi: 10.1111/CEI.13044.
111. Baldominos, P., Barbera-Mourelle, A., Barreiro, O., Huang, Y., Wight, A., et al. (2022) Quiescent cancer cells resist T cell attack by forming an immunosuppressive niche, *Cell*, **185**, 1694-1708, doi: 10.1016/j.cell.2022.03.033.
112. Lebeau, G., Ah-Pine, F., Daniel, M., Bedoui, Y., Vagner, D., Frumence, E., and Gasque, P. (2022) Perivascular mesenchymal stem/stromal cells, an immune privileged niche for viruses? *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8038, doi: 10.3390/IJMS23148038.
113. Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H., and Baccala, R. (2017) The Multiple pathways to autoimmunity, *Nat. Immunol.*, **18**, 716-724, doi: 10.1038/NI.3731.
114. Legoux, F. P., Lim, J. B., Cauley, A. W., Dikiy, S., Ertelt, J., Mariani, T. J., Sparwasser, T., Way, S. S., and Moon, J. J. (2015) CD4⁺ T cell tolerance to tissue-restricted self antigens is mediated by antigen-specific regulatory T Cells rather than deletion, *Immunity*, **43**, 896-908, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2015.10.011.
115. Sergeant, E., Buysse, M., Devos, T., and Sprangers, B. (2021) Multipotent mesenchymal stromal cells in kidney transplant recipients: the next big thing? *Blood Rev.*, **45**, 100718, doi: 10.1016/J.BLRE.2020.100718.
116. López-García, L., and Castro-Manrreza, M. E. (2021) TNF- α and IFN- γ participate in improving the immunoregulatory capacity of mesenchymal stem/stromal cells: importance of cell-cell contact and extracellular vesicles, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9531, doi: 10.3390/IJMS22179531.
117. Blokzijl, F., De Ligt, J., Jager, M., Sasselli, V., Roerink, S., et al. (2016) Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life, *Nature*, **538**, 260-264, doi: 10.1038/nature19768.
118. Cooke, J. P. (2019) Inflammation and its role in regeneration and repair, *Circ. Res.*, **124**, 1166-1168, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314669.
119. Vannella, K. M., and Wynn, T. A. (2017) Mechanisms of organ injury and repair by macrophages, *Annu. Rev. Physiol.*, **79**, 593-617, doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034356.
120. Zhang, R., Xu, K., Shao, Y., Sun, Y., Saredy, J., et al. (2021) Tissue Treg secretomes and transcription factors shared with stem cells contribute to a Treg niche to maintain Treg-ness with 80% innate immune pathways, and functions of immunosuppression and tissue repair, *Front. Immunol.*, **11**, 632239, doi: 10.3389/FIMMU.2020.632239.
121. Cho, I., Lui, P. P., and Ali, N. (2020) Treg regulation of the epithelial stem cell lineage, *J. Immunol. Regen. Med.*, **8**, 100028, doi: 10.1016/J.REGEN.2020.100028.
122. Li, J., Tan, J., Martino, M. M., and Lui, K. O. (2018) Regulatory T-cells: potential regulator of tissue repair and regeneration, *Front. Immunol.*, **9**, 585, doi: 10.3389/FIMMU.2018.00585.
123. Liu, J., Sato, C., Cerletti, M., and Wagers, A. (2010) Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **92**, 367-409, doi: 10.1016/S0070-2153(10)92012-7.
124. Ali, N., Zirak, B., Rodriguez, R. S., Pauli, M. L., Truong, H. A., et al. (2017) Regulatory T cells in skin facilitate epithelial stem cell differentiation, *Cell*, **169**, 1119-1129, doi: 10.1016/J.CELL.2017.05.002.
125. Golub, R. (2021) The Notch signaling pathway involvement in innate lymphoid cell biology, *Biomed. J.*, **44**, 133-143, doi: 10.1016/J.BJ.2020.12.004.
126. Meng, J., Jiang, Y.-Z., Zhao, S., Tao, Y., Zhang, T., et al. (2022) Tumor-derived Jagged1 promotes cancer progression through immune evasion, *Cell Rep.*, **38**, 110492, doi: 10.1016/J.CELREP.2022.110492.
127. Chazaud, B. (2020) Inflammation and skeletal muscle regeneration: leave it to the macrophages! *Trends Immunol.*, **41**, 481-492, doi: 10.1016/J.IT.2020.04.006.
128. Oishi, Y., and Manabe, I. (2018) Macrophages in inflammation, repair and regeneration, *Int. Immunol.*, **30**, 511-528, doi: 10.1093/INTIMM/DXY054.
129. Velissaris, D., Zareifopoulos, N., Lagadinou, M., Platanaki, C., Tsiotsios, K., Stavridis, E. L., Kasartzian, D. I., Pierrakos, C., and Karamouzos, V. (2021) Procalcitonin and sepsis in the emergency department: an update, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **25**, 466-479, doi: 10.26355/EURREV_202101_24416.
130. Lombardo, E., and Delarosa, O. (2010) Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential, *Mediators Inflamm.*, **2010**, 865601, doi: 10.1155/2010/865601.
131. Raicevic, G., Rouas, R., Najjar, M., Stordeur, P., Id Boufker, H., Bron, D., Martiat, P., Goldman, M., Nevessignsky, M. T., and Lagneaux, L. (2010) Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells, *Hum. Immunol.*, **71**, 235-244, doi: 10.1016/J.HUMIMM.2009.12.005.

132. Wu, Q., You, L., Nepovimova, E., Heger, Z., Wu, W., Kuca, K., and Adam, V. (2022) Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape, *J. Hematol. Oncol.*, **15**, 77, doi: 10.1186/S13045-022-01292-6.
133. Newman, H., Shih, Y. V., and Varghese, S. (2021) Resolution of inflammation in bone regeneration: from understandings to therapeutic applications, *Biomaterials*, **277**, 121114, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121114.
134. Song, X., Zhang, Y., Zhang, L., Song, W., and Shi, L. (2018) Hypoxia enhances indoleamine 2,3-dioxygenase production in dendritic cells, *Oncotarget*, **9**, 11572-11580, doi: 10.18632/ONCOTARGET.24098.
135. Matheakakis, A., Batsali, A., Papadaki, H. A., and Pontikoglou, C. G. (2021) Therapeutic implications of mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles in autoimmune diseases: from biology to clinical applications, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10132, doi: 10.3390/IJMS221810132.
136. Petinati, N., Kapranov, N., Davydova, Y., Bigildeev, A., Pshenichnikova, O., Karpenko, D., Drize, N., Kuzmina, L., Parovichnikova, E., and Savchenko, V. (2020) Immunophenotypic characteristics of multipotent mesenchymal stromal cells that affect the efficacy of their use in the prevention of acute graft vs host disease, *World J. Stem Cells*, **12**, 1377-1395, doi: 10.4252/WJSC.V12.I11.1377.
137. Ara, T., and Hashimoto, D. (2021) Novel insights into the mechanism of GVHD-induced tissue damage, *Front. Immunol.*, **12**, 713631, doi: 10.3389/fimmu.2021.713631.
138. Proics, E., David, M., Mojibian, M., Speck, M., Lounnas-Mourey, N., et al. (2023) Preclinical assessment of antigen-specific chimeric antigen receptor regulatory t cells for use in solid organ transplantation, *Gene Ther.*, **30**, 309-322, doi: 10.1038/S41434-022-00358-X.
139. Alanazi, R. F., Alhwity, B. S., Almahlawi, R. M., Alatawi, B. D., Albalawi, S. A., Albalawi, R. A., Albalawi, A. A., Abdel-Maksoud, M. S., and Elsherbiny, N. (2023) Multilineage differentiating stress enduring (Muse) cells: a new era of stem cell-based therapy, *Cells*, **12**, 1676, doi: 10.3390/cells12131676.
140. Kushioka, J., Chow, S. K. H., Toya, M., Tsubosaka, M., Shen, H., Gao, Q., Li, X., Zhang, N., and Goodman, S. B. (2023) Bone regeneration in inflammation with aging and cell-based immunomodulatory therapy, *Inflamm. Regen.*, **43**, 29, doi: 10.1186/S41232-023-00279-1.
141. Akhbariyoon, H., Azizpour, Y., Esfahani, M. F., Firoozabad, M. S. M., Rad, M. R., Esfahani, K. S., Khoshavi, N., Karimi, N., Shirinisaz, A., Abedi, F., Rad, M. R., and Sharifi, P. (2021) Immune checkpoint inhibition for the treatment of cancers: an update and critical review of ongoing clinical trials, *Clin. Immunol.*, **232**, 108873, doi: 10.1016/J.CLIM.2021.108873.
142. Kong, X. (2020) Discovery of new immune checkpoints: family grows up, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1248**, 61-82, doi: 10.1007/978-981-15-3266-5_4.

IMMUNE PRIVILEGES AS A RESULT OF MUTUAL REGULATION OF THE IMMUNE AND STEM SYSTEMS

Review

D. V. Karpenko

*Laboratory of Epigenetic regulation of hematopoiesis, National Medical Research Center for Hematology,
125167 Moscow, Russia; e-mail: d_@list.ru*

The immune privileges of cancer stem cells are a well-known and widely studied problem, as the presence of such cells in tumors is associated with refractoriness, recurrence, and metastasis. Accumulating evidence also suggests the presence of immune privileges for non-pathologic stem cells in addition to their other defense mechanisms against damaging factors. This similarity between pathologic and normal stem cells raises the question of why stem cells have such a potentially damaging property. The regulation of vital processes of autoimmunity control and regeneration by interactions between immune cells, stem cells and their microenvironment are reviewed as determinants of stem cell immune privilege formation. A deep mutual integration in the regulation of stem and immune cells is noted. Based on the diversity and complexity of the mutual regulation of stem cells, their microenvironment and the immune system, I propose to use the term “stem system”.

Keywords: autoimmunity, regeneration, stem cell, cancer stem cell, stem system, immune privileges, nestin

РАЗНООБРАЗИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ТРАНСЛЯЦИОННЫХ АППАРАТОВ МИТОХОНДРИЙ

Обзор

© 2023 М.В. Балева, У.Е. Пиунова, И.В. Чичерин, С.А. Левицкий, П.А. Каменский*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: piotr.kamenski@gmail.com*

Поступила в редакцию 18.07.2023

После доработки: 25.09.2023

Принята к публикации 26.09.2023

Эволюция митохондрий протекала независимо в разных эукариотических линиях, что отражается в многообразии митохондриальных геномов и механизмов их экспрессии, наблюдаемых у разных представителей эукариот. Митохондрии утратили подавляющее большинство генов своего бактериального предка, часть из которых была перенесена в ядро, а остальные — утрачены. Таким образом, в митохондриях практически всех эукариотических клеток сохранились сравнительно небольшие геномы, а также аппараты их репликации, транскрипции и трансляции. Зависимость от ядерного генома, особенности митохондриальных транскриптов, необходимость синтеза высокогидрофобных мембранных белков привели к тому, что аппарат митохондриальной трансляции, полученный от бактериального предка, претерпел ряд существенных изменений. Он сохранил базовую структуру, необходимую для осуществления синтеза белка, но стал более специализированным и лабильным. В данном обзоре мы рассматриваем изменения, произошедшие в процессе инициации митохондриальной трансляции, а также то, как эволюция митохондрий отразилась на функциях основных факторов инициации биосинтеза белка в этих оргanelлах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, факторы инициации трансляции, регуляция трансляции, трансляция.

DOI: 10.31857/S0320972523110143, **EDN:** MPXROI

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии — двумембранные оргanelлы эукариотической клетки, предки которых относятся к альфа-протеобактериям, родственным современной группе Rickettsiales [1]. Роль митохондрий в жизнедеятельности клетки сложно переоценить: помимо дыхания, они участвуют в метаболизме аминокислот и нуклеотидов, в биогенезе липидов и железосерных (Fe/S) кластеров, являются ключевым сигнальным пунктом клетки и регуляторами апоптоза [2–4]. В результате эволюции митохондрии утратили большую часть генов своего бактериального предка, которые либо были полностью утрачены, либо перенесены в ядерный геном [5]. Подавляющее большинство белков митохондрий кодируются ядерным гено-

мом, синтезируются в цитозоле, а затем импортируются в митохондрии.

Возникновение митохондрий предшествовало разделению общего эволюционного ствола древних эукариот на ряд ветвей, давших начало новым типам. Этим может быть объяснено и существующее разнообразие митохондриальных геномов, отличающихся структурой, размером, а также организацией процессов экспрессии митохондриальных генов у разных групп эукариот. Большинство животных, за исключением некоторых артропод, моллюсков и нематод, имеют исключительно компактные митохондриальные геномы (~16 тпн) в виде кольцевой молекулы с ограниченным числом некодирующих последовательностей [6]. В то же время митохондриальные геномы растений намного больше (до нескольких сотен тпн)

Принятые сокращения: 5'-НТО — 5'-нетранслируемая область; Р-сайт — пептидилный участок; тпн — тысяча пар нуклеотидов; mtIF — митохондриальные факторы инициации; PPR — семейство пентатрикопептидных белков; SD — последовательности Шайна–Дальгарно.

* Адресат для корреспонденции.

и сильно отличаются по размеру даже у близкородственных видов [7]. Так, митохондриальный геном *Silene latifolia* состоит из всего одной хромосомы размером 253 тпн, в то время как у *Silene conica* он состоит из 128 хромосом, размер которых варьирует от 44 до 192 тпн. Интересна организация митохондриального генома у представителей отряда Trypanosomatida. Трипаносомная митохондриальная ДНК представляет собой сеть из многочисленных макси- и мини-колец, связанных по типу катенанов, причем основную генетическую информацию содержат в себе макси-кольца, а в мини-кольцах закодированы малые рРНК [8]. Митохондриальные ДНК могут кодировать транспортные и рибосомные РНК, а также белки, участвующие в репликации и экспрессии митохондриального генома, митохондриальной трансляции, а также субъединицы комплексов цепи окислительного фосфорилирования. Количество оставшихся белок-кодирующих генов также варьирует от двух (*Cox1* и *Cox3*) — у *Chromera velia* до 67 — у *Reclinomonas americana*, хотя большинство митохондриальных геномов содержат от 12 до 20 генов [5, 9]. Несмотря на небольшое количество генов, оставшихся в составе митохондриальной ДНК, митохондрии сохранили полностью функциональный аппарат для их транскрипции и трансляции, основанный на упрощенной бактериальной модели, дополненной в результате эволюции новыми чертами и факторами, уникальными для каждого вида эукариот.

ЭВОЛЮЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ РИБОСОМ

Процесс трансляции в митохондриях осуществляется особыми митохондриальными рибосомами (миторибосомами) — РНК-белковыми комплексами, которые преобразуют закодированную в мРНК генетическую информацию в белки. Подобно всем рибосомам, миторибосомы состоят из двух субъединиц: большой и малой. Данные структурного и филогенетического анализа миторибосомной РНК и миторибосомных белков указывают на то, что рибосомы митохондрий произошли от сходных органелл бактериального предшественника, альфа-протеобактериального предка митохондрий [10]. Миторибосомы крайне гетерогенны по содержанию рРНК. Общая масса рРНК в исследованных миторибосомах колеблется от 0,5 МДа у *Caenorhabditis elegans* до 1,6 МДа — у *Neurospora crassa*, что сопоставимо с массой рРНК в бактериальной рибосоме (1,4 МДа) [11]. Резкое уменьшение количества митохондриальной рРНК в основном характерно для билатеральных Metazoa, к которым относятся млекопитающие. Например, миторибосомы млекопитающих на 25–30% состоят из РНК, в то время как бактериальные рибосомы — на 60–70% [11]. В отличие от бактериальных и цитоплазматических рибосом, миторибосомы большинства организмов утратили 5S рРНК, но у некоторых организмов она сохранилась. По данным структурных исследований, 5S рРНК была обнаружена в составе миторибосом *Arabidopsis thaliana* [12], также неканонические 5S рРНК обнаруживаются у *Chlamydomonas reinhardtii* [13] и *Plasmodium falciparum* [14]. У млекопитающих в состав большой субъединицы миторибосом входят митохондриальные тРНК^{Val} или тРНК^{Phe}, занимающие место 5S рРНК [15].

Эволюция митохондриальных рРНК происходила в разных направлениях: как дегенерации, так и экспансии. Например, РНК большой субъединицы дрожжевой рибосомы характеризуется появлением значительных дополнительных участков по сравнению с бактериальной 16S рРНК. Все эти участки располагаются на периферии, некоторые из них участвуют в формировании «ножки» для ассоциации миторибосомы дрожжей с поверхностью внутренней митохондриальной мембраны [16]. Реорганизация рРНК в ходе эволюции привела к тому, что часть бактериальных белков была утрачена миторибосомой. Так, редукция петель h8, h9 и h44 в 18S рРНК малой субъединицы миторибосомы *Arabidopsis* привела к потере рибосомного белка S20. Удаление 5S рРНК у дрожжей совпало с потерей белков большой субъединицы bL25m и uL18m [9]. В целом, в процессе эволюции митохондриальная рибосома увеличила белковую массу в большинстве эукариотических линий.

Часть миторибосомных белков — гомологов рибосомных белков бактерий, имеют значительно большую массу или характеризуются наличием N- или C-концевых удлинений. Иногда это связано с компенсацией потери структурных доменов рРНК и необходимостью стабилизации структуры рибосомы. Многие эволюционно новые миторибосомные белки были рекрутированы из цитоплазмы. Чаще всего они не входят в состав кора миторибосомы, а располагаются преимущественно на периферии [11, 17]. Часть из этих белков, например mS39, mL41 и mL46, являются консервативными среди эукариот, в то время как другие белки можно отнести к видоспецифичным [18]. Нередки примеры бифункцио-

нальности некоторых приобретенных митохондриальных белков. Например, белок малой субъединицы mS29 является участником апоптоза, индуцируемого Dap3, а также способен проявлять GTPазную активность [19].

Вероятно, такое разнообразие митохондриальных рибосом определяется описанным выше разнообразием геномов митохондрий и отражает их специализацию к биосинтезу небольшого количества митохондриально кодируемых белков.

СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ИНИЦИИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Большинство митохондриальных белок-кодирующих генов несут в себе информацию о первичной структуре субъединиц комплексов цепи окислительного фосфорилирования. Однако большая часть субъединиц этих комплексов кодируется в ядре, синтезируется в перимитохондриальных областях цитозоля и импортируется в митохондрии. Для корректной сборки комплексов необходима четкая взаимная координация митохондриальной трансляции и биосинтеза митохондриальных белков в цитозоле. По всей видимости, ключевой стадией такой регуляции является инициация трансляции, которая в митохондриях существенно отличается от бактериальной.

Трансляция у бактерий начинается с привлечения мРНК к малой рибосомной субъединице и правильного позиционирования стартового кодона, за эти процессы отвечают факторы инициации IF1, IF2 и IF3. Фактор IF3 связывается с малой рибосомной субъединицей, предотвращая ее реассоциацию с 50S-субъединицей и формируя пул свободных 30S-субъединиц, необходимых для инициации трансляции [20]. Фактор IF1 блокирует А-сайт малой субъединицы рибосомы, способствуя позиционированию инициаторной тРНК в пептидилный участок (Р-сайт). Далее тройственный комплекс, состоящий из IF2, GTP и инициаторной аминоксил-тРНК (fMet-тРНК), связывается с малой рибосомной субъединицей. Благодаря узнаванию последовательности Шайна–Дальгарно (SD) в составе мРНК последовательностью анти-Шайна–Дальгарно (анти-SD) 16S рРНК происходит позиционирование стартового кодона в Р-сайте рибосомы. IF2 в комплексе с GTP способствует установке инициаторной тРНК в Р-сайт. При этом IF3 дискриминирует элонгаторную тРНК и стимулирует образование преинициаторного комплекса, увеличивая скорость

кодон-антикодового взаимодействия. Также IF3 способствует диссоциации псевдо-инициаторных комплексов (содержащих отличную от инициаторной тРНК) и неканонических инициаторных комплексов (содержащих стартовый кодон, отличный от AUG, GUG и UUG). Формирование правильного кодон-антикодового взаимодействия приводит к ассоциации субъединиц 30S и 50S, диссоциации IF3, гидролизу GTP фактором IF2 и высвобождению факторов IF2 и IF1 [21].

Помимо описанного канонического способа, у бактерий существует еще два механизма инициации трансляции (рис. 1). Один из них — «сквозное прочтение» («readthrough»), заключается в том, что после терминации трансляции первого цистрона на полицистронной мРНК рибосома не диссоциирует на субъединицы, а продолжает сканирование мРНК до следующего стартового кодона [22]. Важную роль в инициации по данному механизму играет фактор IF3.

Помимо мРНК с 5'-нетранслируемой областью (5'-НТО), в составе которой есть последовательность SD, у бактерий есть и так называемые безлидерные мРНК, лишенные 5'-НТО [23]. У таких мРНК стартовый кодон находится непосредственно на 5'-конце или на небольшом расстоянии от него. В этом случае трансляция начинается путем связывания стартового кодона ассоциированной 70S-рибосомой. Результаты *in vitro* исследований указывают на то, что при данном механизме факторы инициации не играют важной роли, но их наличие оказывает стимулирующее воздействие на инициацию трансляции, а в случае некоторых мРНК они все же оказываются необходимыми [24].

Отличительной особенностью митохондриальных мРНК является использование стартовых кодонов, отличных от AUG [25]. Так, в случае млекопитающих синтез субъединицы 2 NADH-дегидрогеназы (ND2) начинается с AUU, а синтез ND1, ND3 и ND5 — с AUA. Все митохондриальные мРНК млекопитающих характеризуются очень короткой, всего 1–3 нуклеотида, 5'-НТО или полным ее отсутствием, в то время как мРНК митохондрий дрожжей и растений характеризуются протяженными 5'-концевыми удлинениями [26]. Кроме того, все митохондриальные мРНК и рРНК малой рибосомной субъединицы не содержат последовательностей SD и анти-SD [27]. Все эти особенности митохондриальных мРНК указывают на то, что процесс инициации трансляции в митохондриях должен отличаться от канонического для бактерий.

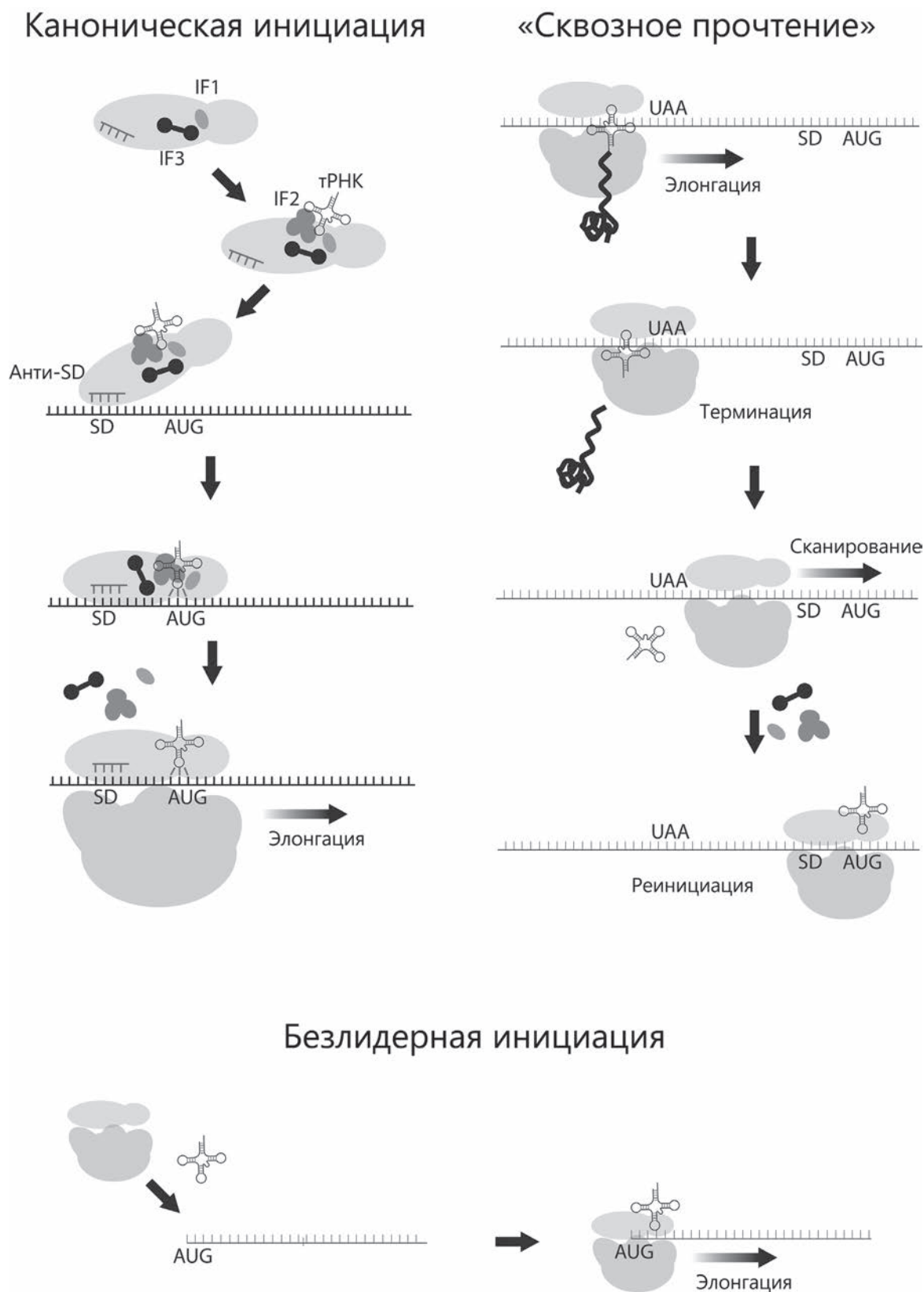


Рис. 1. Инициация трансляции у бактерий. У бактерий в основе инициации трансляции могут лежать три механизма. При канонической инициации последовательность Шайна–Дальгарно (SD) узнается последовательностью анти-Шайна–Дальгарно (anti-SD), входящей в состав 16S рРНК. Рибосома может не диссоциировать после прочтения стоп-кодона (UAA) на субъединицы, а продолжить сканирование, пока не найдет следующий стартовый (AUG) кодон. В случае безлидерных мРНК целая рибосома иницирует трансляцию, хотя механизм узнавания стартового кодона не ясен

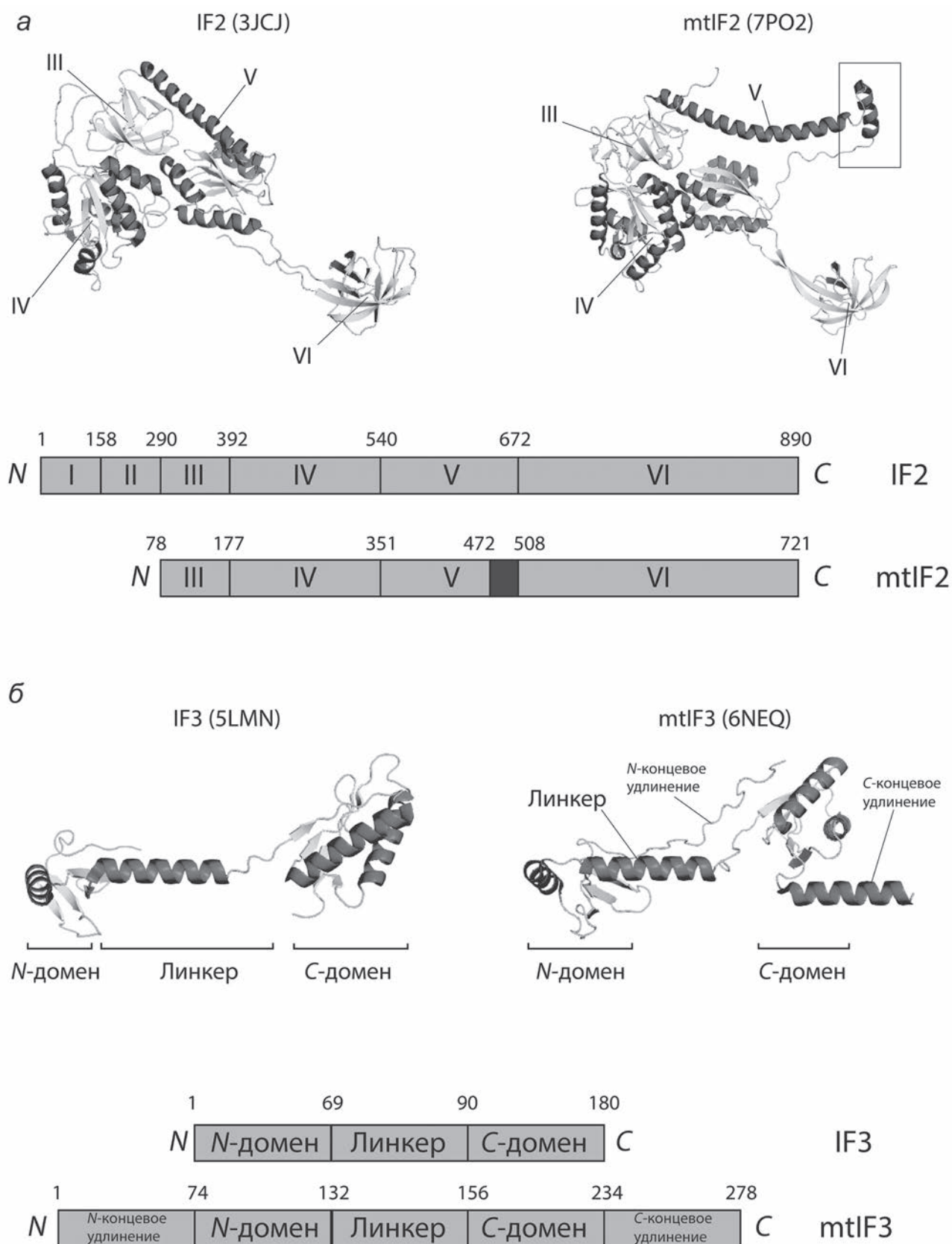


Рис. 2. Доменная организация и структура бактериальных факторов инициации и их гомологов из митохондрий млекопитающих. *а* – Структуры бактериального IF2 (PDB ID: 3JCJ) и митохондриального mtIF2 (PDB ID: 7PO2). Митохондриальный mtIF2 характеризуется отсутствием двух *N*-концевых доменов и наличием вставки между V и VI доменами, взаимодействующей с А-сайтом рибосомы, подобно бактериальному IF1 (отмечена квадратным выделением). *б* – Структуры бактериального IF3 (PDB ID: 5LMN) и митохондриального mtIF3 (PDB ID: 6NEQ)

В первую очередь различия наблюдаются в количестве факторов инициации и их функциях. Роль фактора IF2 является ключевой в процессе инициации трансляции у бактерий. Он специфически связывает инициаторную fMet-тРНК и правильно позиционирует ее в Р-сайте малой субъединицы, увеличивая скорость и точность инициации трансляции [28]. Это единственный фактор инициации, для которого были обнаружены гомологи в митохондриях всех эукариот. Бактериальный IF2 состоит из дивергентных N-концевых доменов I и II, участвующих в связывании с малой рибосомной субъединицей, домена III, функция которого не ясна, высококонсервативного домена IV, обладающего GTPазной активностью, и двух C-концевых доменов (V и VI). Митохондриальные факторы инициации 2 (mtIF2) лишены первых двух доменов, однако сохранили в остальном схожую с бактериальным доменную структуру, имея в своем составе домены III–VI (рис. 2, а). Следует подчеркнуть, что в отличие от бактериального IF2, у которого только два N-концевых домена влияют на связывание с малой субъединицей рибосомы, для эффективного взаимодействия mtIF2 с 28S-субъединицей митоторибосомы млекопитающих необходимо сохранение интактной мультидоменной структуры фактора [29]. Также митохондриальные IF2 имеют вставку между доменами V и VI, длина и последовательность которой отличается у разных видов. Эта вставка взаимодействует с А-сайтом рибосомы подобно бактериальному IF1, гомологов которого в митохондриях обнаружить не удалось [30]. Таким образом, функции бактериальных факторов IF1 и IF2 в митохондриях выполняются mtIF2, что также подтверждается тем, что mtIF2 может заменить IF1 и IF2 в клетках *Escherichia coli* [31], и данными структурных исследований взаимодействия mtIF2 с рибосомой *E. coli* [32]. Несмотря на функциональную и структурную схожесть, механизм действия бактериального IF2 и митохондриального mtIF2 может отличаться. Так, в митохондриях млекопитающих инициация трансляции безлидерных мРНК, как и у бактерий, может осуществляться целой рибосомой, но mtIF2, вероятно, играет важную роль в этом процессе [33]. Так, делеция в гене, кодирующем mtIF2 в клетках линии HEK293T, приводит к полной остановке митохондриальной трансляции.

Совершенно отличная ситуация характерна для дрожжей. Хотя механизм инициации трансляции в митохондриях дрожжей до сих пор остается неясным, роль mtIF2 в нем может

варьировать в зависимости от вида. Например, делеция гена *mtIF2* у *Schizosaccharomyces pombe* приводит к снижению эффективности трансляции всех мРНК [34], а у *Saccharomyces cerevisiae* – всех, кроме *Cytb* и *Atp9* [35].

Митохондриальный фактор инициации трансляции 3 (mtIF3) характеризуется низкой степенью гомологии как между разными видами, так и по отношению к бактериальному IF3 (20–25% гомологии). Тем не менее данные *in vitro* исследований указывают на то, что mtIF3 функционально схож с бактериальным IF3 [36]. Митохондриальный mtIF3, подобно бактериальному IF3, состоит из двух доменов N и C, соединенных линкером, но имеет дополнительные удлинения на обоих концах протяженностью приблизительно 30 а.о. (рис. 2, б). В отличие от бактериального IF3, у которого с 30S-рибосомой связывается только C-домен [37], оба домена mtIF3 млекопитающих связываются с 28S малой субъединицей митоторибосомы, а концевые удлинения препятствуют присоединению 39S большой субъединицы [38, 39]. Удаление концевых удлинений влияет на функции mtIF3 млекопитающих: удаление C-концевого удлинения нарушает способность mtIF3 дестабилизировать неканонические или псевдо-инициаторные комплексы в трансляционной системе *E. coli*, а удаление N-концевого удлинения многократно увеличивает сродство фактора к 39S-субъединице.

У дрожжей *Sac. cerevisiae* удаление концевых удлинений у Aim23p, дрожжевого митохондриального гомолога IF3, приводит к потере функциональной активности белка, вызывая фенотип, аналогичный полной делеции белка [40]. Подобные данные указывают на то, что механизмы действия белков Aim23p и mtIF3 млекопитающих (гомологов IF3) отличаются, несмотря на общность функций. Доказательством этому могут служить и данные по исследованию делеций генов данных белков. Делеция гена, кодирующего IF3 в бактериях *E. coli*, летальна [41]. Результаты делеции генов митохондриальных факторов, гомологичных IF3, у различных организмов разнятся. Так, делеция гена, кодирующего mtIF3 у дрожжей *Sch. pombe*, никак не влияет ни на рост клеток, ни на митохондриальную трансляцию [34]. В то же время делеция гена, кодирующего Aim23 в клетках дрожжей *Sac. cerevisiae*, приводит к нарушению роста клеток на средах с несбраживаемым источником углерода, что указывает на снижение митохондриальной функции. Однако возникновение митохондриальной дисфункции в этом

случае не связано со снижением эффективности трансляции, а определяется ее разбалансировкой: происходит значительное снижение синтеза компонентов цитохром *c*-оксидазного комплекса и увеличение синтеза компонентов АТР-синтазы [42]. В дальнейшем было показано, что, по крайней мере в случае биосинтеза белка *Cox2*, подобный эффект может быть объясним тем, что Aim23p взаимодействует с белком Pet111 [43], который усиливает эффективность трансляции мРНК *Cox2*. Делеция в гене, кодирующем mtIF3 в некоторых линиях клеток человека, также приводит к митохондриальной дисфункции в результате снижения синтеза белка *Atp6* [33, 44]. Стоит отметить, что несмотря на незначительное влияние mtIF3 на митохондриальную трансляцию в клеточных линиях, делеция в гене *mtIF3* на уровне организма у млекопитающих летальна: гомозиготные мыши, нокаутные по гену *mtIF3*, умирают на стадии эмбриона, в то время как гетерозиготные особи характеризуются развитием у них прогрессирующей кардиомиопатии. Исследование профиля митохондриальной трансляции в клетках сердечных мышц таких животных выявляет снижение уровня синтеза белка ND3 [45]. Суммируя вышеприведенные данные, mtIF3 можно рассматривать как тканеспецифический регулятор трансляции определенных мРНК в митохондриях млекопитающих, хотя механизм его действия остается неясным. В случае бицистронной мРНК *Atp8–Atp6*, mtIF3 может участвовать в «readthrough» инициации, подобно бактериальному IF3. В подтверждение этому предположению недавно проведенный анализ распределения рибосом на митохондриальных мРНК в клетках линии HEK293, нокаутной по гену *mtIF3*, выявил изменение загрузки мРНК миторибосомами на бицистронной матрице *Atp8–Atp6*: снижение количества рибосом на участке, соответствующем области кодирования белка *Atp6*, и увеличение — на участке кодирования белка *Atp8* [33].

Таким образом, можно заключить, что митохондрии унаследовали от своего бактериального предшественника набор факторов инициации трансляции. Они сохранили большинство своих изначальных «бактериальных» функций, что подтверждается данными различных исследований, проведенных преимущественно на гетерологичных системах. Тем не менее эти факторы могли приобрести дополнительные функции, связанные с ходом эволюции мРНК, митохондриального генетического кода и миторибосом.

СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕКРУТИРОВАНИЯ мРНК

На первых этапах инициации трансляции мРНК рекрутируется рибосомой для выбора стартового кодона. У бактерий в основе этого процесса лежит механизм комплементарного взаимодействия между последовательностью SD, расположенной перед стартовым кодоном, и последовательностью анти-SD 16S рРНК. Все митохондриальные мРНК эукариот лишены последовательности SD, а у некоторых из них также нет и 5'-НТО, которые могли бы участвовать в фактор-зависимой регуляции выбора стартового кодона.

Наличие у митохондриальных мРНК пекарских дрожжей протяженных 5'-концевых удлинений при отсутствии специфических сайтов посадки рибосом должно создавать трудности при выборе стартового кодона. Подобная проблема в цитоплазматической трансляции решается тем, что преинициаторный комплекс связывается с экзпированным 5'-концом мРНК и сканирует 5'-НТО в поисках стартового кодона [46]. В митохондриях нет факторов для реализации подобного сканирующего механизма, а мРНК не экзипированы. Вместо этого у дрожжей есть набор так называемых трансляционных активаторов (см. таблицу), которые связываются с 5'-нетранслируемыми областями и миторибосомными субъединицами [47, 48], способствуя выбору правильного стартового кодона. Данные криоэлектронной микроскопии указывают на то, что область рядом с туннелем выхода пептида на миторибосоме дрожжей может служить некой общей платформой для различных активаторов [49]. Большая часть этих трансляционных активаторов относится к семейству пентатрикопептидных (PPR) белков, которые характеризуются РНК-связывающей способностью.

Все закодированные в митохондриальном геноме *Sac. cerevisiae* белки, за исключением Var1, являются коровыми компонентами комплексов цепи окислительного фосфорилирования, необходимой для обеспечения энергетических потребностей клетки [58]. Помимо митохондриально закодированных белков, в состав комплексов цепи окислительного фосфорилирования входят продукты цитоплазматической трансляции, поэтому сборка этих комплексов требует очень тонкой настройки, с одной стороны, но и достаточной пластичности — с другой, чтобы обеспечить адаптацию к быстро меняющимся энергетическим потребностям клетки. Для этого некоторые трансляционные активаторы создают петли обратной

Трансляционные активаторы в митохондриях *Saccharomyces cerevisiae*

Регулируемая мРНК	Активатор	PPR	Механизм действия	Гомолог <i>Homo sapiens</i>
<i>Cox1</i>	Pet309	PPR+	Pet309 связывает 5'-НТО мРНК <i>Cox1</i> , способствуя синтезу полноразмерного белка <i>Cox1</i> [50]; делеция гена <i>Pet309</i> приводит к прекращению синтеза белка <i>Cox1</i> ;	LRPPRC
	Mss51	PPR—	правильное связывание рибосомы на мРНК регулирует так же белок Mss51; делеция гена <i>Mss51</i> приводит к изменению характера взаимодействия Pet309 с мРНК и синтезу нового белка (15 кДа) [51]	Zmynd17
<i>Cox2</i>	Pet111	PPR+	связывает мРНК <i>Cox2</i> в двух сайтах (ближе к 5'-концу и недалеко от стартового кодона), предотвращая образование вторичных структур, ингибирующих трансляцию [52]	—
<i>Cox3</i>	Pet54 Pet122 Pet494	PPR—	Pet54 непосредственно связывается с 5'-НТО мРНК <i>Cox3</i> , способствуя формированию «активационного» комплекса Pet122–Pet54–Pet494 для эффективного синтеза белка <i>Cox3</i> [53, 54]	—
		PPR—		—
		PPR—		—
<i>Cytb</i>	Cbs1 Cbs2 Cbp1 Cbp3 Cbp6	PPR—	Cbs1 связывается с 5'-НТО мРНК <i>Cytb</i> , способствуя дальнейшему ее связыванию с большой субъединицей рибосомы в присутствии Cbs2 и Cbp1; при этом Cbs1 оказывает ингибирующее действие, препятствуя началу трансляции; блок трансляции снимается тогда, когда Cbs1 вытесняется из комплекса мРНК–рибосома белками Cbp3–Cbp6[55]	—
		PPR—		—
		PPR+		—
		PPR—		UQCC1
		PPR—		UQCC2
<i>Atp6/8</i>	Atp22	PPR+	хотя <i>Atp6</i> и <i>Atp8</i> находятся в составе бицистронного транскрипта, делеция гена, кодирующего Atp22, влияет на синтез только белка Atp6 [56]; механизм влияния Atp22 на трансляцию мРНК <i>Atp6</i> не ясен	—
<i>Atp9</i>	Aep1/Nca1 Aep2/Atp13	PPR+	механизм действия факторов неясен [56]	—
		PPR+		—
<i>Var1</i>	Sov1	PPR+	Sov1 связывает мРНК <i>Var1</i> благодаря наличию PPR-доменов, обеспечивая ее эффективную трансляцию; механизм действия неясен [57]	—

связи, которые координируют синтез митохондриальных полипептидов и сборку функционально активных комплексов дыхательной цепи. Так, например, синтез апоцитохрома *b* зависит сразу от пяти активаторов: Cbs1, Cbs2, Cbp1, Cbp3 и Cbp6. При этом Cbs1, Cbs2 и Cbp1 связывают 5'-НТО мРНК *Cytb* и рекрутируют ее к большой субъединице миторибосомы, связываясь с выходным туннелем. Далее Cbs1, связанный с 5'-НТО мРНК *Cytb*, вытесняется комплексом Cbp3–Cbp6. Таким образом, 5'-НТО мРНК становится способной связаться с малой субъединицей миторибосомы для инициации трансляции. Новосинтезированный белок связывается с комплексом Cbp3–Cbp6, который

участвует в сборке комплекса коэнзим Q–цитохром *c* редуктазы [55]. Подобным образом регулируется и синтез субъединицы цитохром *c*-оксидазы *Cox1* в пекарских дрожжах. Так, трансляционный активатор Pet309 связывает 5'-НТО мРНК *Cox1* в присутствии белка Mss51. Далее, Mss51 в комплексе с другими факторами связывает новосинтезированный белок и участвует в сборке цитохром *c*-оксидазы [59]. При нарушениях сборки происходит накопление незрелых интермедиатов, ассоциированных с Mss51, в результате чего уменьшается пул свободного Mss51, что приводит, в свою очередь, к снижению эффективности инициации трансляции мРНК *Cox1* [60].

У млекопитающих митохондриальные мРНК безлидерные: почти все они содержат стартовый кодон непосредственно на 5'-конце. Согласно данным криоэлектронной микроскопии, в связывании этих мРНК участвует белок малой рибосомной субъединицы mS39, расположенный у входа в туннель для мРНК. Своим пентатрикопептидным доменом mS39 связывает мРНК в U-богатом участке в непосредственной близости от седьмого кодона мРНК. Подобный участок достаточно консервативен у большинства из 11 мРНК млекопитающих [30]. Кроме того, для эффективного связывания мРНК митохондриальная рибосома млекопитающих взаимодействует с комплексом белков LRPPRC–SLIRP. Этот комплекс связывается с миторибосомным белком mS39, обеспечивая рекрутирование мРНК и регулируя скорость ее трансляции. Таким образом, комплекс LRPPRC–SLIRP может являться универсальным активатором трансляции в митохондриях млекопитающих [61, 62]. Также более тонкую регуляцию трансляции у млекопитающих, как и у дрожжей, обеспечивают специфические белки-активаторы. Первым найденным белком с такой функцией стал TACO1. Мутации в гене этого белка, обнаруженные у некоторых пациентов, связаны с развитием синдрома Лея и нарушением функции цитохром *c*-оксидазного комплекса. Последнее связано со специфичным влиянием TACO1 на синтез митохондриально кодируемого белка *Cox1* [63], корового компонента цитохром *c*-оксидазы. Было показано, что TACO1 имеет несколько участков связывания в 5'-области мРНК *Cox1*, а также имеет сродство к митохондриальной рибосоме, преимущественно связываясь с малой субъединицей, но в меньшей степени взаимодействуя и с ассоциированной миторибосомой [64]. Таким образом, TACO1 может способствовать рекрутированию мРНК *Cox1* к рибосоме, регулируя инициацию трансляции, а также может оказывать влияние и на стадию элонгации.

Еще одним белком — активатором трансляции в митохондриях млекопитающих, является PTCD2, для которого было показано, что он способен специфически регулировать синтез субъединицы *Cox3* цитохром *c*-оксидазного комплекса [65]. Было показано, что PTCD2 ассоциирован с моносомой, что может указывать на то, что его механизм регуляции также основан на привлечении мРНК *Cox3* к митохондриальной рибосоме. Активаторы других мРНК в митохондриях млекопитающих к настоящему времени не выявлены.

Подобно дрожжевым, мРНК растений имеют выраженные 5'-НТО. Около половины растительных мРНК имеет A-богатую последовательность (AхAAA), расположенную на 19 нуклеотидов выше стартового AUG. В узнавании данной последовательности может участвовать миторибосомный белок mS83, относящийся к семейству PPR [12]. Тем не менее наличие ряда митохондриальных мРНК без последовательности AхAAA предполагает существование альтернативных механизмов рекрутирования мРНК в митохондриях растений. Так, в состав митохондриальных рибосом растений входят многочисленные PPR-белки, при том что у дрожжей нет ни одного миторибосомного белка, принадлежащего семейству PPR, а у млекопитающих их всего два — mS39 и mS27. Большинство миторибосомных PPR-белков растений выполняют только структурную роль, за исключением рибосомного белка PPR1, делеция по гену которого существенно влияет на трансляцию всех митохондриальных мРНК [66]. Тем не менее не исключено, что какие-то PPR-белки, входящие в состав миторибосомы, могут выполнять роль трансляционных активаторов, подобно активаторам дрожжей и млекопитающих. Вероятными кандидатами для роли трансляционных активаторов могут служить белки из семейства Rf-PPR, в частности, недавно описанный RFL8. Этот белок специфически активирует трансляцию мРНК *ccmFN2*, кодирующую одну из цепей гем-лиазного комплекса [67].

СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ ДЛЯ СИНТЕЗА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Гены, которые практически всегда присутствуют в митохондриальной ДНК, кодируют основные компоненты дыхательной цепи: субъединицы ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 и ND6 NADH-дегидрогеназы; апоцитохром *b* — коэнзим Q—цитохром *c* редуктазы; *Cox1*, *Cox2* и *Cox3* — цитохром *c*-оксидазы, а также субъединицы Atp6 и Atp9 АТФ-синтазы. Тем не менее бывают исключения. Так, у дрожжей произошла полная потеря комплекса NADH-дегидрогеназы и, следовательно, соответствующих митохондриальных генов [68].

Митохондриально кодируемые субъединицы дыхательной цепи являются крайне гидрофобными белками, синтез которых требует сопряжения со встройкой растущего полипептида во внутреннюю митохондриальную мембрану [69]. Эволюция митохондриального

генома шла по пути увеличения процента генов гидрофобных белков в его составе, что привело к соответствующей специализации миторибосом. Ряд существенных изменений претерпел туннель выхода растущего полипептида [70]. У миторибосом млекопитающих он выстлан белками с более гидрофобными, в сравнении с бактериальными рибосомами, аминокислотами в составе для создания условий корректного фолдинга. Туннель большой субъединицы миторибосом пекарских дрожжей характеризуется наличием двух уникальных адаптаций. Во-первых, вход в туннель сужается из-за образования дополнительной пары оснований в 21S рРНК, а во-вторых, имеется митохондриально-специфическое расширение белка uL23m, приводящее к изгибу выходного туннеля. Миторибосомы связаны с внутренней мембраной митохондрий. У млекопитающих мембранным «якорем» выступает белок mL45 [30], расположенный в области выхода растущего пептида из туннеля на большой субъединице рибосомы. У дрожжей прикрепление миторибосом к мембране осуществляет белок Mba1 и 96-й сегмент рРНК большой субъединицы [71].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все процессы в митохондриях зависят от белков, которые кодируются ядерным геномом. Кроме этого, процесс трансляции в митохондриях связан со сборкой и функционированием цепи окислительного фосфорилирования. Резонно предполагать, что процессы митохондриальной трансляции должны были адаптироваться к эволюционным изменениям как митохондриального, так и ядерного геномов, а также эволюции дыхания [11]. Подобная адаптация привела к формированию особых митохондриальных рибосом, специализированных для синтеза гидрофобных белков, а также возникновению особых процессов регуляции для обеспечения адаптации синтеза белка к метаболическому статусу клетки.

Эволюция процессов регуляции привела к возникновению факторов, которые влияют на синтез конкретной мРНК. Наличие подобных факторов регуляции, располагающихся на периферии миторибосом, позволяет предположить существование отдельных субпопуляций миторибосом, специализированных для бисинтеза конкретных митохондриально кодируемых белков или их групп. Явление специализации известно для цитоплазматических рибосом [72, 73], хотя в этом случае оно достигается либо внесением модификаций в рРНК или рибосомные белки, либо использованием различных паралофов рибосомных белков.

Факторы регуляции трансляции митохондриальных мРНК не только формируют петли обратной связи, но и участвуют в рекрутировании мРНК к рибосоме, а также определяют выбор стартового кодона. Возможно, расширение функций факторов регуляции привело и к изменению роли факторов инициации трансляции: их универсальные функции стали менее востребованы.

Тем не менее подобные предположения можно сделать лишь для некоторых хорошо изученных объектов, таких как дрожжи или млекопитающие. В то же время для большинства организмов устройство аппарата митохондриальной трансляции остается загадкой.

Вклад авторов. М.В. Балева, У.Е. Пиунова — анализ литературы; М.В. Балева, И.В. Чичерин — написание текста; С.А. Левицкий, П.А. Каменский — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00008).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andersson, S. G. E., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., Näslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H., and Kurland, C. G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria, *Nature*, **396**, 133-140, doi: 10.1038/24094.
2. Read, A. D., Bentley, R. E., Archer, S. L., Dunham-Snary, K. J. (2021) Mitochondrial iron-sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology, *Redox Biol.*, **47**, 102164, doi: 10.1016/j.redox.2021.102164.
3. Kastaniotis, A. J., Autio, K. J., Kerätär, J. M., Monteuiis, G., Mäkelä, A. M., Nair, R. R.,

- Pietikäinen, L. P., Shvetsova, A., Chen, Z., and Hiltunen, J. K. (2017) Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1862**, 39-48, doi: 10.1016/j.bbalip.2016.08.011.
4. De Vitto, H., Arachchige, D. B., Richardson, B. C., and French, J. B. (2021) The intersection of purine and mitochondrial metabolism in cancer, *Cells*, **10**, 2603, doi: 10.3390/cells10102603.
5. Sloan, D. B., Warren, J. M., Williams, A. M., Wu, Z., Abdel-Ghany, S. E., Nair, R. R., Pietikäinen, L. P., Shvetsova, A., Chen, Z., and Hiltunen, J. K. (2018) Cytonuclear integration and co-evolution, *Nat. Rev. Genet.*, **19**, 635-648, doi: 10.1038/s41576-018-0035-9.
6. Boore, J. L. (1999) Animal mitochondrial genomes, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1767-1780, doi: 10.1093/nar/27.8.1767.
7. Gualberto, J. M., Milesina, D., Wallet, C., Niazi, A. K., Weber-Lotfi, F., and Dietrich, A. (2014) The plant mitochondrial genome: Dynamics and maintenance, *Biochimie*, **100**, 107-120, doi: 10.1016/j.biochi.2013.09.016.
8. Callejas-Hernández, F., Herreros-Cabello, A., del Moral-Salmoral, J., Fresno, M., and Gironès, N. (2021) The complete mitochondrial DNA of *Trypanosoma cruzi*: maxicircles and minicircles, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **11**, 672448, doi: 10.3389/fcimb.2021.672448.
9. Petrov, A. S., Wood, E. C., Bernier, C. R., Norris, A. M., Brown, A., and Amunts, A. (2019) Structural patching fosters divergence of mitochondrial ribosomes, *Mol. Biol. Evol.*, **36**, 207-219, doi: 10.1093/molbev/msy221.
10. Gray, M. W. (2015) Mosaic nature of the mitochondrial proteome: implications for the origin and evolution of mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10133-10138, doi: 10.1073/pnas.1421379112.
11. Van Der Sluis, E. O., Bauerschmitt, H., Becker, T., Mielke, T., Frauenfeld, J., Berninghausen, O., Neupert, W., Herrmann, J. M., and Beckmann, R. (2015) Parallel structural evolution of mitochondrial ribosomes and OXPHOS complexes, *Genome Biol. Evol.*, **7**, 1235-1251, doi: 10.1093/gbe/evv061.
12. Waltz, F., Soufari, H., Bochler, A., Giegé, P., and Hashem, Y. (2020) Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome, *Nat. Plants*, **6**, 377-383, doi: 10.1038/s41477-020-0631-5.
13. Waltz, F., Salinas-Giegé, T., Englmeier, R., Meichel, H., Soufari, H., Kuhn, L., Pfeffer, S., Förster, F., Engel, B. D., Giegé, P., Drouard, L., and Hashem, Y. (2021) How to build a ribosome from RNA fragments in *Chlamydomonas* mitochondria, *Nat. Commun.*, **12**, 7176, doi: 10.1038/s41467-021-27200-z.
14. Feagin, J. E., Harrell, M. I., Lee, J. C., Coe, K. J., Sands, B. H., Cannone, J. J., Tami, G., Schnare, M. N., and Gutell, R. R. (2012) The fragmented mitochondrial ribosomal RNAs of *Plasmodium falciparum*, *PLoS One*, **7**, e38320, doi: 10.1371/journal.pone.0038320.
15. Chrzanowska-Lightowlers, Z., Rorbach, J., and Minczuk, M. (2017) Human mitochondrial ribosomes can switch structural tRNAs – but when and why? *RNA Biol.*, **14**, 1668-1671, doi: 10.1080/15476286.2017.1356551.
16. Amunts, A., Brown, A., Bai, X., Llácer, J. L., Hussain, T., Emsley, P., Long, F., Murshudov, G., Scheres, S. H. W., and Ramakrishnan, V. (2014) Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit, *Science*, **343**, 1485-1489, doi: 10.1126/science.1249410.
17. Smits, P., Smeitink, J. A. M., van den Heuvel, L. P., Huynen, M. A., and Ettema, T. J. G. (2007) Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4686-4703, doi: 10.1093/nar/gkm441.
18. Scaltsoyiannes, V., Corre, N., Waltz, F., and Giegé, P. (2022) Types and functions of mitoribosome-specific ribosomal proteins across eukaryotes, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3474, doi: 10.3390/ijms23073474.
19. Koc, E. C., Ranasinghe, A., Burkhart, W., Blackburn, K., Koc, H., Moseley, A., and Spremulli, L. L. (2001) A new face on apoptosis: death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins, *FEBS Lett.*, **492**, 166-170, doi: 10.1016/S0014-5793(01)02250-5.
20. Hussain, T., Llácer, J. L., Wimberly, B. T., Kieft, J. S., and Ramakrishnan, V. (2016) Large-scale movements of IF3 and tRNA during bacterial translation initiation, *Cell*, **167**, 133-144.e13, doi: 10.1016/j.cell.2016.08.074.
21. Laursen, B. S., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K., and Sperling-Petersen, H. U. (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 101-123, doi: 10.1128/mmbr.69.1.101-123.2005.
22. Yamamoto, H., Wittek, D., Gupta, R., Qin, B., Ueda, T., Krause, R., Yamamoto, K., Albrecht, R., Pech, M., and Nierhaus, K. H. (2016) 70S-scanning initiation is a novel and frequent initiation mode of ribosomal translation in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E1180-E1189, doi: 10.1073/pnas.1524554113.
23. Zheng, X., Hu, G.-Q., She, Z.-S., and Zhu, H. (2011) Leaderless genes in bacteria: clue to the evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes, *BMC Genomics*, **12**, 361, doi: 10.1186/1471-2164-12-361.
24. Leiva, L. E., and Katz, A. (2022) Regulation of Leaderless mRNA Translation in Bacteria, *Microorganisms*, **10**, 723, doi: 10.3390/microorganisms10040723.
25. Temperley, R. J., Wydro, M., Lightowlers, R. N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010) Human mitochondrial mRNAs – like members of all families, similar but different, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1081-1085, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.036.
26. Kazama, T., Yagi, Y., Toriyama, K., and Nakamura, T. (2013) Heterogeneity of the 5'-end in plant mRNA

- may be involved in mitochondrial translation, *Front. Plant Sci.*, **4**, 517, doi: 10.3389/fpls.2013.00517.
27. Soto, I., Couvillion, M., Hansen, K. G., McShane, E., Moran, J. C., Barrientos, A., and Churchman, L. S. (2022) Balanced mitochondrial and cytosolic translatomes underlie the biogenesis of human respiratory complexes, *Genome Biol.*, **23**, 170, doi: 10.1186/s13059-022-02732-9.
 28. Marzi, S., Knight, W., Brandi, L., Caserta, E., Soboleva, N., Hill, W. E., Gualerzi, C. O., and Lodmell, J. S. (2003) Ribosomal localization of translation initiation factor IF2, *RNA*, **9**, 958-969, doi: 10.1261/rna.2116303.
 29. Spencer, A. C., and Spemulli, L. L. (2005) The interaction of mitochondrial translational initiation factor 2 with the small ribosomal subunit, *Biochim. Biophys. Acta*, **1750**, 69-81, doi: 10.1016/j.bbapap.2005.03.009.
 30. Kummer, E., Leibundgut, M., Rackham, O., Lee, R. G., Boehringer, D., Filipovska, A., and Ban, N. (2018) Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM, *Nature*, **560**, 263-267, doi: 10.1038/s41586-018-0373-y.
 31. Gaur, R., Grasso, D., Datta, P. P., Krishna, P. D. V., Das, G., Spencer, A., Agrawal, R. K., Spemulli, L., and Varshney, U. (2008) A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors, *Mol. Cell*, **29**, 180-190, doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.021.
 32. Yassin, A. S., Haque, Md. E., Datta, P. P., Elmore, K., Banavali, N. K., Spemulli, L. L., and Agrawal, R. K. (2011) Insertion domain within mammalian mitochondrial translation initiation factor 2 serves the role of eubacterial initiation factor 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3918-3923, doi: 10.1073/pnas.1017425108.
 33. Remes, C., Khawaja, A., Pearce, S. F., Dinan, A. M., Gopalakrishna, S., Cipullo, M., Kyriakidis, V., Zhang, J., Dopico, X. C., Yukhnovets, O., Atanasov, I., Firth, A. E., Cooperman, B., and Rorbach, J. (2023) Translation initiation of leaderless and polycistronic transcripts in mammalian mitochondria, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 891-907, doi: 10.1093/nar/gkac1233.
 34. Luo, Y., Su, R., Wang, Y., Xie, W., Liu, Z., and Huang, Y. (2019) *Schizosaccharomyces pombe* Mti2 and Mti3 act in conjunction during mitochondrial translation initiation, *FEBS J.*, **286**, 4542-4553, doi: 10.1111/febs.15021.
 35. Ostojić, J., Panozzo, C., Bourand-Plantefol, A., Herbert, C. J., Dujardin, G., and Bonnefoy, N. (2016) Ribosome recycling defects modify the balance between the synthesis and assembly of specific subunits of the oxidative phosphorylation complexes in yeast mitochondria, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 5785-5797, doi: 10.1093/nar/gkw490.
 36. Koc, E. C., and Spemulli, L. L. (2002) Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs, *J. Biol. Chem.*, **277**, 35541-35549, doi: 10.1074/jbc.M202498200.
 37. Ayyub, S. A., Dobriyal, D., and Varshney, U. (2017) Contributions of the N- and C-terminal domains of initiation factor 3 to its functions in the fidelity of initiation and antiassociation of the ribosomal subunits, *J. Bacteriol.*, **199**, e00051-17, doi: 10.1128/JB.00051-17.
 38. Koripella, R. K., Sharma, M. R., Haque, M. E., Risteff, P., Spemulli, L. L., and Agrawal, R. K. (2019) Structure of human mitochondrial translation initiation factor 3 bound to the small ribosomal subunit, *iScience*, **12**, 76-86, doi: 10.1016/j.isci.2018.12.030.
 39. Haque, M. E., Grasso, D., and Spemulli, L. L. (2008) The interaction of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 with ribosomes: Evolution of terminal extensions in IF3mt, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 589-597, doi: 10.1093/nar/gkm1072.
 40. Derbikova, K., Kuzmenko, A., Levitskii, S., Klimontova, M., Chicherin, I., Baleva, M., Krasheninnikov, I., and Kamenski, P. (2018) Biological and evolutionary significance of terminal extensions of mitochondrial translation initiation factor 3, *IJMS*, **19**, 3861, doi: 10.3390/ijms19123861.
 41. Springer, M., Graffe, M., and Grunberg-Manago, M. (1977) Characterization of an *E. coli* mutant with a thermolabile initiation factor IF3 activity, *Mol. Gen. Genet.*, **151**, 17-26, doi: 10.1007/BF00446908.
 42. Kuzmenko, A., Derbikova, K., Salvatori, R., Tankov, S., Atkinson, G. C., Tenson, T., Ott, M., Kamenski, P., and Haurlyuk, V. (2016) Aim-less translation: Loss of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation initiation factor mIF3/Aim23 leads to unbalanced protein synthesis, *Sci. Rep.*, **6**, 18749, doi: 10.1038/srep18749.
 43. Chicherin, I., Levitskii, S., Baleva, M. V., Krasheninnikov, I. A., Patrushev, M. V., and Kamenski, P. (2020) Yeast mitochondrial translation initiation factor 3 interacts with pet111p to promote COX2 mRNA translation, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3414, doi: 10.3390/ijms21103414.
 44. Chicherin, I. V., Baleva, M. V., Levitskii, S. A., Dashinimaev, E. B., Krasheninnikov, I. A., and Kamenski, P. (2020) Initiation factor 3 is dispensable for mitochondrial translation in cultured human cells, *Sci. Rep.*, **10**, 7110, doi: 10.1038/s41598-020-64139-5.
 45. Rudler, D. L., Hughes, L. A., Perks, K. L., Richman, T. R., Kuznetsova, I., Ermer, J. A., Abudulai, L. N., Shearwood, A. M. J., Viola, H. M., Hool, L. C., Siira, S. J., Rackham, O., and Filipovska, A. (2019) Fidelity of translation initiation is required for coordinated respiratory complex assembly, *Sci. Adv.*, **5**, eaay2118, doi: 10.1126/sciadv.aay2118.
 46. Gu, Y., Mao, Y., Jia, L., Dong, L., and Qian, S.-B. (2021) Bi-directional ribosome scanning controls the stringency of start codon selection, *Nat. Commun.*, **12**, 6604, doi: 10.1038/s41467-021-26923-3.

47. Herbert, C. J., Labarre-Mariotte, S., Cornu, D., Sophie, C., Panozzo, C., Michel, T., Dujardin, G., and Bonnefoy, N. (2021) Translational activators and mitoribosomal isoforms cooperate to mediate mRNA-specific translation in *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 11145-11166, doi: 10.1093/nar/gkab789.
48. Haastrup, M. O., Vikramdeo, K. S., Singh, S., Singh, A. P., and Dasgupta, S. (2023) The journey of mitochondrial protein import and the roadmap to follow, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2479, doi: 10.3390/ijms24032479.
49. Desai, N., Brown, A., Amunts, A., and Ramakrishnan, V. (2017) The structure of the yeast mitochondrial ribosome, *Science*, **355**, 528-531, doi: 10.1126/science.aal2415.
50. Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Guerrero, A. E., and Pérez-Martínez, X. (2014) The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial *COX1* transcript in yeast, *RNA Biol.*, **11**, 953-967, doi: 10.4161/rna.29780.
51. Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R. L., Fox, T. D., Tzagoloff, A., and Barrientos, A. (2007) Aberrant translation of cytochrome *c* oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell*, **18**, 523-535, doi: 10.1091/mbc.e06-09-0803.
52. Jones, J. L., Hofmann, K. B., Cowan, A. T., Temiakov, D., Cramer, P., and Anikin, M. (2019) Yeast mitochondrial protein Pet111p binds directly to two distinct targets in *COX2* mRNA, suggesting a mechanism of translational activation, *J. Biol. Chem.*, **294**, 7528-7536, doi: 10.1074/jbc.RA118.005355.
53. Brown, N. G., Costanzo, M. C., and Fox, T. D. (1994) Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial *COX3* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1045-1053, doi: 10.1128/MCB.14.2.1045.
54. Kaspar, B. J., Bifano, A. L., and Caprara, M. G. (2008) A shared RNA-binding site in the Pet54 protein is required for translational activation and group I intron splicing in yeast mitochondria, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2958-2968, doi: 10.1093/nar/gkn045.
55. Salvatori, R., Kehrein, K., Singh, A. P., Aftab, W., Möller-Hergt, B. V., Forne, I., Imhof, A., and Ott, M. (2020) Molecular wiring of a mitochondrial translational feedback loop, *Mol. Cell*, **77**, 887-900.e5, doi: 10.1016/j.molcel.2019.11.019.
56. Zeng, X., Hourset, A., and Tzagoloff, A. (2007) The *Saccharomyces cerevisiae* *ATP22* gene codes for the mitochondrial ATPase subunit 6-specific translation factor, *Genetics*, **175**, 55-63, doi: 10.1534/genetics.106.065821.
57. Seshadri, S. R., Banarjee, C., Barros, M. H., and Fontanesi, F. (2020) The translational activator Sov1 coordinates mitochondrial gene expression with mitoribosome biogenesis, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 6759-6774, doi: 10.1093/nar/gkaa424.
58. Tang, J. X., Thompson, K., Taylor, R. W., and Oláhová, M. (2020) Mitochondrial OXPHOS biogenesis: co-regulation of protein synthesis, import, and assembly pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3820, doi: 10.3390/ijms21113820.
59. Fontanesi, F., Clemente, P., and Barrientos, A. (2011) Cox25 teams up with Mss51, Ssc1, and Cox14 to regulate mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 expression and Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **286a**, 555-566, doi: 10.1074/jbc.M110.188805.
60. Barrientos, A., Zambrano, A., and Tzagoloff, A. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.*, **23**, 3472-3482, doi: 10.1038/sj.emboj.7600358.
61. Chujo, T., Ohira, T., Sakaguchi, Y., Goshima, N., Nomura, N., Nagao, A., and Suzuki, T. (2012) LRPPRC/SLIRP suppresses PNPase-mediated mRNA decay and promotes polyadenylation in human mitochondria, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8033-8047, doi: 10.1093/nar/gks506.
62. Lagouge, M., Mourier, A., Lee, H. J., Spähr, H., Wai, T., Kukat, C., Ramos, E. C., Motori, E., Busch, J. D., Siira, S., German Mouse Clinic Consortium, Kremmer, E., Filipovska, A., and Larsson, N.-G. (2015) SLIRP regulates the rate of mitochondrial protein synthesis and protects LRPPRC from degradation, *PLoS Genet.*, **11**, e1005423, doi: 10.1371/journal.pgen.1005423.
63. Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., Kolesar, J. E., Lochmüller, H., Chevrette, M., Kaufman, B. A., Horvath, R., and Shoubbridge, E. A. (2009) Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome *c* oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome, *Nat. Genet.*, **41**, 833-837, doi: 10.1038/ng.390.
64. Richman, T. R., Spähr, H., Ermer, J. A., Davies, S. M. K., Viola, H. M., Bates, K. A., Papadimitriou, J., Hool, L. C., Rodger, J., Larsson, N.-G., Rackham, O., and Filipovska, A. (2016) Loss of the RNA-binding protein TACO1 causes late-onset mitochondrial dysfunction in mice, *Nat. Commun.*, **7**, 11884, doi: 10.1038/ncomms11884.
65. Baleva, M. V., Chicherin, I., Piunova, U., Zgoda, V., Patrushev, M. V., Levitskii, S., and Kamenski, P. (2022) Pentatricopeptide protein PTC22 Regulates COIII translation in mitochondria of the HeLa cell line, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 14241, doi: 10.3390/ijms232214241.
66. Waltz, F., Nguyen, T.-T., Arrivé, M., Bochler, A., Chicher, J., Hammann, P., Kuhn, L., Quadrado, M., Mireau, H., Hashem, Y., and Giegé, P. (2019) Small is big in *Arabidopsis* mitochondrial ribosome, *Nat. Plants*, **5**, 106-117, doi: 10.1038/s41477-018-0339-y.

67. Nguyen, T.-T., Planchard, N., Dahan, J., Arnal, N., Balzergue, S., Benamar, A., Bertin, P., Brunaud, V., Dargel-Graffin, C., Macherel, D., Martin-Magniette, M.-L., Quadrado, M., Namy, O., and Mireau, H. (2021) A case of gene fragmentation in plant mitochondria fixed by the selection of a compensatory restorer of fertility-like PPR gene, *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 3445-3458, doi: 10.1093/molbev/msab115.
68. Matus-Ortega, M. G., Cárdenas-Monroy, C. A., Flores-Herrera, O., Mendoza-Hernández, G., Miranda, M., González-Pedrajo, B., Vázquez-Meza, H., and Pardo, J. P. (2015) New complexes containing the internal alternative NADH dehydrogenase (Ndi1) in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: mitochondrial complexes containing the alternative NADH dehydrogenase, *Yeast*, **32**, 629-641, doi: 10.1002/yea.3086.
69. Ott, M., and Herrmann, J. M. (2010) Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 767-775, doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.11.010.
70. Bieri, P., Greber, B. J., and Ban, N. (2018) High-resolution structures of mitochondrial ribosomes and their functional implications, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **49**, 44-53, doi: 10.1016/j.sbi.2017.12.009.
71. Pfeffer, S., Woellhaf, M. W., Herrmann, J. M., and Förster, F. (2015) Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography, *Nat. Commun.*, **6**, 6019, doi: 10.1038/ncomms7019.
72. Ferretti, M. B., and Karbstein, K. (2019) Does functional specialization of ribosomes really exist? *RNA*, **25**, 521-538, doi: 10.1261/rna.069823.118.
73. Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K. M., Genuth, N. R., Röst, H. L., Teruel, M. N., and Barna, M. (2017) Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide, *Mol. Cell*, **67**, 71-83.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.021.

DIVERSITY AND EVOLUTION OF MITOCHONDRIAL TRANSLATION APPARATUS

Review

M. V. Baleva, U. E. Piunova, I. V. Chicherin, S. A. Levitskii, and P. A. Kamenski*

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; email: piotr.kamenski@gmail.com*

The evolution of mitochondria proceeded independently in different eukaryotic lines, reflected in the diversity of mitochondrial genomes and mechanisms of their expression observed in different eukaryotic species. Mitochondria lost most of the genes of their bacterial ancestor, partially transferred them to the nucleus or completely eliminated. However, the mitochondria of almost all eukaryotic cells retain relatively small genomes, as well as their replication, transcription, and translation apparatuses. Dependence on the nuclear genome, features of mitochondrial transcripts, and the necessity to synthesize highly hydrophobic membrane proteins led to a number of significant changes in translation apparatus derived from the bacterial ancestor. It retained the basic structure necessary for protein synthesis but became more specialized and labile. In this review, we consider what changes take place during the initiation of mitochondrial translation, and how the evolution of mitochondria affected the functions of the main factors initiating protein biosynthesis in these organelles.

Keywords: mitochondria, translation initiation factors, regulation of translation, translation

ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

Обзор

© 2023 А.А. Попов¹, И.О. Петрусева¹, Н.В. Науменко¹, О.И. Лаврик^{1,2*}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 29.03.2023

После доработки 30.08.2023

Принята к публикации 31.08.2023

Система эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) ответственна за удаление из ДНК широкого набора объемных повреждений, что вносит существенный вклад в поддержание стабильности генома. Эффективность, с которой белки системы NER распознают и удаляют объемные повреждения, зависит от многих факторов и имеет важное клинично-диагностическое значение. В обзоре рассмотрены современные представления о молекулярных основах функционирования системы NER в клетках эукариот, а также проанализированы методы и подходы, которые применяются для определения эффективности функционирования данной системы репарации ДНК как *in vitro*, так и *ex vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эксцизионная репарация нуклеотидов, повреждения ДНК, методы определения активности NER.

DOI: 10.31857/S0320972523110155, EDN: MMRCFF

ВВЕДЕНИЕ

Системы репарации ДНК — важная группа молекулярных механизмов клетки, действие которых обеспечивает поддержание стабильности генома [1]. Белки системы эксцизионной репарации нуклеотидов (Nucleotide Excision Repair, NER) удаляют из ДНК объемные повреждения — ковалентные аддукты различной природы, которые формируются, как правило, с гетероциклическими основаниями нуклеотидных звеньев под действием экзогенного стресса, а именно УФ-облучения и вредных соединений из окружающей среды. Эти повреждения вызывают значительные нарушения регулярной двухцепочечной структуры ДНК [1–3].

Эффективность удаления объемных повреждений из ДНК зависит от функционального состояния и активности системы NER в клетках. Одним из примеров наследственных синдромов, связанных с дефектами в работе NER у человека, является пигментная ксеродерма, от названия которой произошли обозначения целого ряда белков-участников NER (Xeroderma Pigmentosum complementation group (XP-белки) A, B, C, D, E, F, G) [2]. Пониженная активность NER наблюдается в клетках больных нейродегенеративными заболеваниями и ассоциирована со старением [3–5]. Данные об эффективности удаления репаративным аппаратом клетки индуцированных терапией объемных повреждений ДНК необходимы при разработке химиопрепаратов, действие которых основано

Принятые сокращения: CAT — хлорамфеникол ацетилтрансфераза; CPD — циклобутан-пиримидиновый димер; HCR — реактивация клеток-хозяев; NER — эксцизионная репарация нуклеотидов; GG-NER — общегеномная эксцизионная репарация нуклеотидов; TC-NER — эксцизионная репарация нуклеотидов, ассоциированная с транскрипцией; nAnt — N-[6-(9-антраценилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; nFlu — N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; TFIIH — фактор транскрипции IIH; XP-белки — Xeroderma Pigmentosum complementation group; XPC — белок, участвующий в распознавании объемных аддуктов ДНК.

* Адресат для корреспонденции.

на способности формировать такие повреждения ДНК, поэтому рассматриваемая проблема имеет как фундаментальное, так и прикладное (клинико-диагностическое) значение.

Репаративный статус клетки в условиях генотоксического стресса может быть оценен по уровню транскрипции генов, связанных с репарацией ДНК, в том числе генов, кодирующих ключевые белки системы NER, а также по уровням экспрессии белков репарации ДНК [6, 7]. Однако серьезным ограничением при применении геномных, транскриптомных и протеомных подходов является то, что посттранскрипционная и посттрансляционная регуляция экспрессии и собственно активность функционирования белков системы NER не могут быть оценены с помощью этих методов. Кроме того, корреляция между уровнями транскрипции и активностью ферментов репарации часто оказывается незначительной [8]. В то же время измерение функциональной активности систем репарации ДНК является более адекватным способом оценки репаративного статуса клетки, то есть ее способности удалять повреждения и восстанавливать нативную структуру ДНК.

Целью данного обзора является рассмотрение ряда существующих методов определения эффективности функционирования системы NER, их преимуществ и недостатков. Первая часть обзора содержит краткое описание механизмов NER с указанием ссылок на недавно опубликованные обзоры [3, 9], которые посвящены детальному описанию этих механизмов. Во второй части рассматриваются методы определения эффективности функционирования NER, в том числе разработанные нами. Обзор актуален и может быть интересен для исследователей, изучающих NER, поскольку рассмотрение спектра применяемых методов определения активности этой системы репарации ДНК ранее не проводилось в других обзорах. Представленная в обзоре информация может быть полезна и применима не только при выборе подходящего для исследования метода определения активности NER, но и для совершенствования существующих, а также разработки новых эффективных подходов к оценке репаративного статуса клетки, необходимых для развития медицины.

СИСТЕМА ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

В работе системы NER выделяют несколько последовательных этапов: 1) поиск и обнару-

жение участков ДНК, которые могут содержать повреждения; 2) проверка наличия объемного повреждения и сборка «предрасщепляющего» (предыницизионного) комплекса; 3) формирование готового «расщепляющего» (инцизионного) комплекса, удаление одноцепочечного фрагмента ДНК с повреждением и репаративный синтез ДНК в образованной бреши.

Существуют две ветви NER — общегеномная (Global Genome, GG-NER) и NER, ассоциированная с транскрипцией (Transcription-Coupled NER, TC-NER) [10]. В процессе GG-NER поиск и обнаружение участков ДНК, содержащих повреждение, осуществляет специализированный гетеротримерный комплекс XPC—RAD23B—CETN2, в котором роль сенсора, чувствительного к нарушениям регулярной двуцепочечной структуры ДНК, принадлежит белку XPC (белок, участвующий в распознавании объемных аддуктов ДНК) [11, 12]. Субъединица RAD23B (RADiation sensitivity abnormal protein 23 homolog B) защищает XPC от протеасомной деградации и обеспечивает стабильность всего комплекса, но не контактирует с поврежденной ДНК и высвобождается из комплекса при связывании XPC с ДНК [13–15]. Centrin 2 (CETN2) участвует в формировании и стабилизации гетеротримерного комплекса и, наряду с XPC, может взаимодействовать с ДНК [15–17].

При обнаружении поврежденного участка ДНК XPC располагается на неповрежденной цепи ДНК напротив повреждения, происходит перегиб углеводофосфатного остов ДНК с формированием угла 140° , при этом поврежденное основание выворачивается из дуплекса [18]. Для обнаружения белком XPC участков, содержащих УФ-повреждения, присутствие которых не приводит к заметному искажению регулярной структуры ДНК, требуется участие специализированного сенсорного белка — DDB2 (Damage specific DNA Binding protein 2), а также белков DDB1, PARP1 (Poly(ADP-ribose) Polymerase 1), CUL4a (Cullin 4a) и RBX1 (Ring-Box 1), работа которых делает УФ-повреждение «видимым» для XPC в контексте хроматина [19]. Формирование комплекса XPC—ДНК с характерной геометрией служит сигналом для привлечения к месту повреждения фактора транскрипции TFIIH (Transcription Factor IIH), который проводит проверку повреждения.

Инициация TC-NER происходит при блокировании продвижения РНК-полимеразы II объемным повреждением, находящимся в транскрибируемой цепи [20, 21]. С заблокированной повреждением РНК-полимеразой II связыва-

ется белок CSB (Cockayne Syndrome B), который изгибает углеводофосфатный остов молекулы ДНК на 80° и осуществляет попытку АТФ-зависимой транслокации РНК-полимеразы II через вызвавший ее остановку «барьер» [22–24]. Поскольку транслокация РНК-полимеразы II через объемное повреждение невозможна, CSB оттесняет РНК-полимеразу II и привлекает факторы репарации CSA (Cockayne Syndrome A) и UVSSA–USP7 (UV Stimulated Scaffold protein A; Ubiquitin Specific Peptidase 7). CSA связывается с комплексом белков CSB–РНК-полимераза II и осуществляет их убиквитинирование [25]. К сформированному комплексу CSA–CSB–РНК-полимераза II присоединяется гетеродимер UVSSA–USP7, с которым через р62-субъединицу взаимодействует фактор TFIIH, ответственный за следующую стадию узнавания повреждения.

Последующие стадии узнавания и удаления повреждения осуществляются комплексами белков, которые формируются одинаковым по составу для обеих ветвей NER набором ферментов и факторов. В состав фактора TFIIH входят две АТФ-зависимые хеликазы XPB и XPD, а также белки р8, р34, р44, р52, р62 и субкомплекс САК (CDK-Activating Kinase), выполняющие структурные и регуляторные функции [26]. При высвобождении САК-субкомплекса XPB связывается с неповрежденной цепью ДНК с 3'-стороны от повреждения и раскручивает ДНК примерно на 5 п.н. в направлении 3'→5' поврежденной цепи. Это позволяет XPD, выполняющей в NER роль верифицирующей хеликазы, связаться с поврежденной цепью ДНК с 5'-стороны от повреждения [27–29]. XPD продвигается по поврежденной цепи ДНК в направлении 5'→3', постепенно формируя асимметричный «пузырь» и останавливаясь при встрече с объемным аддуктом [27, 30]. В сформированный на ДНК фактором TFIIH комплекс вовлекаются белки RPA (Replication Protein A) и фактор пигментной ксеродермы А (ХРА), которые обеспечивают правильное расположение структурно специфичных эндонуклеаз XPG и XPF в комплексе с помогающим ее работе белком ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation group 1) на поврежденной ДНК и участвуют в формировании предынцизионного комплекса [31–34].

В присутствии XPG, связавшегося с поврежденной ДНК с 3'-стороны от повреждения, ERCC1–XPF вносит в ДНК разрыв с 5'-стороны от повреждения, затем высвобождается из комплекса. Появление в результате расщепления цепи ДНК свободной 3'-ОН-группы служит сигналом для инициации репаратив-

ного синтеза цепи ДНК, в котором участвуют белки репликации: ДНК-полимеразы δ или ε, репликативные факторы RPA и RFC (Replication Factor C), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) [35]. В белковом комплексе, который связан с одноцепочечным ДНК-фрагментом с повреждением, происходят конформационные перестройки, в результате которых каталитический домен XPG активируется и вносит разрыв с 3'-стороны от повреждения [36, 37]; затем вместе с удаляемым ДНК-фрагментом, содержащим повреждение, высвобождаются ХРА, XPG и TFIIH [38]. Восстановление целостности вновь синтезированной цепи ДНК катализируют ДНК-лигазы (I или IIIα).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

Широкая специфичность, большое количество белков-участников, многоэтапный механизм процесса, а также существование двух ветвей эукариотической системы NER определяют разнообразие применяемых подходов оценки эффективности функционирования этой системы репарации и используемых для этого модельных белковых систем и ДНК-субстратов.

Модельные белковые системы и ДНК-субстраты. Использование модельных систем различной степени сложности, в том числе реконструированных из предварительно очищенных, как правило, рекомбинантных белков, позволило выяснить многие детали механизма репарации объемных повреждений в клетках эукариот [39–41], а также сравнить субстратные свойства ДНК, содержащих повреждения различной структуры [34]. Наиболее часто измеряется активность эндогенных белков NER, содержащихся во фракционированных по стандартной методике цельноклеточных экстрактах (NER-компетентных экстрактах) млекопитающих [42].

Агенты, повреждающие ДНК, часто генерируют гетерогенные смеси повреждений, однако для сравнительной оценки репаративного статуса клеток и определения эффективности удаления повреждений конкретного типа нужны ДНК-субстраты с определенной структурой. Модельные ДНК, которые используются для определения эффективности функционирования системы NER *in vitro* и *ex vivo*, представляют собой протяженные линейные

ДНК-дуплексы и плазмидные ДНК, содержащие в заданной позиции одной из цепей объемное повреждение [43–48]. Минимальная длина линейного ДНК-дуплекса, необходимая для протекания реакции специфической эксцизии, катализируемой белками NER, составляет 100 п.н. [48]. Значительная часть работ по определению эффективности функционирования NER *in vitro* была выполнена с использованием модельных кольцевых ДНК, содержащих циклобутан-пиримидиновый димер (CPD), пиримидин-пиримидон-(6–4)-фотопродукты и производные бенз[а]пирена [43, 49], а также ацетиламинофлуорена [50]. Основой для создания модельных ДНК могут быть полученные методом твердофазного синтеза олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие модифицированное нуклеотидное звено. Такие фрагменты могут быть встроены в более протяженные структуры, включая кольцевые плазмидные ДНК, с помощью ферментативного лигирования либо при использовании в качестве праймера в катализируемой ДНК-полимеразой реакции и последующего лигирования [45, 48]. Возможно также введение в ДНК соответствующего дезоксинуклеозидмонофосфата с помощью ДНК-полимеразной и лигазной реакций [51, 52].

Эффективность удаления повреждений из ДНК зависит от многих факторов. Для линейных ДНК-дуплексов различной длины и линеаризованной плазмиды, которые содержали бенз[а]пиреновое производное дезоксигуанина, эффективность эксцизии не превышала 5–10%, в то время как эффективность эксцизии этого повреждения из той же плазмиды, находящейся в кольцевой форме, была в 6 раз выше [53]. Различия в эффективности удаления системой NER одного и того же аддукта из ДНК с одинаковым нуклеотидным контекстом могут быть обусловлены возможностью взаимодействия с линейными дцДНК белков PARP1 и комплекса Ku 70/80 с ДНК-зависимой протеинкиназой, которые присутствуют в клеточных экстрактах и обладают повышенным сродством к двухцепочечным концам, что обеспечивает их конкуренцию с белками NER [54]. Интересно, что эксцизия поврежденного участка, содержащего N-(дезоксигуанозин-8-ил)-2-ацетиламинофлуорен, при инкубации с белками NER-компетентного экстракта клеток HeLa наблюдалась только при использовании кольцевой ДНК [50]. В то же время эффективность удаления белками NER-компетентного экстракта клеток HeLa фрагментов, содержащих CPD, была практически одинаковой при использовании как

кольцевых, так и линейных ДНК [48]. На эффективность эксцизии влияет не только структура повреждения, но и нуклеотидная последовательность окружающего его участка ДНК, которая влияет на характер индуцируемых присутствием повреждения нарушений структуры ДНК [55]. Таким образом, выбор модельного повреждения и нуклеотидной последовательности ДНК является важнейшим этапом дизайна эксперимента с применением любого подхода для определения эффективности функционирования NER и до сих пор не является абсолютно тривиальной задачей.

Определение эксцизионной активности NER *in vitro*. Оценка специфической эксцизионной активности системы NER *in vitro* дает информацию об эффективности удаления из ДНК участка с повреждением и позволяет проводить сравнительные биохимические исследования, характеризующие как свойства белковых систем, так и свойства модельных ДНК [45, 56].

При прямой детекции продуктов эксцизии модельные ДНК содержат радиоактивную метку вблизи повреждения, в результате чего эту метку содержат и продукты эксцизии [57]. В процессе ферментативного синтеза протяженных ДНК для прямой детекции 5'-конец олигодезоксирибонуклеотидного фрагмента фосфорилируется с использованием [γ - ^{32} P]АТФ с удельной радиоактивностью 6000 Ки/ммоль. Это позволяет при невысоких уровнях эксцизии, которые часто наблюдаются *in vitro*, визуализировать продукты реакции эксцизии и оценить их количество. Однако необходимость использования больших количеств радиоактивной метки для синтеза субстратов, а также трудности, возникающие при хранении высокорadioактивных протяженных ДНК, значительно ограничивают применение этого метода. Недавно был разработан аналог данного метода, не требующий использования радиоактивной метки. В этом случае образовавшиеся продукты эксцизии (олигодезоксирибонуклеотидов длиной ~20–30 нуклеотидов) извлекали из лизата предварительно облученных УФ-светом клеток путем включения в 3'-конец биотина и последующей конъюгации со стрептавидином, с которым ковалентно связана пероксидаза хрена, необходимая для хемилюминесцентной визуализации [58]. Ограничение предложенного подхода заключается в быстрой деградации образующихся продуктов эксцизии, что приводит к значительному снижению сигнала.

Метод оценки эффективности удаления объемных повреждений белками NER *in vitro*

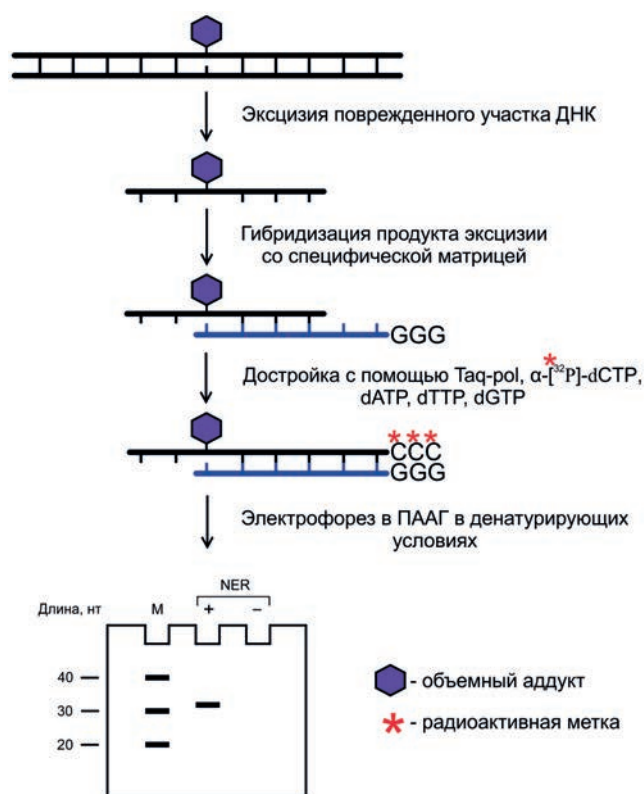


Рис. 1. Оценка эксцизионной активности NER *in vitro* путем постэксцизионного мечения продуктов реакции эксцизии, адаптирован из [56]

основан на постэксцизионном радиоактивном мечении 3'-концов продуктов специфической эксцизии в процессе их достройки ДНК-полимеразой (например, Taq-полимеразой). В качестве матрицы используется олигонуклеотид, последовательность которого частично комплементарна вырезаемому фрагменту с повреждением (рис. 1). Оптимизированная структура матрицы обеспечивает высокий уровень включения радиоактивно-меченных нуклеотидов, что существенно снижает расход радиоактивной метки, а также исключает возможность достройки самой матрицы. Метод позволяет сравнивать как эксцизионную активность образцов, содержащих белки NER, так и субстратные свойства ДНК с разными по структуре повреждениями [45, 52].

Использование данного метода в сочетании с ДНК-субстратами, которые содержали синтетические объемные повреждения, позволило существенно продвинуться в понимании влияния структуры повреждения на различные стадии репарационного процесса [40, 52, 59], а также оценить эксцизионную активность белков NER в отношении линейных ДНК-дуплексов, содержащих кластерные повреждения в различных положениях цепи,

и характер ее изменения в кластерах различной структуры и состава, что позволило углубить понимание взаимосвязи структуры ряда повреждений с эффективностью формирования продуктивных комплексов на первом этапе их узнавания белком ХРС [52, 59]. Кроме того, выполненный с использованием данного метода сравнительный анализ репарационного статуса клеток показал, что белки клеточных экстрактов долгоживущего голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) более эффективно распознают и удаляют из ДНК объемные повреждения, чем белки экстрактов, полученных из клеток мыши (*Mus musculus*) [56]. Полученный результат является одним из немногих экспериментальных подтверждений взаимосвязи эффективно функционирующих систем репарации ДНК с долголетием.

Оценка эффективности функционирования NER методом количественной PCR. Главным преимуществом подходов, использующих количественную PCR (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR), является возможность оценки эффективности репарации повреждений при минимальных количествах ДНК-матрицы. Принцип определения активности NER с помощью qPCR основан на разнице в эффективности копирования неповрежденной модельной ДНК и ДНК того же размера и последовательности, содержащей в одной из цепей объемное повреждение, способное блокировать удлинение праймера ДНК-полимеразой. В результате репарации структура ДНК-матрицы восстанавливается, что обеспечивает полноценное удлинение обоих праймеров и эффективное копирование ДНК-матрицы в ходе PCR [60]. Эффективность репарации определяется по разнице в получаемых в ходе PCR значениях порогового цикла $C(t)$ между восстановленной ДНК и контрольной неповрежденной ДНК (так называемая $dC(t)$). Уменьшение значения $dC(t)$ говорит о протекании репарации и позволяет определить концентрацию (количество) восстановленной (прошедшей полный цикл репарации) ДНК в реакционной смеси после проведения реакции NER (рис. 2).

Одной из главных методических проблем применения PCR для оценки эффективности удаления объемных повреждений является то, что в результате достройки праймера на неповрежденной цепи ДНК-матрицы, содержащей объемное повреждение, в первом цикле реакции образуется укороченная копия поврежденной цепи ДНК, дальнейшая амплификация которой происходить не будет. В то же время полноразмерный продукт копирования

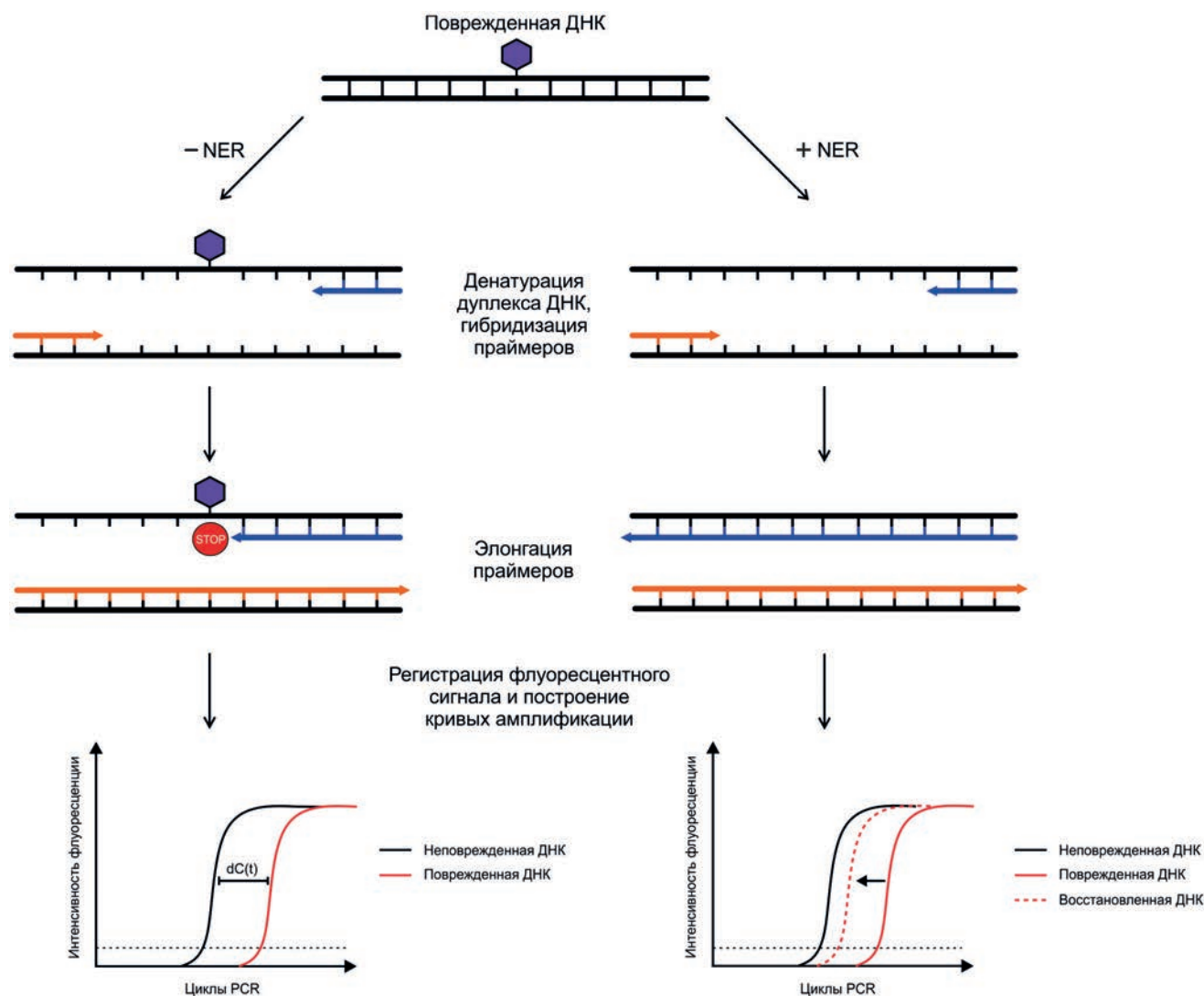


Рис. 2. Схематическое изображение способа оценки эффективности удаления объемных повреждений белками NER с помощью qPCR

неповрежденной цепи, также образующийся при протекании первого цикла ДНК-полимеразной реакции, будет амплифицироваться. Это приведет к уменьшению диапазона возможных значений $dC(t)$ до одного цикла. В работе Chesner и Campbell [61] предложен вариант методики оценки эффективности удаления объемных повреждений с использованием qPCR, который позволил обойти эту проблему и тем самым расширить диапазон возможных значений $dC(t)$ до трех циклов. Авторы данной работы использовали прием предварительной многократной элонгации праймера 1. Полноразмерный продукт элонгации образуется, только если поврежденная цепь плазмиды была восстановлена в ходе репарации, поскольку присутствие объемного повреждения в цепи блокирует элонгацию праймера 1, комплементарного находящемуся с 3'-стороны от повреждения участку пов-

режденной цепи плазмидной ДНК. Клетки млекопитающих трансфицировали плазмидной ДНК, содержащей ДНК-белковую сшивку либо холестеринавый аддукт, и некоторое время культивировали. Затем плазмидную ДНК выделяли из клеток и использовали в качестве матрицы для PCR. После многократного повторения циклов удлинения праймера 1 в реакционную смесь добавляли праймер 2, комплементарный второй цепи, и проводили qPCR. Эффективность репарации объемного повреждения рассчитывали на основе разницы значений порогового цикла $C(t)$ контрольной неповрежденной и процессированной в ходе репарации плазмид. С использованием такого подхода было показано, что репарация плазмидной ДНК, содержащей ДНК-белковую сшивку, проходит в 3 раза более эффективно в клетках человека, чем в клетках китайского хомячка (СНО), тогда как значимых различий

в эффективности репарации плазмидной ДНК, содержащей холестерин-аддукт, в сравниваемых клетках выявлено не было [61].

Предложенный в работе Shen et al. [62] подход, основанный на использовании 5'-биотинилированного CPD-содержащего ДНК-дуплекса шпильчатой структуры в качестве субстрата, позволил оценить эффективность работы NER в различных типах клеток человека. Трансфицированные CPD-содержащей ДНК клетки после культивирования подвергали лизису, из лизата извлекали целевую ДНК и с использованием qPCR проводили оценку эффективности ее репарации. Спустя 24 часа после трансфекции эффективность репарации CPD-содержащей ДНК системой NER клеток линии HEK 293T составила 43,7%, тогда как в случае клеток линии SW480 этот показатель не превышал 1% [62].

Применение qPCR позволяет оценивать количество объемных повреждений, возникающих в ДНК в результате различных генотоксических воздействий, включая химиотерапию, а также длительность сохранения индуцированных повреждений в ДНК клеток живого организма [63, 64]. В работе Kalinowski et al. [65] проведено сравнение количества повреждений, образуемых воздействием УФ-света и цисплатина на митохондриальную и геномную ДНК. Согласно данным, полученным в этой работе, количество УФ-повреждений во фрагменте митохондриальной ДНК мышинных клеток линии L1210 было в 1,5 раза выше, чем во фрагменте геномной ДНК, в то время как при обработке цисплатином количество образуемых внутрипочечных сшивок в митохондриальной ДНК оказалось в 2,5 раза ниже, чем в геномном фрагменте.

Использование и дальнейшее развитие методов определения эффективности функционирования NER с помощью qPCR имеет важное прикладное значение. Высокая чувствительность этого метода в сочетании с несложной процедурой проведения эксперимента открывает перспективы к использованию qPCR-анализа для диагностики нарушений работы системы NER и оперативной оценки репаративного статуса больных тяжелыми нейродегенеративными и раковыми заболеваниями.

Применение метода ДНК-комет для оценки эффективности функционирования NER *ex vivo*. В качестве субстрата при оценке уровня образования разрывов в ДНК методом ДНК-комет используются нуклеоидные структуры (сверхскрученная ДНК, прикрепленная к ядерному матриксу) отдельных клеток. Исследуемые

клетки обрабатывают повреждающим агентом, затем помещают в гель из легкоплавкой агарозы, приготовленный на предметном стекле для микроскопии, и лизируют, чтобы удалить мембрану и растворимые клеточные компоненты [66]. ДНК, прикрепленную к ядерному матриксу, подвергают щелочной обработке и анализируют методом электрофореза в щелочных условиях с окраской интеркалирующим флуоресцентным красителем. При движении в электрическом поле нуклеоид принимает вид «комет» с лидирующей при движении в геле «головой», сформированной сверхскрученной ДНК, и характерным отстающим «хвостом», представляющим собой фрагменты ДНК с одноцепочечными разрывами (релаксированные формы) [66, 67]. Оценка степени повреждения ДНК ведут с помощью специализированного программного обеспечения (рис. 3).

Несмотря на свою популярность, первый вариант метода ДНК-комет, разработанный в основном для анализа генотоксичности лекарственных препаратов и загрязнителей окружающей среды, имел ряд недостатков. Проведение экспериментов с применением данного метода было продолжительным по времени и трудоемким, а также не давало возможности одновременного анализа большого числа образцов. Впоследствии развитие данного метода позволило обойти некоторые ограничения, связанные с продолжительностью эксперимента и его стоимостью, что позволило адаптировать его для высокопроизводительного скрининга [68].

Поскольку разрывы в ДНК могут возникать не только при генотоксическом воздействии, но и в процессе удаления повреждений, это позволяет использовать метод ДНК-комет для изучения систем репарации ДНК, в том числе и системы NER [69–72]. Однако селективная оценка количества разрывов, формируемых при процессинге объемного повреждения, в данном случае была бы невозможна. Более избирательная, хотя и косвенная, оценка эффективности репарации повреждений стала возможной после разработки метода ДНК-комет с применением ингибиторов. В работе Cipollini et al. [73] было показано, что воздействие УФ-света на лимфоциты человека приводит к значительному увеличению интенсивности флуоресценции мигрирующего «хвоста» нуклеоида через 20–90 минут после облучения. Спустя 120–240 минут после облучения интенсивность флуоресценции падает, что сигнализирует о восстановлении целостности ДНК. Обработка лимфоцитов человека новобиоцином — ингибитором, блокирующим

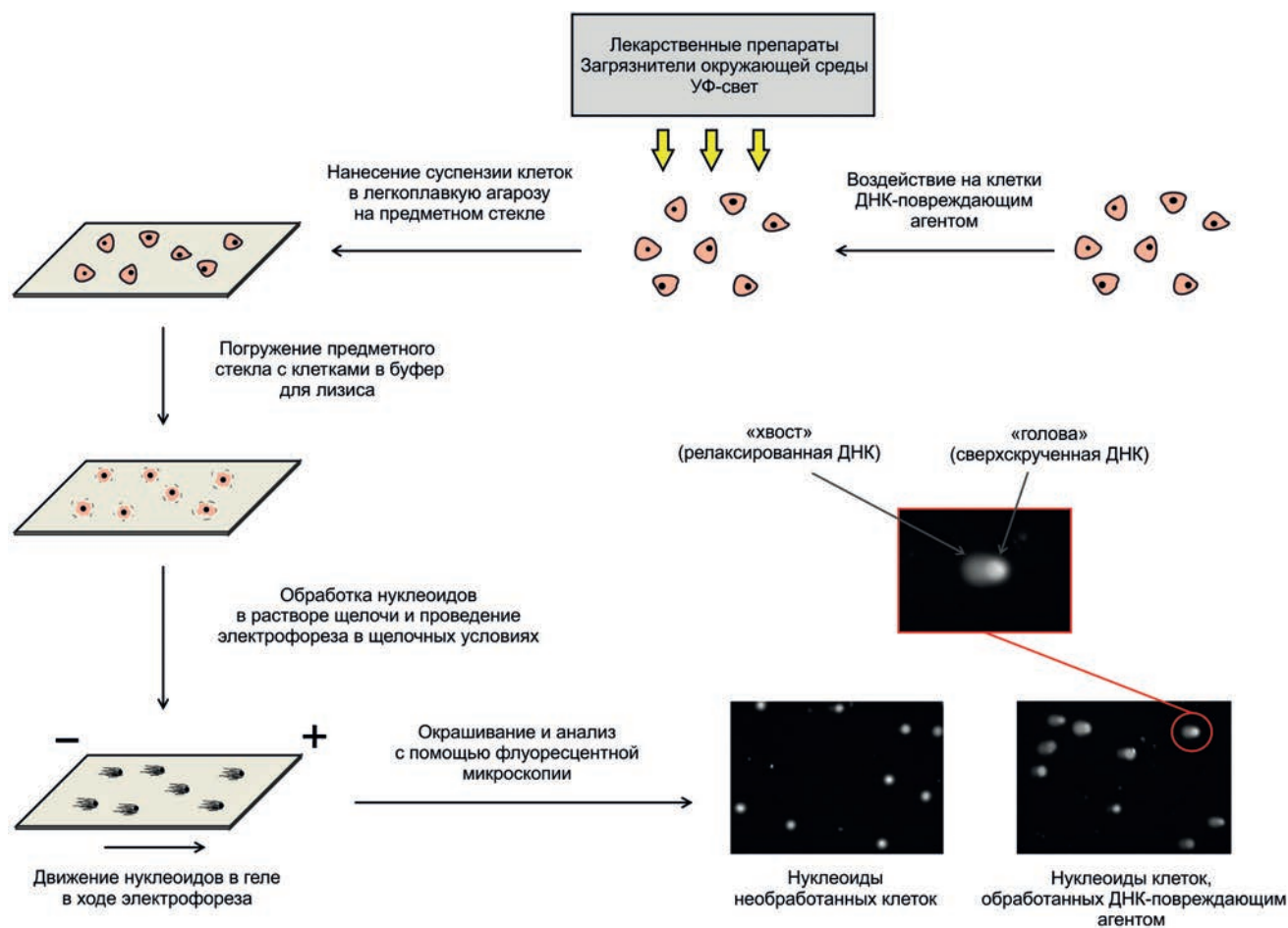


Рис. 3. Схема проведения эксперимента по оценке степени повреждения ДНК в клетке методом ДНК-комет

образование разрывов в ДНК, — приводила к снижению количества ДНК во фракции, формирующей «хвост» кометы. Присутствие афидиколина — ингибитора ДНК-полимеразы — блокировало репаративный синтез, в результате чего количество мигрирующей ДНК не менялось со временем. Таким образом, применение модифицированного метода ДНК-комет позволяет следить за двумя процессами: интенсивностью образования в ДНК разрывов и эффективностью репаративного синтеза [73]. Проведенная с использованием данного варианта метода сравнительная оценка уровня активности NER в человеческих фибробластах дикого типа и ХРА^{-/-}-фибробластах подтвердила его применимость для таких оценок. Эффективность репарации индуцируемых процессингом бенз[а]пиреновых аддуктов одноцепочечных разрывов в клетках дикого типа была выше, чем в ХРА^{-/-}-клетках. Было также показано, что количество одноцепочечных разрывов, образующихся при воздействии бенз[а]пирен-диол-эпоксида на дефектные клетки, было в 1,3 раза больше, чем в клетках дикого типа. Можно заключить, что

такая модификация метода ДНК-комет позволила повысить специфичность измерения эксцизионной активности системы NER [74].

Анализ ДНК-комет концептуально прост и является ценным дополнительным подходом к оценке репаративного статуса, однако трудоемок и малопроизводителен; существуют также проблемы с воспроизводимостью результатов. К настоящему времени разработаны усовершенствованные варианты комет-анализа, которые значительно увеличивают производительность, воспроизводимость и специфичность оценки эффективности репарации определенных классов повреждений ДНК с использованием различных ферментов репарации ДНК [75–77]. Однако даже в усовершенствованном виде комет-анализ обычно детектирует репарацию различных повреждений ДНК и требует нескольких этапов обработки образцов, для того чтобы выявить повреждение, специфичные для каждого из путей [78].

Метод оценки эффективности функционирования NER *ex vivo* путем реактивации экспрессии белков-репортеров в клетках хозяина. В настоящее время востребованным является

метод определения эффективности функционирования системы NER, основанный на реактивации экспрессии гена того или иного репортерного белка в клетках хозяина (Host Cell Reactivation, HCR). С использованием данного подхода можно проводить оценку активности NER в культуре клеток (*ex vivo*). Для этого в качестве субстрата используется плазмидная ДНК, содержащая объемное повреждение, которое блокирует экспрессию гена репортерного белка в исследуемых клетках [79]. Внедрение плазмиды в клетку происходит путем трансфекции или электропорации. Способ оценки уровня восстановления экспрессии репортерного белка определяется его свойствами.

С применением метода HCR была оценена эффективность репарации системой NER лимфоцитов человека плазмидных ДНК, содержащих УФ-повреждение, либо бенз[а]пиреновый аддукт в области промотора гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (Chloramphenicol Acetyltransferase, CAT) [79]. Лимфоциты человека с нормальным фенотипом и лимфоциты, дефектные по генам различных ХР-белков, трансфицировали плазмидой. Доказательством восстановления экспрессии белка служило восстановление ацетилирования хлорамфеникола в присутствии радиоактивно меченного субстрата CAT, [³H]ацетил-КоА. По кинетике накопления [³H]ацетилхлорамфеникола судили об эффективности удаления объемного повреждения, блокирующего экспрессию CAT. Это исследование показало, что эффективность репарации ДНК в ХР-дефектных клетках была в 10–20 раз ниже, чем в нормальных [79]. Ранее применение метода HCR позволило также показать, что репарация плазмидных ДНК, содержащих индуцируемые воздействием цисплатина межцепочечные сшивки ДНК, в дефектных по ХР-генам клетках человека происходит значительно менее эффективно, чем в клетках дикого типа, что свидетельствует об участии белков NER в репарации одного из самых токсичных повреждений ДНК [80].

В качестве репортерных чаще используются флуоресцентные белки либо ферменты люцифераза и β-галактозидаза, применение которых позволило упростить детекцию репарации. Исследование репарации плазмидных ДНК, кодирующих ген репортерного белка люциферазы (*luc*) и содержащих УФ-повреждение в промоторном участке, в нормальных и ХР-дефектных клетках продемонстрировало возможность применения этого метода для сравнения репаративного статуса разных клеток [81]. С использованием плазмиды, со-

державшей ген флуоресцентного белка GFP, удалось провести количественную оценку эффективности репарации УФ-повреждений в клетках HEK 293. Было показано, что система NER клеток HEK 293 способна провести полную репарацию плазмидной ДНК, содержащей 1,4 УФ-повреждения на каждые 1000 нуклеотидов, в течение 12 часов после трансфекции [82].

Сравнительная оценка эффективности репарации плазмиды pEGFP-N1, предварительно подвергшейся облучению УФ-светом, в различных типах клеток человека была проведена также с применением активируемой флуоресценцией сортировки клеток (Fluorescent Activated Cell Sorting, FACS). Репарация модельной плазмиды в кератиноцитах происходила более эффективно, чем в фибробластах, а наименьшая эффективность репарации была отмечена в меланоцитах [83]. Комбинация методов HCR и FACS позволила определить роль GG-NER и TC-NER в репарации апуриновых/апиримидиновых сайтов (AP-сайтов) в клетках MRC-5 [84]. Было показано, что эффективность репарации плазмиды pEGFP-Q205, содержащей в качестве повреждения тиотетрагидрофуран (S-THF) — труднорепазируемый белками эксцизионной репарации оснований (Base Excision Repair, BER) аналог AP-сайта, содержащий фосфотиоатную группу, — снижалась в 2 раза при отсутствии функционально активной TC-NER и в 4 раза — при отсутствии функционально активной GG-NER. Полученные результаты позволили рассматривать GG-NER как преобладающий механизм репарации таких повреждений [84].

Недавно был предложен вариант метода определения эффективности функционирования NER *ex vivo* с использованием рекомбинантной плазмидной ДНК, несущей ген флуоресцентного белка TagRFP, и полученных на ее основе ДНК с объемными повреждениями [85]. Блокирующие экспрессию гена флуоресцентного белка синтетические объемные повреждения в этом случае вводятся в транскрибируемую цепь ДНК в область промотора гена *tagrfp*. Плазмидой с повреждением либо контрольной плазмидой трансфицируют исследуемые клетки, затем, инкубируя клетки в соответствующих условиях, с помощью флуоресцентной микроскопии следят за изменением уровня экспрессии TagRFP (рис. 4).

Поскольку присутствие объемного повреждения в транскрибируемой цепи в области промотора блокирует транскрипцию гена *tagrfp*, флуоресцентный сигнал в клетках, трансфицированных плазмидой с повреждением,

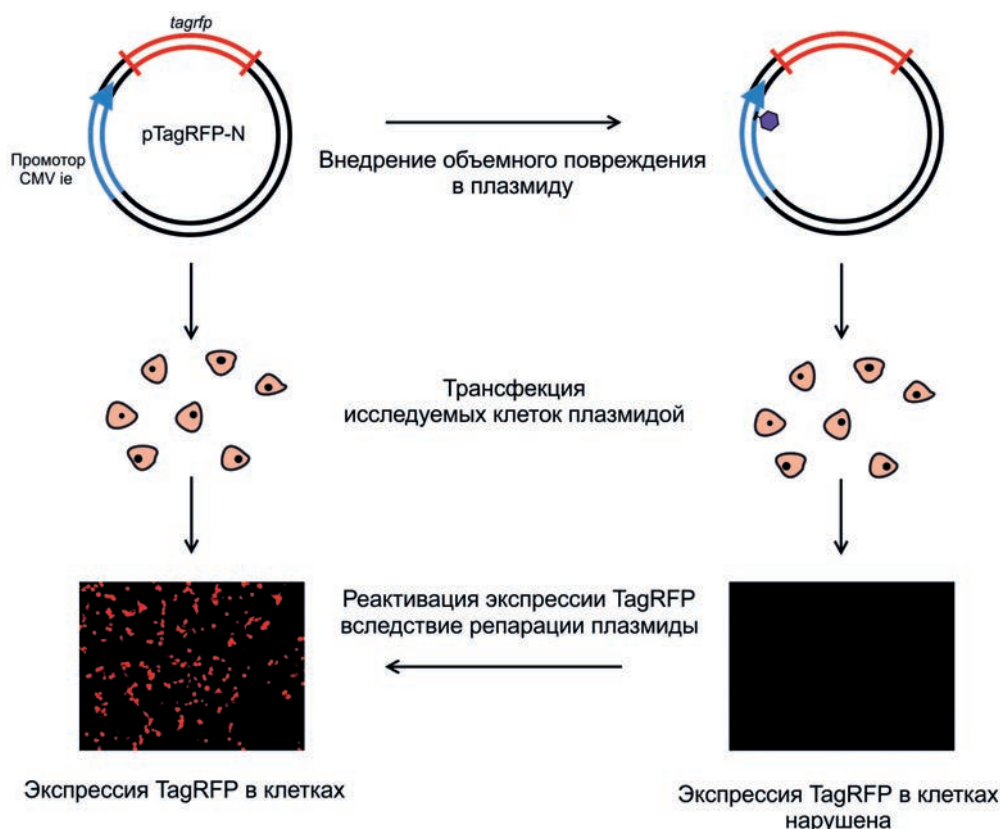


Рис. 4. Схематическое изображение способа определения эффективности функционирования NER *ex vivo*, основанного на реактивации экспрессии гена репортерного флуоресцентного белка в клетках хозяина. Адаптирован из [85]

не регистрируется. При удалении объемного повреждения происходит восстановление экспрессии TagRFP и появляется флуоресцентный сигнал.

Была проведена сравнительная оценка эффективности репарации плазмидных ДНК, содержащих синтетические объемные повреждения N-[2-[N-(4-азидо-2,5-дифторо-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил]аминоэтил], N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол (nFlu) и N-[6-(9-антраценилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол (nAnt), системой NER клеток HEK 293T. Появление флуоресцирующих клеток HEK 293T, трансфицированных nAnt-содержащей плазмидой, наступало спустя 10 часов после трансфекции, в то время как в случае клеток, трансфицированных плазмидой с nFlu, это время составило 8 часов. Таким образом, репарация плазмидной ДНК, содержащей nFlu, системой NER клеток HEK 293T проходила быстрее, чем репарация плазмидной ДНК, содержащей повреждение nAnt [85]. Ранее были исследованы субстратные свойства ДНК, содержащих эти объемные повреждения, в реакции специфической эксцизии, катализируемой белками NER-компетентных экстрактов, их влияние на структуру прилежа-

щей ДНК, а также эффективность их взаимодействия с XPD на этапе верификации [40, 45, 86]. Эффективность этапа первичного узнавания поврежденного участка, выраженная в уровне сродства XPC–ДНК, и эффективность специфической эксцизии nFlu и nAnt были практически одинаковы. Согласно данным моделирования, присутствие nFlu, в отличие от nAnt, не обеспечивало уровень дестабилизации ДНК-дуплекса, который был бы достаточен для формирования продуктивных для реакции NER комплексов XPC–ДНК [86]. Размер и расположение nFlu относительно повреждения допускали формирование как продуктивных, так и непродуктивных для NER комплексов. Однако сродство XPD к nFlu–ДНК было в 60 раз выше, чем сродство XPD к nAnt–ДНК [40]. Это, вероятно, увеличивало эффективность процессирования nFlu–ДНК и приводило к выравниванию уровня специфической эксцизии этих повреждений в процессе GG-NER.

Основанные на HCR подходы позволяют без использования радиоактивных меток оценивать в клетках эффективность процесса репарации в целом. Их развитие и применение позволит проводить мониторинг генотоксического воздействия лекарственных препаратов,

а также оценивать эффективность удаления не только объемных повреждений, но и повреждений, удаляемых белками системы BER [87, 88].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективная репарация ДНК рассматривается как один из факторов, определяющих высокую продолжительность жизни и устойчивость млекопитающих к онкологическим и нейродегенеративным заболеваниям [7, 89]. Широкая субстратная специфичность системы NER, большое количество белковых факторов и ферментов, разветвленный и многоэтапный механизм делают оценку эффективности функционирования этой системы достаточно сложной задачей. Проведение сравнительных исследований эффективности протекания NER в клетках долгоживущих и короткоживущих млекопитающих, а также в нормальных и раковых клетках поможет продвинуться в понимании молекулярных основ клеточного старения и онкоустойчивости. Разработка усовершенствованных методов оценки эффективности функционирования NER,

основанных на знании деталей механизма данного процесса, позволит с применением разных модельных систем провести исследования, которые обеспечат прогресс в оценке персонального репаративного статуса, а также мониторинга и прогнозирования эффектов химиотерапевтического воздействия при проведении противоопухолевой терапии.

Вклад авторов. А.А. Попов, И.О. Петрусева, Н.В. Наumenko — написание текста статьи, О.И. Лаврик — редактирование текста статьи, Н.В. Наumenko, А.А. Попов — графическое оформление статьи, И.О. Петрусева, О.И. Лаврик — руководство работой.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10056-П) и Проекта государственного задания ИХБФМ СО РАН (№ 121031300041-4, глава «Система эксцизионной репарации нуклеотидов»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chatterjee, N., and Walker, G. C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis, *Environ. Mol. Mutagen.*, **58**, 235-263, doi: 10.1002/em.22087.
2. Martens, M. C., Emmert, S., and Boeckmann, L. (2021) Xeroderma pigmentosum: gene variants and splice variants, *Genes*, **12**, 1173, doi: 10.3390/genes12081173.
3. Krasikova, Y., Rechkunova, N., and Lavrik, O. (2021) Nucleotide excision repair: from molecular defects to neurological abnormalities, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6220, doi: 10.3390/ijms22126220.
4. Paccosi, E., Balajee, A. S., and Proietti-De-Santis, L. (2022) A matter of delicate balance: loss and gain of Cockayne syndrome proteins in premature aging and cancer, *Front. Aging*, **3**, 960662, doi: 10.3389/fragi.2022.960662.
5. Ataabadi, E. A., Golshiri, K., Van Der Linden, J., De Boer, M., Duncker, D. J., Jüttner, A., De Vries, R., Van Veghel, R., Van Der Pluijm, I., Dutheil, S., Chalgeri, S., Zhang, L., Lin, A., Davis, R. E., Gretchen, S. L., Danser, J. H. A., and Roks, A. J. M. (2021) Vascular ageing features caused by selective DNA damage in smooth muscle cell, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2021**, 2308317, doi: 10.1155/2021/2308317.
6. Christmann, M., and Kaina, B. (2013) Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 8403-8420, doi: 10.1093/nar/gkt635.
7. MacRae, S. L., Croken, M. M., Calder, R. B., Aliper, A., Milholland, B., White, R. R., Zhavoronkov, A., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., Gorbunova, V., Zhang, Z. D., and Vijg, J. (2015) DNA repair in species with extreme lifespan differences, *Aging (Albany NY)*, **7**, 1171-1184, doi: 10.18632/aging.100866.
8. Figueroa-Gonzalez, G., and Perez-Plasencia, C. (2017) Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer, *Oncol. Lett.*, **13**, 3982-3988, doi: 10.3892/ol.2017.6002.
9. Van den Heuvel, D., van der Weegen, Y., Boer, D. E. C., Ogi, T., and Luijsterburg, M. S. (2021) Transcription-coupled DNA repair: from mechanism to human disorder, *Trends Cell Biol.*, **31**, 359-371, doi: 10.1016/j.tcb.2021.02.007.
10. Kobaisi, F., Fayyad, N., Rezvani, H. R., Fayyad-Kazan, M., Sulpice, E., Badran, B., Fayyad-Kazan, H., Gidrol, X., and Rachidi, W. (2019) Signaling pathways, chemical and biological modulators of nucleotide excision repair: the faithful shield against

- UV genotoxicity, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 4654206, doi: 10.1155/2019/4654206.
11. Le, J., and Min, J. H. (2023) Structural modeling and analyses of genetic variations in the human XPC nucleotide excision repair protein, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1-28, doi: 10.1080/07391102.2023.2177349.
 12. Zebian, A., Shaito, A., Mazurier, F., Rezvani, H. R., and Zibara, K. (2019) XPC beyond nucleotide excision repair and skin cancers, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **782**, 108286, doi: 10.1016/j.mrrev.2019.108286.
 13. Yokoi, M., and Hanaoka, F. (2017) Two mammalian homologs of yeast Rad23, HR23A and HR23B, as multifunctional proteins, *Gene*, **597**, 1-9, doi: 10.1016/j.gene.2016.10.027.
 14. Grønbaek-Thygesen, M., Kampmeyer, C., Hofmann, K., and Hartmann-Petersen, R. (2023) The moonlighting of RAD23 in DNA repair and protein degradation, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1866**, 194925, doi: 10.1016/j.bbagr.2023.194925.
 15. Rechkunova, N. I., Krasikova, Y. S., and Lavrik, O. I. (2021) Interactome of base and nucleotide excision DNA repair systems, *Mol. Biol. (Moscow)*, **55**, 155-166, doi: 10.1134/S0026893321020126.
 16. Feltes, B. C. (2021) Every protagonist has a sidekick: structural aspects of human xeroderma pigmentosum-binding proteins in nucleotide excision repair, *Protein Sci.*, **30**, 2187-2205, doi: 10.1002/pro.4173.
 17. Zhang, W., Shi, E., Zhao, Y., and Yang, B. (2018) Modulation effect of double strand DNA on the self-assembly of N-terminal domain of *Euplotes octocarinatus* centrin, *J. Inorg. Biochem.*, **180**, 15-25, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.12.001.
 18. Paul, D., Mu, H., Zhao, H., Ouerfelli, O., Jeffrey, P. D., Broyde, S., and Min, J. H. (2019) Structure and mechanism of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by the Rad4/XPC nucleotide excision repair complex, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 6015-6028, doi: 10.1093/nar/gkz359.
 19. Apelt, K., Lans, H., Schärer, O. D., and Luijsterburg, M. S. (2021) Nucleotide excision repair leaves a mark on chromatin: DNA damage detection in nucleosomes, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 7925-7942, doi: 10.1007/s00018-021-03984-7.
 20. Boetefuer, E. L., Lake, R. J., and Fan, H. Y. (2018) Mechanistic insights into the regulation of transcription and transcription-coupled DNA repair by Cockayne syndrome protein B, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 7471-7479, doi: 10.1093/nar/gky660.
 21. Lans, H., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeulen, W., and Marteijn, J. A. (2019) The DNA damage response to transcription stress, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 766-784, doi: 10.1038/s41580-019-0169-4.
 22. Van der Weegen, Y., Golan-Berman, H., Mevissen, T. E. T., Apelt, K., González-Prieto, R., Goedhart, J., Heilbrun, E. E., Vertegaal, A. C. O., van den Heuvel, D., Walter, J. C., Adar, S., and Luijsterburg, M. S. (2020) The cooperative action of CSB, CSA, and UVSSA target TFIIH to DNA damage-stalled RNA polymerase II, *Nat. Commun.*, **11**, 2104, doi: 10.1038/s41467-020-15903-8.
 23. Xu, J., Lahiri, I., Wang, W., Wier, A., Cianfrocco, M. A., Chong, J., Hare, A. A., Dervan, P. B., DiMaio, F., Leschziner, A. E., and Wang, D. (2017) Structural basis for eukaryotic transcription-coupled DNA repair initiation, *Nature*, **551**, 653-657, doi: 10.1038/nature24658.
 24. Kokic, G., Wagner, F. R., Chernev, A., Urlaub, H., and Cramer, P. (2021) Structural basis of human transcription-DNA repair coupling, *Nature*, **598**, 368-372, doi: 10.1038/s41586-021-03906-4.
 25. Fischer, E. S., Scrima, A., Böhm, K., Matsumoto, S., Lingaraju, G. M., Faty, M., Yasuda, T., Cavadini, S., Wakasugi, M., Hanaoka, F., Iwai, S., Gut, H., Sugawara, K., and Thomä, N. H. (2011) The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation, *Cell*, **147**, 1024-1039, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.035.
 26. Kim, J., Li, C. L., Chen, X., Cui, Y., Golebiowski, F. M., Wang, H., Hanaoka, F., Sugawara, K., and Yang, W. (2023) Lesion recognition by XPC, TFIIH and XPA in DNA excision repair, *Nature*, **617**, 170-175, doi: 10.1038/s41586-023-05959-z.
 27. Kuper, J., and Kisker, C. (2021) Three targets in one complex: A molecular perspective of TFIIH in cancer therapy, *DNA Repair (Amst)*, **105**, 103143, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103143.
 28. Tsutakawa, S. E., Tsai, C. L., Yan, C., Bralić, A., Chazin, W. J., Hamdan, S. M., Schärer, O. D., Ivanov, I., and Tainer, J. A. (2020) Envisioning how the prototypic molecular machine TFIIH functions in transcription initiation and DNA repair, *DNA Repair (Amst)*, **96**, 102972, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102972.
 29. Greber, B. J., Toso, D. B., Fang, J., and Nogales, E. (2019) The complete structure of the human TFIIH core complex, *Elife*, **12**, e44771, doi: 10.7554/eLife.44771.
 30. Kokic, G., Chernev, A., Tegunov, D., Dienemann, C., Urlaub, H., and Cramer, P. (2019) Structural basis of TFIIH activation for nucleotide excision repair, *Nat. Commun.*, **10**, 2885, doi: 10.1038/s41467-019-10745-5.
 31. Kim, M., Kim, H. S., D'Souza, A., Gallagher, K., Jeong, E., Topolska-Wós, A., Ogorodnik Le Meur, K., Tsai, C. L., Tsai, M. S., Kee, M., Tainer, J. A., Yeo, J. E., Chazin, W. J., and Schärer, O. D. (2022) Two interaction surfaces between XPA and RPA organize the preincision complex in nucleotide excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2207408119, doi: 10.1073/pnas.2207408119.
 32. Krasikova, Y. S., Lavrik, O. I., and Rechkunova, N. I. (2022) The XPA protein-life under precise control, *Cells*, **11**, 3723, doi: 10.3390/cells11233723.

33. Van den Heuvel, D., Kim, M., Wondergem, A. P., van der Meer, P. J., Witkamp, M., Lambregtse, F., Kim, H. S., Kan, F., Apelt, K., Kragten, A., González-Prieto, R., Vertegaal, A. C. O., Yeo, J. E., Kim, B. G., van Doorn, R., Schärer, O. D., and Luijsterburg, M. S. (2023) A disease-associated XPA allele interferes with TFIIH binding and primarily affects transcription-coupled nucleotide excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2208860120, doi: 10.1073/pnas.2208860120.
34. Li, C. L., Golebiowski, F. M., Onishi, Y., Samara, N. L., Sugawara, K., and Yang, W. (2015) Tripartite DNA lesion recognition and verification by XPC, TFIIH, and XPA in nucleotide excision repair, *Mol. Cell.*, **59**, 1025-1034, doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.012.
35. Kemp, M. G., and Hu, J. (2017) Postexcision events in human nucleotide excision repair, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 178-191, doi: 10.1111/php.12641.
36. González-Corrochano, R., Ruiz, F. M., Taylor, N. M. I., Huecas, S., Drakulic, S., Spínola-Amilibia, M., and Fernández-Tornero, C. (2020) The crystal structure of human XPG, the xeroderma pigmentosum group G endonuclease, provides insight into nucleotide excision DNA repair, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 9943-9958, doi: 10.1093/nar/gkaa688.
37. Muniesa-Vargas, A., Theil, A. F., Ribeiro-Silva, C., Vermeulen, W., and Lans, H. (2022) XPG: a multi-tasking genome caretaker, *Cell. Mol. Life Sci.*, **79**, 166, doi: 10.1007/s00018-022-04194-5.
38. Hu, J., Choi, J. H., Gaddameedhi, S., Kemp, M. G., Reardon, J. T., and Sancar, A. (2013) Nucleotide excision repair in human cells: fate of the excised oligonucleotide carrying DNA damage *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 20918-20926, doi: 10.1074/jbc.M113.482257.
39. Krasikova, Y. S., Rechkunova, N. I., Maltseva, E. A., Pestryakov, P. E., Petruseva, I. O., Sugawara, K., Chen, X., Min, J. H., and Lavrik, O. I. (2013) Comparative analysis of interaction of human and yeast DNA damage recognition complexes with damaged DNA in nucleotide excision repair, *J. Biol. Chem.*, **288**, 10936-10947, doi: 10.1074/jbc.M112.444026.
40. Petruseva, I., Naumenko, N., Kuper, J., Anarbaev, R., Kappenberger, J., Kisker, C., and Lavrik, O. (2021) The interaction efficiency of XPD-p44 with bulky DNA damages depends on the structure of the damage, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 617160, doi: 10.3389/fcell.2021.617160.
41. Barnett, J., Kuper, J., Koelmel, W., Kisker, C., and Kad, N. (2019) The TFIIH subunits p44/p62 act as a damage sensor during nucleotide excision repair, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 12689-12696, doi: 10.1093/nar/gkaa973.
42. Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protić, M., Hübscher, U., Egly, J. M., and Wood, R. D. (1995) Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components, *Cell*, **80**, 859-868, doi: 10.1016/0092-8674(95)90289-9.
43. Szeltner, Z., Póti, A., Harami, G. M., Kovács, M., and Szüts, D. (2021) Evaluation and modulation of DNA lesion bypass in an SV40 large T antigen-based in vitro replication system, *FEBS Open Bio*, **11**, 1054-1075, doi: 10.1002/2211-5463.13099.
44. Du, H., Wang, P., Li, L., and Wang, Y. (2019) Repair and translesion synthesis of O6-alkylguanine DNA lesions in human cells, *J. Biol. Chem.*, **294**, 11144-11153, doi: 10.1074/jbc.RA119.009054.
45. Evdokimov, A., Petruseva, I., Tsidulko, A., Koroleva, L., Serpokrylova, I., Silnikov, V., and Lavrik, O. (2013) New synthetic substrates of mammalian nucleotide excision repair system, *Nucleic Acids Res.*, **41**, e123, doi: 10.1093/nar/gkt301.
46. Hilton, B., Gopal, S., Xu, L., Mazumder, S., Musich, P. R., Cho, B. P., and Zou, Y. Z. (2016) Dissociation dynamics of XPC-RAD23B from damaged DNA is a determining factor of NER efficiency, *PLoS One*, **11**, e0157784, doi: 10.1371/journal.pone.0157784.
47. Naumenko, N., Petruseva, I., Lomzov, A., and Lavrik, O. (2021) Recognition and removal of clustered DNA lesions via nucleotide excision repair, *DNA Repair (Amst)*, **108**, 103225, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103225.
48. Huang, J. C., and Sancar, A. (1994) Determination of minimum substrate size for human excinuclease, *J. Biol. Chem.*, **269**, 19034-19040, doi: 10.1016/S0021-9258(17)32270-6.
49. Hess, M. T., Gunz, D., Luneva, N., Geacintov, N. E., and Naegeli, H. (1997) Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes, *Mol. Cell Biol.*, **17**, 7069-7076, doi: 10.1128/MCB.17.12.7069.
50. Gillet, L. C., Alzeer, J., and Schärer, O. D. (2005) Site-specific incorporation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1961-1969, doi: 10.1093/nar/gki335.
51. Dezhurov, S. V., Khodyreva, S. N., Plekhanova, E. S., and Lavrik, O. I. (2005) A new highly efficient photoreactive analogue of dCTP. Synthesis, characterization, and application in photoaffinity modification of DNA binding proteins, *Bioconjug. Chem.*, **16**, 215-222, doi: 10.1021/bc0497867.
52. Lukyanchikova, N. V., Petruseva, I. O., Evdokimov, A. N., Silnikov, V. N., and Lavrik, O. I. (2016) DNA with damage in both strands as affinity probes and nucleotide excision repair substrates, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 263-274, doi: 10.1134/S0006297916030093.
53. Kolbanovskiy, M., Aharonoff, A., Sales, A. H., Geacintov, N. E., and Shafirovich, V. (2020) Remarkable enhancement of nucleotide excision repair of a bulky guanine lesion in a covalently closed circular DNA plasmid relative to the same linearized plasmid,

- Biochemistry*, **59**, 2842-2848, doi: 10.1021/acs.biochem.0c00441.
54. Emerson, C. H., Lopez, C. R., Ribes-Zamora, A., Polleys, E. J., Williams, C. L., Yeo, L., Zaneveld, J. E., Chen, R., and Bertuch, A. A. (2018) Ku DNA end-binding activity promotes repair fidelity and influences end-processing during nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **209**, 115-128, doi: 10.1534/genetics.117.300672.
 55. Geacintov, N. E., and Broyde, S. (2017) Repair-resistant DNA lesions, *Chem. Res. Toxicol.*, **30**, 1517-1548, doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00128.
 56. Evdokimov, A., Kutuzov, M., Petrusheva, I., Lukjanchikova, N., Kashina, E., Kolova, E., Zemerova, T., Romanenko, S., Perelman, P., Prokopov, D., Seluanov, A., Gorbunova, V., Graphodatsky, A., Trifonov, V., Khodyreva, S., and Lavrik, O. (2018) Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells, *Aging (Albany NY)*, **10**, 1454-1473, doi: 10.18632/aging.101482.
 57. Liu, Z., Ding, S., Kropachev, K., Lei, J., Amin, S., Broyde, S., and Geacintov, N. E. (2015) Resistance to nucleotide excision repair of bulky guanine adducts opposite abasic sites in DNA duplexes and relationships between structure and function, *PLoS One*, **10**, e0142068, doi: 10.1371/journal.pone.0137124.
 58. Song, J., Kemp, M. G., and Choi, J. H. (2017) Detection of the excised, damage-containing oligonucleotide products of nucleotide excision repair in human cells, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 192-198, doi: 10.1111/php.12638.
 59. Lukyanchikova, N. V., Petrusheva, I. O., Evdokimov, A. N., Koroleva, L. S., and Lavrik, O. I. (2018) DNA bearing bulky fluorescent and photoreactive damage in both strands as substrates of the nucleotide excision repair system, *Mol. Biol. (Moscow)*, **52**, 237-246, doi: 10.1134/S0026893318020061.
 60. Govan, H. L., Valles-Ayoub, Y., and Braun, J. (1990) Fine-mapping of DNA damage and repair in specific genomic segments, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3823-3830, doi: 10.1093/nar/18.13.3823.
 61. Chesner, L. N., and Campbell, C. (2018) A quantitative PCR-based assay reveals that nucleotide excision repair plays a predominant role in the removal of DNA-protein crosslinks from plasmids transfected into mammalian cells, *DNA Repair (Amst)*, **62**, 18-27, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.01.004.
 62. Shen, J. C., Fox, E. J., Ahn, E. H., and Loeb, L. A. (2014) A rapid assay for measuring nucleotide excision repair by oligonucleotide retrieval, *Sci. Rep.*, **4**, 4894, doi: 10.1038/srep04894.
 63. Aloisi, C. M. N., Nilforoushan, A., Ziegler, N., and Sturla, S. J. (2020) Sequence-specific quantitation of mutagenic DNA damage via polymerase amplification with an artificial nucleotide, *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 6962-6969, doi: 10.1021/jacs.9b11746.
 64. Jennerwein, M. M., and Eastman, A. (1991) A polymerase chain reaction-based method to detect cisplatin adducts in specific genes, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6209-6214, doi: 10.1093/nar/19.22.6209.
 65. Kalinowski, D. P., Illenye, S., and Van Houten, B. (1992) Analysis of DNA damage and repair in murine leukemia L1210 cells using a quantitative polymerase chain reaction assay, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3485-3494, doi: 10.1093/nar/20.13.3485.
 66. Azqueta, A., Langie, S. A. S., Boutet-Robinet, E., Duthie, S., Ladeira, C., Møller, P., Collins, A. R., and Godschalk, R. W. L. (2019) DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches, *Mutat. Res.*, **781**, 71-87, doi: 10.1016/j.mrrev.2019.03.002.
 67. Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.*, **26**, 249-261, doi: 10.1385/MB:26:3:249.
 68. Vodenkova, S., Azqueta, A., Collins, A., Dusinska, M., Gaivão, I., Møller, P., Opattova, A., Vodicka, P., Godschalk, R. W. L., and Langie, S. A. S. (2020) An optimized comet-based *in vitro* DNA repair assay to assess base and nucleotide excision repair activity, *Nat. Protoc.*, **15**, 3844-3878, doi: 10.1038/s41596-020-0401-x.
 69. Vodicka, P., Vodenkova, S., Opattova, A., and Vodickova, L. (2019) DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **843**, 95-110, doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.05.009.
 70. Speit, G., Leibiger, C., Kuehner, S., and Högel, J. (2013) Further investigations on the modified comet assay for measuring aphidicolin-block nucleotide excision repair, *Mutagenesis*, **28**, 145-151, doi: 10.1093/mutage/ges063.
 71. Ge, J., Ngo, L. P., Kaushal, S., Tay, I. J., Thadhani, E., Kay, J. E., Mazzucato, P., Chow, D. N., Fessler, J. L., Weingeist, D. M., Sobol, R. W., Samson, L. D., Floyd, S. R., and Engelward, B. P. (2021) CometChip enables parallel analysis of multiple DNA repair activities, *DNA Repair (Amst)*, **106**, 103176, doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103176.
 72. Valdíglesias, V., Sánchez-Flores, M., Fernández-Bertólez, N., Au, W., Pásaro, E., and Laffon, B. (2020) Expanded usage of the Challenge-Comet assay as a DNA repair biomarker in human populations: protocols for fresh and cryopreserved blood samples, and for different challenge agents, *Arch. Toxicol.*, **94**, 4219-4228, doi: 10.1007/s00204-020-02881-5.
 73. Cipollini, M., He, J., Rossi, P., Baronti, F., Micheli, A., Rossi, A. M., and Barale, R. (2006) Can individual repair kinetics of UVC-induced DNA damage in human lymphocytes be assessed through the comet assay? *Mutat. Res.*, **601**, 150-161, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2006.06.004.
 74. Vande Loock, K., Decordier, I., Ciardelli, R., Haumont, D., and Kirsch-Volders, M. (2010)

- An aphidicolin-block nucleotide excision repair assay measuring DNA incision and repair capacity, *Mutagenesis*, **25**, 25-32, doi: 10.1093/mutage/geb039.
75. Muruzabal, D., Sanz-Serrano, J., Sauvaigo, S., Gützkow, K. B., López de Cerain, A., Vettorazzi, A., and Azqueta, A. (2020) Novel approach for the detection of alkylated bases using the enzyme-modified comet assay, *Toxicol. Lett.*, **330**, 108-117, doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.021.
 76. Ngo, L. P., Owiti, N. A., Swartz, C., Winters, J., Su, Y., Ge, J., Xiong, A., Han, J., Recio, L., Samson, L. D., and Engelward, B. P. (2020) Sensitive CometChip assay for screening potentially carcinogenic DNA adducts by trapping DNA repair intermediates, *Nucleic Acids Res.*, **48**, e13, doi: 10.1093/nar/gkz1077.
 77. Ge, J., Prasongtanakij, S., Wood, D. K., Weingeist, D. M., Fessler, J., Navasummrit, P., Ruchirawat, M., and Engelward, B. P. (2014) CometChip: a high-throughput 96-well platform for measuring DNA damage in microarrayed human cells, *J. Vis. Exp.*, **92**, e50607, doi: 10.3791/50607.
 78. Azqueta, A., Ladeira, C., Giovannelli, L., Boutet-Robinet, E., Bonassi, S., Neri, M., Gajski, G., Duthie, S., Del Bo', C., Riso, P., Koppen, G., Basaran, N., Collins, A., and Møller, P. (2020) Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **783**, 108288, doi: 10.1016/j.mrrev.2019.108288.
 79. Athas, W. F., Hedayati, M. A., Matanoski, G. M., Farmer, E. R., and Grossman, L. (1991) Development and field-test validation of an assay for DNA repair in circulating human lymphocytes, *Cancer Res.*, **51**, 5786-5793.
 80. Chu, G., and Chang, E. (1988) Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA, *Science*, **242**, 564-567, doi: 10.1126/science.3175673.
 81. Qiao, Y., Spitz, M. R., Guo, Z., Hedayati, M., Grossman, L., Kraemer, K. H., and Wei, Q. (2002) Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes, *Mutat. Res.*, **509**, 165-174, doi: 10.1016/s0027-5107(02)00219-1.
 82. Roguev, A., and Russev, G. (2000) Two-wavelength fluorescence assay for DNA repair, *Anal. Biochem.*, **287**, 313-318, doi: 10.1006/abio.2000.4865.
 83. Burger, K., Matt, K., Kieser, N., Gebhard, D., and Bergemann, J. (2010) A modified fluorimetric host cell reactivation assay to determine the repair capacity of primary keratinocytes, melanocytes and fibroblasts, *BMC Biotechnol.*, **10**, 46, doi: 10.1186/1472-6750-10-46.
 84. Kitsera, N., Rodriguez-Alvarez, M., Emmert, S., Carell, T., and Khobta, A. (2019) Nucleotide excision repair of abasic DNA lesions, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 8537-8547, doi: 10.1093/nar/gkz558.
 85. Popov, A. A., Orishchenko, K. E., Naumenko, K. N., Evdokimov, A. N., Petruseva, I. O., and Lavrik, O. I. (2021) A method for assessing the efficiency of the nucleotide excision repair system *ex vivo*, *Acta Naturae*, **13**, 122-125, doi: 10.32607/actanaturae.11430.
 86. Evdokimov, A. N., Tsidulko, A. N., Popov, A. V., Vorobiev, Y. N., Lomzov, A. A., Koroleva, L. S., Silnikov, V. N., Petruseva, I. O., and Lavrik, O. I. (2018) Structural basis for the recognition and processing of DNA containing bulky lesions by the mammalian nucleotide excision repair system, *DNA Repair (Amst)*, **61**, 86-98, doi: 10.1016/j.dnarep.2017.10.010.
 87. Pielt, C. G., Pecan, T. J., Laverty, D. J., and Nagel, Z. D. (2021) Large-scale preparation of fluorescence multiplex host cell reactivation (FM-HCR) reporters, *Nat. Protoc.*, **16**, 4265-4298, doi: 10.1038/s41596-021-00577-3.
 88. Kitsera, N., Stathis, D., Lühnsdorf, B., Müller, H., Carell, T., Epe, B., and Khobta, A. (2011) 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5926-5934, doi: 10.1093/nar/gkr163.
 89. Kogan, V., Molodtsov, I., Menshikov, L. I., Reis, R. J. S., and Fedichev, P. (2015) Stability analysis of a model gene network links aging, stress resistance, and negligible senescence, *Sci. Rep.*, **5**, 13589, doi: 10.1038/srep13589.

NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR. METHODS OF DETERMINATION THE EFFICIENCY FUNCTIONING

Review

A. A. Popov¹, I. O. Petruseva¹, N. V. Naumenko¹, and O. I. Lavrik^{1,2*}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

² Novosibirsk National Research State University, 630090 Novosibirsk, Russia

The nucleotide excision repair (NER) system is responsible for removing a wide range of bulky damages from DNA, making a significant contribution to maintaining the stability of the genome. The efficiency with which the proteins of the NER system recognize and remove bulky damages depends on many factors and has important clinical and diagnostic significance. The review examines the current understanding of the molecular basis of the functioning of the NER system in eukaryotic cells, as well as analyzes the methods and approaches that are used to study the efficiency functioning of this DNA repair system both *in vitro* and *ex vivo*.

Keywords: nucleotide excision repair, DNA damages, methods for determining NER activity

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА Т-ЛИМФОЦИТОВ И МЕТОДЫ ИХ РЕГУЛЯЦИИ

Обзор

© 2023 В.В. Власова^{**}, К.В. Шмагель[#]

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН»,
614081 Пермь, Россия; электронная почта: violetbaudelaire73@gmail.com*

Поступила в редакцию 28.04.2023

После доработки 21.07.2023

Принята к публикации 27.08.2023

Т-Лимфоциты играют ведущую роль в реализации иммунного ответа. В ходе жизнедеятельности Т-клетки проходят через целый ряд функциональных состояний: покой, активация, пролиферация, дифференцировка, реализация эффекторных и регуляторных функций, апоптоз и формирование памяти. Метаболизм поддерживает все функции Т-лимфоцитов, обеспечивая их энергией, биосинтетическими субстратами и сигнальными молекулами. Поэтому переход Т-клеток из одного функционального состояния в другое, как правило, сопровождается перестройкой обменных процессов. Тесная связь между метаболизмом и функцией Т-лимфоцитов дает основания полагать, что, воздействуя на обменные процессы в Т-клетках, можно управлять иммунным ответом. Настоящий обзор призван осветить ключевые метаболические адаптации, поддерживающие функции Т-лимфоцитов, а также возможности воздействия на обменные процессы в Т-клетках для регуляции работы иммунной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Т-лимфоциты, метаболизм, гликолиз, ЦТК, окислительное фосфорилирование, митохондрии, пролиферация, дифференцировка, иммунологическая память, истощение.

DOI: 10.31857/S0320972523110167, **EDN:** MMRMGN

ВВЕДЕНИЕ

В настоящий момент общепризнанно, что функции всех эукариотических клеток обеспечиваются метаболизмом [1]. Клетки иммунной системы не являются исключением. Для поддержания гомеостаза организма иммунокомпетентные клетки выполняют множество функций: продуцируют цитотоксические гранулы, антимикробные пептиды и цитокины, фагоцитируют чужеродные объекты и погибшие клетки, презентруют антигены и производят антитела. Реализация этих задач требует энергии, биосинтетических субстратов и сигнальных молекул, образуемых в ходе метаболизма. Поэтому за каждой функцией иммунокомпетентных клеток, как правило, стоит уникальный метаболический профиль [2].

Среди иммунокомпетентных клеток наиболее сложной и гетерогенной популяцией являются Т-лимфоциты. Принято выделять две крупные субпопуляции Т-клеток – CD4-позитивные Т-хелперы и цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты. Обе субпопуляции состоят из клеток различной степени дифференцировки: наивных Т-лимфоцитов, Т-эффекторов и Т-клеток памяти [3]. CD4⁺ Т-клетки, обладающие эффекторными функциями, могут быть разделены на Th1-, Th2- и Th17-лимфоциты [4]. Кроме того, существуют регуляторные Т-лимфоциты (Трег), выполняющие важную роль в подавлении иммунных реакций [5]. Перечисленные субпопуляции Т-клеток различаются не только по функциональной направленности и экспрессии поверхностных маркеров, но и по метаболическим характеристикам [6, 7].

Принятые сокращения: Трег – регуляторные Т-лимфоциты; АМРК – АМР-активируемая протеинкиназа; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1; PD-L – лиганды PD-1.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

Иммунный ответ, реализуемый Т-лимфоцитами, также требует включения целого ряда фундаментальных процессов, характерных для большинства клеток организма: пролиферации, дифференцировки, апоптоза [8]. При этом наблюдается выраженная перестройка метаболизма. При хронических инфекциях или длительной персистенции антигена Т-лимфоциты могут подвергаться истощению [9, 10]. Другими словами, при иммунном ответе Т-клетки проходят через множество функциональных состояний, требующих для их реализации установления оптимального метаболического статуса.

Тесная связь между метаболизмом и функцией Т-лимфоцитов дает основания полагать, что через обменные процессы можно объективно воздействовать на Т-клеточный иммунный ответ. Развитие этого вектора исследований может привести к появлению терапевтических препаратов с известным и точным механизмом действия, изменяющих иммунный ответ в нужном направлении. Разработка подобных препаратов актуальна для целого ряда заболеваний: онкологических, аутоиммунных, инфекционных. Настоящий обзор призван осветить ключевые метаболические адаптации, поддерживающие функции Т-лимфоцитов, а также возможности воздействия на обменные процессы в Т-клетках для регуляции работы иммунной системы.

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Ключевым этапом Т-клеточного иммунного ответа является клональная экспансия, то есть пролиферация антигенспецифичных клеток. Необходимость в делении продиктована клональной природой Т-лимфоцитов: при проникновении антигена в организм число специфичных к нему клеток слишком мало для реализации эффективного иммунного ответа [11]. Лимфоциты, распознавшие презентируемый им чужеродный пептид, преодолевают данное ограничение путем многократного митотического деления. Как правило, митоз сопровождается метаболической ассимиляцией, в ходе которой усиливается синтез энергии, а также нуклеиновых кислот, белков и липидов — «строительных материалов» для генетического аппарата, органелл и мембран дочерней клетки [12]. При этом способность клетки активно производить макромолекулы прямо влияет на возможность завершения деления: в большинстве случаев клетки

с дефицитом липидов [13], нуклеотидов [14] и аминокислот [15] подвергаются аресту клеточного цикла. Скорость и эффективность иммунного ответа во многом определяются пролиферативным потенциалом Т-лимфоцитов. Поэтому в делящихся Т-клетках метаболические пути всегда адаптированы к активному биосинтезу.

При пролиферации Т-лимфоцитов важным источником биосинтеза и энергии является глюкоза. Процесс окисления глюкозы — гликолиз — представляет собой комплекс из десяти последовательных ферментативных реакций, промежуточные продукты которых нередко выступают субстратами в побочных биосинтетических путях (рис. 1). Так, глюкозо-6-фосфат может служить источником углерода в пентозофосфатном пути, обеспечивающим клетку 5-фосфорибозилпирофосфатом — важным компонентом пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов [16]. Другой промежуточный продукт гликолиза — 3-фосфоглицерат — может быть предшественником цистеина, серина и глицина, участвующих в синтезе белков и нуклеотидов [17]. Кроме того, конечный продукт гликолиза — пировиноградная кислота — может преобразовываться в аминокислоту аланин [18]. Третьим классом соединений, продуцируемых из метаболитов гликолитического пути, являются глицеролипиды [19]. Их источником служит дигидроксиацетонфосфат — предшественник глицерол-3-фосфата.

Углерод, поступающий с глюкозой, необходим для протекания многих биосинтетических процессов, поэтому ее потребление и окисление в пролиферирующих Т-лимфоцитах существенно усиливается [20]. Полное окисление глюкозы завершается формированием двух молекул АТФ и двух молекул пировиноградной кислоты, которые могут подвергаться либо окислению, либо восстановлению. Как правило, в присутствии кислорода пировиноградная кислота окисляется под действием пируватдегидрогеназного мультиферментного комплекса и формирует ацетил-коэнзим А (ацетил-КоА) [21]. Образованный ацетил-КоА служит источником углерода в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), функционирование которого сопряжено с синтезом 36 молекул АТФ на одну молекулу глюкозы. Однако данное правило не распространяется на делящиеся Т-лимфоциты [22]: несмотря на наличие кислорода в среде, такие клетки преобразуют большую часть глюкозы в молочную кислоту (рис. 1). В этом случае энергетический выход гликолиза на одну молекулу глюкозы

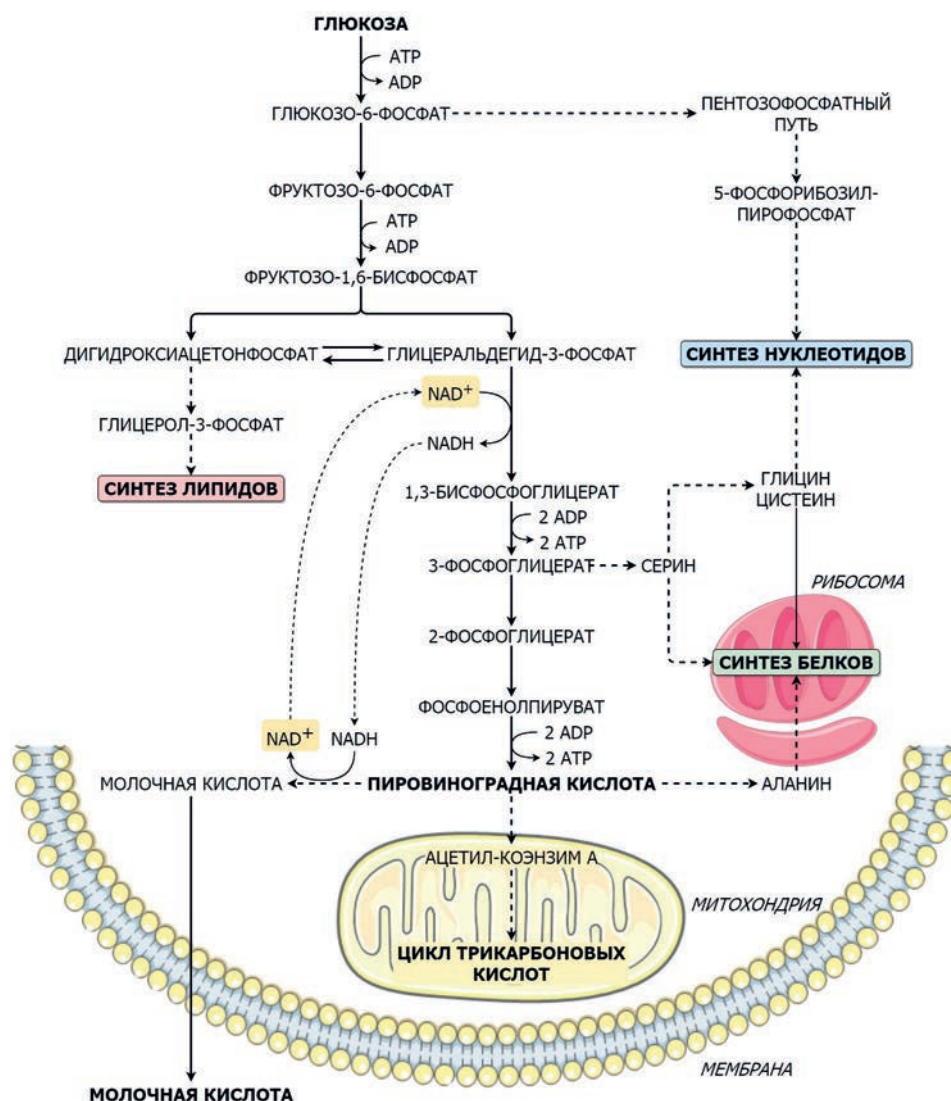


Рис. 1. Продукты гликолитических реакций и их роль в биосинтетических процессах при делении Т-лимфоцитов

существенно снижается и составляет две молекулы АТФ. В литературе данный феномен обозначается термином «аэробный гликолиз».

Использование аэробного гликолиза в качестве основного пути метаболизма глюкозы при пролиферации на первый взгляд кажется контрпродуктивным. В таком случае только около 7% углерода, поступающего с глюкозой, вовлечены в образование макромолекул [23]. Более 90% расходуется на продукцию молочной кислоты, которая экскретируется во внеклеточное пространство [24]. Тем не менее делящиеся Т-лимфоциты используют такой «расточительный» тип метаболизма для достижения важной цели — увеличения интенсивности гликолиза [25]. Существует целый ряд факторов, способных ограничить скорость гликолиза в клетке. Одним из основных является накопление конечного продукта гликолиза — пировиноградной кислоты [26].

В покое Т-лимфоциты поддерживают гликолитическую активность, преимущественно окисляя этот продукт в ЦТК. Однако количество пировиноградной кислоты, которую можно реализовать таким способом, ограничено дыхательной емкостью митохондрий [27]. Пролиферирующие клетки снимают данное ограничение, преобразуя избыток пировиноградной кислоты в молочную и транспортируя ее во внеклеточное пространство [26]. Другим фактором, ограничивающим гликолитическую активность, является содержание окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида (NAD^+) в цитоплазме. Полное окисление одной молекулы глюкозы требует двух молекул NAD^+ , служащих кофакторами при превращении глицераальдегид-3-фосфата в 1,3-бисфосфоглицериновую кислоту [28]. В ходе реакции NAD^+ переходит в восстановленную форму (NADH), поэтому

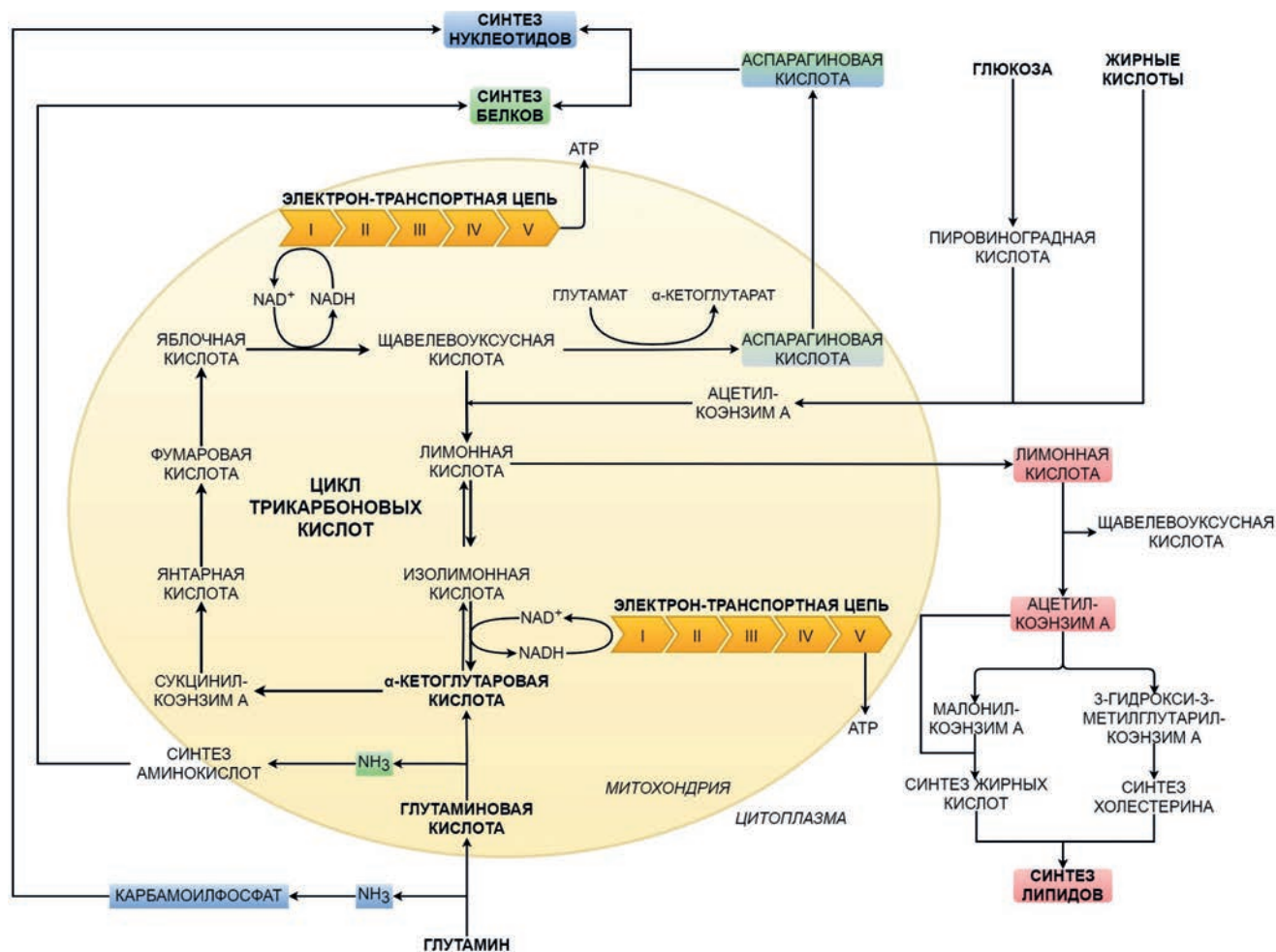


Рис. 2. Промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот и их роль в биосинтетических процессах

повторение гликолиза требует окисления кофермента. В пролиферирующих клетках регенерация цитозольного NAD^+ происходит при окислении NADH в ходе реакции восстановления пировиноградной кислоты [29]. Таким образом, аэробный гликолиз исключает воздействие двух факторов, ограничивающих скорость окисления глюкозы: избытка пирувата и дефицита NAD^+ . В результате в пролиферирующих Т-лимфоцитах увеличивается продукция АТФ вне митохондрий, а поток углерода через гликолитический путь и сопряженные с ним биосинтетические процессы существенно возрастает [30].

Активность митохондрий при пролиферации Т-клеток также существенно усиливается и дополняет гликолиз при синтезе макромолекул и энергии [31]. Так, в Т-лимфоцитах уже через 4 часа митогенной стимуляции возрастает концентрация промежуточных продуктов ЦТК [32]. ЦТК представляет собой узел пересечения большинства метаболических путей, в котором разнообразные углеродные суб-

страты — производные глюкозы, глутамин и жирных кислот — участвуют в восстановлении доноров электронов для дыхательной цепи. Помимо этого, ЦТК является важным источником метаболических субстратов, необходимых для синтеза аминокислот, липидов и нуклеотидов (рис. 2) [33]. Так, лимонная кислота, формируемая в первой реакции ЦТК при взаимодействии щавелевоуксусной кислоты и ацетил-КоА, участвует в *de novo* синтезе жирных кислот. Образованная в митохондриях лимонная кислота транспортируется в цитоплазму, где подвергается ферментативному расщеплению на исходные соединения: ацетил-КоА и щавелевоуксусную кислоту [34]. В цитоплазме ацетил-КоА превращается в малонил-КоА, осуществляющий удлинение углеродной цепи жирных кислот [35]. Помимо этого, цитоплазматический ацетил-КоА может участвовать в формировании 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА — предшественника мевалоновой кислоты и, соответственно, холестерина [36]. Упомянутая выше щавелевоуксусная кислота также

поддерживает процессы биосинтеза в делящихся клетках. В реакции трансаминирования данный субстрат преобразуется в аспарагиновую кислоту, используемую при построении белков и нуклеотидов [37].

В пролиферирующих клетках промежуточные продукты ЦТК активно используются в побочных биосинтетических реакциях, поэтому для поддержания данного метаболического пути необходим постоянный приток углерода. Его основным источником в делящихся клетках является самая распространенная в организме аминокислота — глутамин. В условиях пролиферации ее потребление в Т-лимфоцитах возрастает в 5–10 раз [38]. Углеродный скелет глутамина включается в ЦТК в виде α -кетоглутаровой кислоты (рис. 2), которая способна преобразовываться в продукты нисходящих реакций цикла либо пополнять пул лимонной кислоты. В структуре глутамина присутствуют две азотсодержащие группы, поэтому его превращение в α -кетоглутаровую кислоту представляет собой две последовательные реакции дезаминирования [39]. Продуктами первой реакции являются глутаминовая кислота и аммиак. В пролиферирующих клетках аммиак участвует в образовании карбамоилфосфата — основы пиримидинового кольца [40]. Азот, высвобождающийся при дезаминировании глутаминовой кислоты, также участвует в биосинтетических процессах, в частности — в превращении кетокислот в аминокислоты. Так, глутаминовая кислота является донором азота для пировиноградной, 3-фосфоглицериновой и щавелевоуксусной кислот, образующих соответственно аланин, серин и аспарагиновую кислоту [41].

По аналогии с гликолизом, функционирование ЦТК существенно зависит от баланса между окисленной и восстановленной формой NAD. NAD⁺ является коферментом при превращении α -кетоглутаровой кислоты в сукцинил-КоА [42], а также яблочной кислоты в щавелевоуксусную [43]. В ходе данных реакций NAD переходит из окисленной формы в восстановленную (NADH) и становится потенциальным донором электронов для дыхательной цепи митохондрий [43]. При отсутствии кофермента дегидрирование α -кетоглутаровой и яблочной кислот не происходит, поэтому повторение цикла всегда требует восполнения пула NAD⁺ [44]. В связи с этим в пролиферирующих клетках усиление работы ЦТК, как правило, сопровождается повышением активности дыхательной цепи, окисляющей NADH [45]. Стоит отметить, что ранее усиление работы электрон-транспорт-

ной цепи митохондрий связывали исключительно с потребностью делящихся клеток в энергии. Тем не менее последние исследования показывают, что именно способность дыхательной цепи восстанавливать пул NAD⁺ является фактором, лимитирующим пролиферацию [46]. Так, было установлено, что ингибиторы митохондриального дыхания вызывают в опухолевых клетках арест клеточного цикла, снижение соотношения NAD⁺/NADH, а также падение концентрации промежуточных продуктов ЦТК и их производных, в частности — аспарагиновой кислоты. Аспарагиновая кислота имеет большое значение в синтезе пуриновых нуклеотидов, поэтому ее дефицит при недостатке NAD⁺ приводит к остановке деления на стадии репликации ДНК. Таким образом, при пролиферации клетки метаболические пути, сопряженные с продукцией энергии, активно поддерживают процессы биосинтеза.

Помимо промежуточных продуктов гликолиза и ЦТК, важным источником биосинтетических молекул также являются продукты метаболизма одноуглеродных остатков (one-carbon metabolism) [31]. Метаболизм одноуглеродных остатков объединяет фолатный цикл и цикл метионина и представляет собой своеобразный «распределительный центр» углерода. Источником углерода в данном случае является аминокислота серин, а акцепторами выступают метаболические продукты, соединяющие фолатный цикл и цикл метионина с путями биосинтеза нуклеотидов, белков и липидов (рис. 3) [47]. Так, производное фолиевой кислоты — 5,10-метилентетрагидрофолат — переносит метильную группу серина на дезоксиуридинмонофосфат, что приводит к образованию дезокситимидинмонофосфата [48]. В свою очередь, 10-формилтетрагидрофолат участвует в биосинтезе пуриновых нуклеотидов [49]. Кроме того, при участии одноуглеродных остатков протекает формирование фосфатидилхолина — основного компонента всех клеточных мембран [50]. Наконец, функционирование фолатного цикла и цикла метионина также сопряжено с образованием ряда аминокислот, в том числе глицина, гомоцистеина и цистеина [51]. В связи с этим при пролиферации интенсивность метаболизма одноуглеродных остатков существенно возрастает [52].

Представленные данные демонстрируют, что переход покоящихся лимфоцитов к делению сопровождается усилением большинства биосинтетических процессов, каждый из которых вносит уникальный вклад в образование

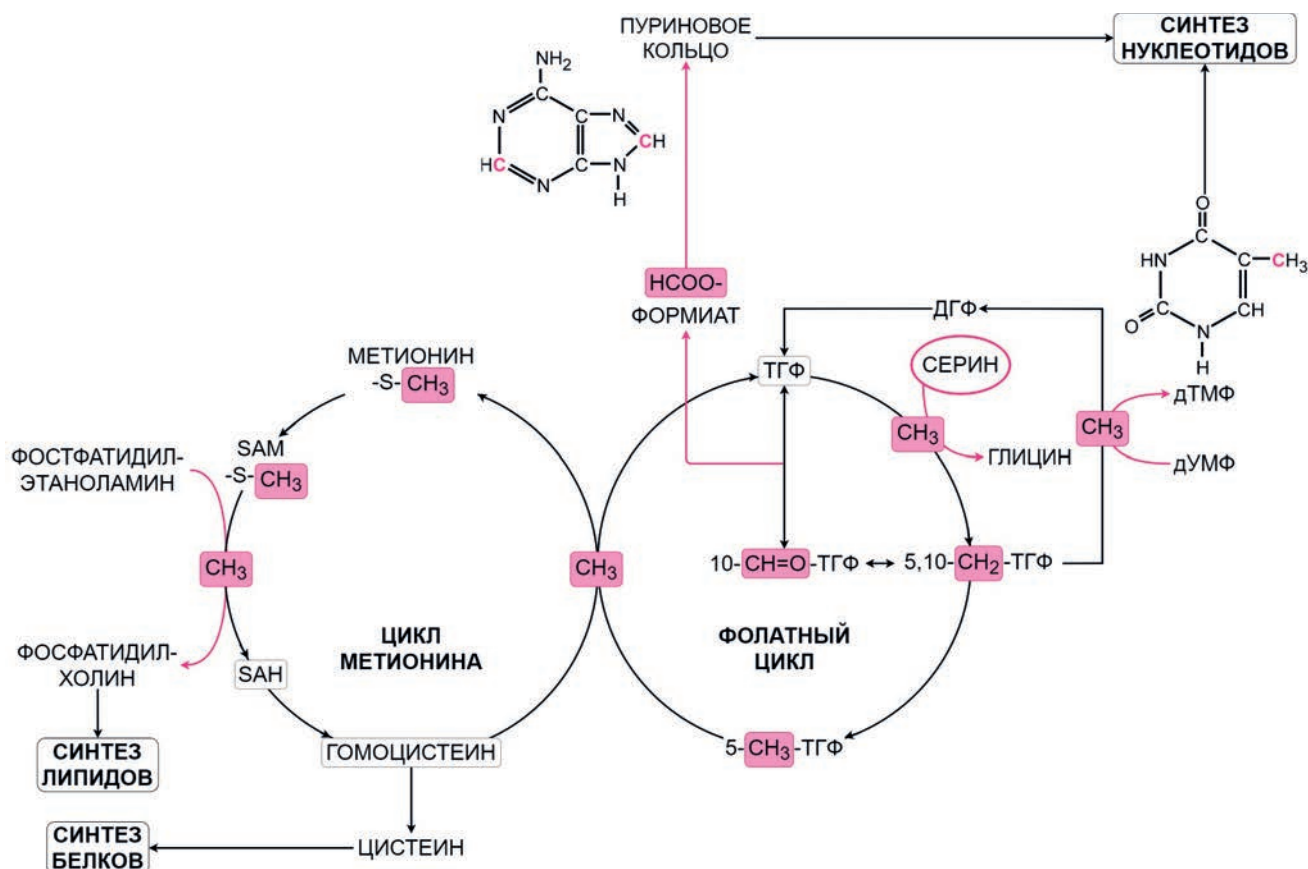


Рис. 3. Метаболизм одноуглеродных остатков и его роль в биосинтетических процессах. Примечания: одноуглеродные остатки выделены на рисунке розовым цветом; ДГФ – дигидрофолат; ТГФ – тетрагидрофолат; дУМФ – дезоксиуридинмонофосфат; дТМФ – дезокситимидинмонофосфат; SAM – S-аденозилметионин; SAH – S-аденозилгомоцистеин

нуклеотидов, белков и липидов, необходимых для воспроизведения материнской клетки. В частности, в ответ на стимуляцию в Т-клетках усиливаются аэробный гликолиз, окислительное фосфорилирование и глутаминолиз, активность ЦТК, пентозофосфатного и мевалонового путей, а также метаболизм одноуглеродных остатков. В результате, спустя 24 часа после стимуляции, размер Т-лимфоцитов значительно увеличивается [53], а содержание клеточных белков удваивается [54]. Через 30–48 часов с момента активации метаболическая перестройка Т-лимфоцитов завершается генерацией первой дочерней популяции [55].

Исходя из важной роли метаболизма в пролиферации Т-лимфоцитов, закономерно, что ингибиторы анаболических процессов являются перспективными агентами для борьбы с нежелательными иммунными реакциями. Показано, что Т-лимфоциты, в которых подавлена активность гликолиза [56], транспортеров глюкозы [57], глутаминолиза [58], ЦТК [59], окислительного фосфорилирования [56] либо метаболизма одноуглеродных остатков [52, 60], пролиферируют слабо. Следовательно,

воздействуя на эти метаболические пути, можно подавить Т-клеточный иммунный ответ на начальном этапе – на стадии клональной экспансии.

В настоящий момент известен целый ряд препаратов, подавляющих анаболизм в клетках млекопитающих. К ним относятся 2-дезоксиглюкоза и дихлорацетат, подавляющие аэробный гликолиз [56, 61], метформин, снижающий интенсивность окислительного фосфорилирования [62], AR-C141990, подавляющий активность транспортера лактата [63], а также ингибиторы синтеза жирных кислот и глутаминолиза – сорафен А [64] и диазонорлейцин [58]. Следует отметить, что приведенные данные получены преимущественно экспериментальным путем. Способность данных препаратов ограничивать пролиферацию Т-лимфоцитов показана исключительно в системах *in vitro* и на модельных организмах. Применение ингибиторов анаболизма для регуляции иммунных реакций в организме человека потребует расширения спектра используемых препаратов и проведения длительных клинических испытаний.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ Т-КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

За экспансией лимфоцитов следует стадия дифференцировки, в ходе которой $CD8^+$ Т-лимфоциты преобразуются в эффекторные клетки, а $CD4^+$ Т-лимфоциты поляризуются в Th1, Th2, Th17 или Трег. Среди них Th17-лимфоциты и Трег чаще всего являются объектом исследований при различных заболеваниях: данные субпопуляции обладают антагонистическими функциями и представляют собой две крайности спектра между про- и противовоспалительным фенотипом. Th17-лимфоциты в норме участвуют в защите слизистых барьеров от внеклеточных патогенов: продуцируют цитокины IL-17, IL-22 и IL-23, привлекают нейтрофилы в очаг инфекции и стимулируют локальное воспаление [65]. Функции Трег направлены на поддержание толерантности к собственным антигенам и предотвращение аутоиммунных реакций [5]. Эти клетки продуцируют цитокины IL-10 и TGF- β , подавляют активность множества иммунных клеток и, следовательно, угнетают воспалительные реакции [64]. Нарушение баланса между Th17-лимфоцитами и Трег неизбежно приводит к развитию заболеваний. Так, преобладание активности Th17-лимфоцитов характерно для ревматоидного артрита и системной красной волчанки [66]. Усиление функции Трег, в свою очередь, связывают с развитием и прогрессией опухолей [67].

Принято считать, что за антагонистическими функциями Th17-клеток и Трег стоят два различных метаболических профиля [7]. Так, метаболизм Th17-лимфоцитов отличается высокой активностью гликолиза. В цитоплазме Th17-лимфоцитов содержится большое количество пировиноградной и молочной кислот, а также промежуточных продуктов пентозофосфатного пути [68]. Кроме того, такие клетки отличаются от Трег усиленной экспрессией транспортера глюкозы Glut1 и начального фермента гликолиза — гексокиназы II [68]. Показано, что подавление гликолиза путем замещения глюкозы 2-деоксиглюкозой [69], галактозой [70] или маннозой [71] препятствует поляризации активированных лимфоцитов в направлении Th17-клеток и стимулирует формирование Трег. Кроме того, формирование Th17-лимфоцитов нарушается при подавлении активности гликолитических ферментов — пируваткиназы [72] и лактатдегидрогеназы [73]. Усиление гликолиза на фоне активации фактора mTOR (англ. mammalian target of rapamycin — мишень рапамицина млекопитаю-

щих), напротив, стимулирует образование Th17-клеток [74]. Еще одной особенностью Th17-лимфоцитов является активный синтез жирных кислот *de novo*. Об этом свидетельствует высокий уровень экспрессии в данных клетках фермента ацетил-КоА карбоксилазы I, катализирующего лимитирующую реакцию биосинтеза жирных кислот [64]. Подавление активности данного фермента в Т-лимфоцитах также препятствует их поляризации в направлении Th17 и стимулирует образование Трег [64].

Метаболизм Трег, в свою очередь, отличается высокой активностью окислительного фосфорилирования. Эти клетки, в сравнении с конвенциональными лимфоцитами, активнее экспрессируют цитохром c и комплексы I, II и V электронно-транспортной цепи, а также имеют большую резервную дыхательную емкость митохондрий [68]. При этом уровень митохондриального дыхания в Трег влияет на их супрессорную активность [75]. Показано, что добавление рапамицина (ингибитора mTOR) к наивным Т-лимфоцитам, культивируемым в присутствии активационных частиц и TGF- β , приводит к усилению окислительного фосфорилирования в данных клетках и увеличению доли индуцированных Трег [76]. Другой ингибитор mTOR — эмпаглифлозин — показал аналогичный эффект в культурах $CD4^+$ Т-клеток, полученных от пациентов с иммунной тромбоцитопенией [77]. Важным источником углерода для митохондрий Трег являются продукты β -окисления жирных кислот. Об этом свидетельствует повышенное содержание ацетилкарнитина и гидроксибутирилкарнитина, а также высокий уровень экспрессии в данных клетках транспортера жирных кислот — карнитин-пальмитоилтрансферазы I [68]. Показано, что индукция AMP-активируемой протеинкиназы (англ. AMP-activated protein kinase — AMPK), стимулирующей потребление и окисление липидов, приводит к поляризации Т-лимфоцитов в направлении Трег [78], в то время как блокада липолиза подавляет дифференцировку Трег [75, 79] и угнетает супрессорную активность данных клеток [75, 80]. Из вышесказанного следует, что в популяции Т-клеток про- и противовоспалительный фенотипы поддерживаются гликолизом и окислительным фосфорилированием соответственно. При этом на дифференцировку Т-лимфоцитов также существенно влияет баланс между анаболическими и катаболическими процессами в липидном обмене: поляризация в направлении Th17 в значительной степени зависит от синтеза жирных кислот,

в то время как образование Трег поддерживается их β -окислением.

Необходимо отметить, что в дифференцированных Т-клетках дихотомия «гликолиз $\leftrightarrow$ окислительное фосфорилирование» или «синтез $\leftrightarrow$ окисление жирных кислот» носит неабсолютный характер. Вероятнее всего, Th17-лимфоциты и Трег в разной степени задействуют как анаболические, так и катаболические процессы для поддержания своей жизнедеятельности. Основные свидетельства в пользу этой гипотезы были получены в экспериментах с генетически модифицированными Трег. В частности, было показано, что Трег, не способные экспрессировать один из основных транскрипционных регуляторов гликолиза — HIF-1 α (англ. hypoxia-inducible factor-1 α — гипоксией индуцируемый фактор-1 α) — отличаются низкой супрессорной активностью в модели экспериментального язвенного колита [81]. Кроме того, было установлено, что в Трег делеция гена *RPTOR*, кодирующего адаптерный белок для mTOR, приводит к нарушению синтеза жирных кислот и холестерина, угнетению пролиферации, а также снижению экспрессии индуцируемого ко-стимулятора Т-лимфоцитов (англ. inducible T-cell costimulator — ICOS) и ингибиторного рецептора CTLA-4 (CD152) [82]. Из вышесказанного следует, что, хотя химические ингибиторы гликолиза и синтеза жирных кислот стимулируют образование Трег, полное подавление анаболических путей угнетает супрессорную функцию регуляторных клеток.

Представленные сведения позволяют заключить, что направление дифференцировки Т-лимфоцитов определяется тем, какие метаболические процессы преобладают в данных клетках: анаболические или катаболические. Более того, метаболизм можно использовать в качестве переключателя, направляющего Т-клетки к про- или противовоспалительному фенотипу. Ожидается, что препараты, подавляющие процессы гликолиза и синтеза жирных кислот в Т-лимфоцитах, найдут широкое применение при терапии аутоиммунных заболеваний и предотвращении отторжения трансплантата [83]. В настоящий момент для коррекции этих состояний применяются иммуносупрессанты, такие как метотрексат [84], циклоспорин, азатиоприн и такролимус [85]. Однако данные соединения обладают невысокой специфичностью и подавляют активность всех Т-лимфоцитов, в том числе Трег [86]. Ингибиторы анаболизма, в свою очередь, позволяют не подавлять, а модулировать иммунный ответ, то есть стимулировать образование

противовоспалительных Трег и формирование толерантности.

Наиболее перспективной метаболической мишенью для терапии аутоиммунных заболеваний в настоящий момент считается mTOR [87]. Эффективность его ингибиторов была доказана целым рядом клинических исследований. Так, в двойном слепом контролируемом исследовании было показано, что назначение N-ацетилцистеина пациентам с системной красной волчанкой приводит к снижению активности mTOR в CD4⁺ Т-клетках, увеличению экспрессии характерного для Трег транскрипционного фактора Forkhead box P3 (FoxP3) и снижению проявления симптомов заболевания [88]. Помимо этого, было показано, что N-ацетилцистеин может снижать проявление симптомов синдрома Шегрена [89]. Другой ингибитор mTOR — рапамицин — обладает доказанной эффективностью при лечении системной красной волчанки у пациентов со слабым ответом на традиционную терапию [90]. Еще один препарат этой группы — эверолимус — повышает эффективность терапии метотрексатом у пациентов с ревматоидным артритом [91]. Возможно, более продолжительные и масштабные исследования, подтверждающие безопасность и эффективность данных препаратов, позволят внедрить ингибиторы mTOR в общую практику лечения аутоиммунных заболеваний.

РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА В ФОРМИРОВАНИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ

После элиминации патогена большинство антигенспецифичных Т-лимфоцитов, сформированных в процессе иммунного ответа, погибает путем апоптоза, а выжившие клетки сохраняют иммунологическую память о перенесенном контакте с антигеном. Сохранившиеся Т-клетки памяти, при их сравнении с наивными Т-лимфоцитами, обладают существенным преимуществом при вторичном иммунном ответе: такие клетки быстрее вступают в пролиферацию и начинают продуцировать цитокины значительно раньше [92]. Способность Т-лимфоцитов памяти к ускоренному и усиленному иммунному ответу на вновь распознанный антиген лежит в основе создания вакцин.

Преобразование эффекторных Т-лимфоцитов в Т-клетки памяти сопряжено с очередной метаболической перестройкой: анаболический процесс аэробного гликолиза сменяется катаболическим окислением липидов [93].

В соответствии с этим, было показано, что подавление активности mTOR [94], угнетение гликолиза [95] и блокада митохондриального переносчика пирувата [96] приводят к усилению β -окисления жирных кислот в $CD8^+$ Т-лимфоцитах и стимулируют формирование клеток памяти. К накоплению Т-клеток памяти *in vitro* приводит снижение концентрации глюкозы в среде: данный эффект обусловлен активацией фактора AMPK в Т-лимфоцитах [97]. При этом индуцированная экспрессия мишени AMPK — транскрипционного коактиватора PGC-1 α (англ. peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1-alpha — коактиватор-1-альфа гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом) — усиливает формирование Т-клеток памяти в модели меланомы мыши [98]. Подавление β -окисления на уровне адаптерного белка TRAF6 (англ. TNF receptor-associated factor 6 — фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей), связывающего AMPK, напротив, препятствует формированию $CD8^+$ Т-лимфоцитов памяти у иммунизированных мышей [99]. При этом введение мышам индуктора AMPK метформина восстанавливает способность $CD8^+$ Т-лимфоцитов дифференцироваться в клетки памяти. Важно отметить, что метформин также является сильным индуктором формирования клеток памяти у мышей, не подвергшихся делеции гена *TRAF6*. Авторы показали, что введение метформина мышам дикого типа с бактериальной инфекцией или опухолью приводит к значительному увеличению числа $CD8^+$ Т-лимфоцитов памяти в их организме [99].

Жирные кислоты, используемые $CD8^+$ Т-клетками памяти в ходе β -окисления, могут иметь различное происхождение. Так, показано, что $CD8^+$ Т-лимфоциты памяти из крови, селезенки или лимфоузлов мыши используют жирные кислоты эндогенного происхождения: они регулярно синтезируются *de novo* из углерода, поступающего с глюкозой, и запасаются в форме триацилглицеридов [100, 101]. В этом случае метаболизм липидов характеризуется выражением «futile cycle» («бесполезный» цикл), поскольку антагонистические процессы синтеза и окисления жирных кислот, обычно разобщенные, протекают одновременно. Многочисленные исследования показали, что данный цикл имеет большое значение для формирования [99] и выживания $CD8^+$ Т-лимфоцитов памяти [100, 101]. Однако механизм, связывающий «futile cycle» с формированием иммунологической памяти, остается неизвестным.

В отличие от клеток крови, лимфатических узлов и селезенки, резидентные $CD8^+$ Т-лимфоциты памяти, населяющие базальную мембрану эпидермиса, преимущественно используют жирные кислоты экзогенного происхождения. Так, делеция генов *Fabp4* и *Fabp5*, кодирующих транспортеры жирных кислот, существенно снижает срок жизни резидентных $CD8^+$ Т-клеток памяти кожи [102]. В то же время делеция *Fabp4* и *Fabp5* в $CD8^+$ Т-лимфоцитах центральной памяти, населяющих лимфатические узлы, не приводит к изменению их жизнеспособности. Потребление экзогенных липидов также характерно для $CD8^+$ Т-клеток памяти, расположенных в жировой ткани. Показано, что такие клетки потребляют существенно больше экзогенных жирных кислот, чем $CD8^+$ Т-лимфоциты памяти селезенки и лимфоидной ткани желудочно-кишечного тракта [103]. Однако их роль в обеспечении жизнеспособности и эффективного функционирования $CD8^+$ Т-клеток памяти жировой ткани до конца не ясна.

Как отмечалось ранее, ключевой функциональной особенностью Т-лимфоцитов памяти является способность реализовывать ускоренный и усиленный иммунный ответ при повторной встрече с патогеном. При этом механизмы, позволяющие клеткам памяти вступать в иммунный ответ быстрее наивных клеток, остаются малоизученными. Последние экспериментальные данные позволяют предположить, что эта особенность Т-лимфоцитов памяти, по крайней мере отчасти, связана с метаболическими адаптациями. Так, было показано, что $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки памяти, при их сравнении с наивными клетками, характеризуются большей активностью окислительного фосфорилирования [6, 32], повышенной резервной дыхательной емкостью митохондрий [104, 105] и повышенным гликолитическим резервом [6, 104]. При этом высокая дыхательная и гликолитическая емкость $CD8^+$ Т-лимфоцитов памяти связана с их способностью вступать в деление быстрее наивных клеток [6]. Окислительное фосфорилирование и гликолиз являются магистральными метаболическими путями, обеспечивающими биосинтез в пролиферирующих клетках. В связи с этим можно предположить, что высокий дыхательный и гликолитический потенциал Т-лимфоцитов памяти позволяет им быстрее завершить метаболическую перестройку, предшествующую делению.

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что формирование и функционирование Т-клеток памяти зависит от определенных

метаболических адаптаций: перехода к β -окислению жирных кислот и усиления дыхательно-го и гликолитического потенциала. Что более важно, вмешательства в метаболизм Т-лимфоцитов достаточно, чтобы усилить или ослабить формирование клеток памяти. Связь между метаболизмом и иммунологической памятью позволяет предположить, что регуляция обменных процессов станет ключом к усилению поствакцинального иммунитета. В этом контексте большой интерес для исследователей представляют иммуносупрессант рапамицин и антидиабетический препарат метформин, мишенью которых являются mTOR и AMPK соответственно [106]. Эти лекарственные средства способны усиливать формирование клеток памяти у мышей после иммунизации [94, 99] и трансплантации опухоли [107]. Эффективность рапамицина также была продемонстрирована на нечеловеческих приматах [99]. Однако влияние метформина и рапамицина на механизмы формирования иммунологической памяти у человека остается малоизученным.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЭФФЕКТОВ ИНГИБИТОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Иммунный ответ включает в себя не только процессы, направленные на уничтожение патогена, но и защитные реакции, обеспечивающие разрешение воспаления и восстановление гомеостаза. Эффективным средством контроля иммунных реакций выступает сигнализация через ингибиторные рецепторы Т-лимфоцитов [108]. Ингибиторные рецепторы начинают экспрессироваться на поверхности Т-клеток уже в момент их активации и обеспечивают баланс между эффективным иммунным ответом, с одной стороны, и защитой тканей от избыточного воспаления и повреждения — с другой [109].

Среди ингибиторных рецепторов наиболее изучен рецептор программируемой клеточной гибели 1 (англ. Programmed death-1 — PD-1). Сигнал, поступающий с PD-1 при его взаимодействии с лигандами PD-L1 или PD-L2, подавляет пролиферацию, продукцию цитокинов и цитолитическую функцию Т-лимфоцитов, а также повышает их чувствительность к апоптозу [110, 111]. Угнетение функции Т-лимфоцитов вследствие сигнализации через PD-1 во многом обусловлено ее влиянием на клеточный метаболизм. Установлено, что после взаимодействия PD-1 с лигандом подавляется прохождение сигнала через фосфатидилино-

зитол-3-киназу (phosphatidylinositol-3-kinase — PI3K) и протеинкиназу В, также известную как Akt [112]. Блокада этого сигнального пути, с одной стороны, снижает уровень потребления и метаболизма глюкозы и аминокислот, а с другой — усиливает экспрессию карнитин-пальмитоилтрансферазы I, липолиз и β -окисление жирных кислот [113]. Таким образом, Т-лимфоцит, получивший сигнал через рецептор PD-1, не способен индуцировать анаболические обменные процессы, необходимые для активации, пролиферации и эффекторных функций.

Лиганды PD-1 — PD-L1 и PD-L2 — могут быть представлены на многих клетках человеческого организма. Так, PD-L1 может экспрессироваться на поверхности большинства иммуночитов, в том числе на самих Т-лимфоцитах [114]. Кроме того, PD-L1 может присутствовать на поверхности неиммунных клеток, таких как клетки эпителия и эндотелия, миоциты, гепатоциты и астроциты [115]. Наконец, экспрессия PD-L1 также характерна для некоторых иммунно-привилегированных органов: плаценты и глаза [115]. Экспрессия PD-L2, напротив, ограничена иммунными клетками: макрофагами, дендритными клетками и моноцитами [114, 116]. Поверхностная экспрессия обоих лигандов, как правило, строго регулируется цитокиновым окружением. Показано, что интерфероны типа 1 и 2, а также TNF- α стимулируют экспрессию PD-L1 на поверхности Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, дендритных клеток, а также клеток эпителия и эндотелия [114, 117, 118]. Гемопоэтические цитокины IL-2, IL-7 и IL-15 также усиливают экспрессию PD-L1 на Т-клетках [119]. Экспрессию PD-L2 на поверхности дендритных клеток и макрофагов индуцируют цитокины IL-4 и IFN- γ [116]. При отсутствии лиганда ингибирующий сигнал с PD-1 не поступает, и Т-клетки, распознавшие чужеродный пептид, активируются, пролиферируют и реализуют эффекторные функции.

Наиболее активно PD-1 и PD-L1 (его наиболее изученный лиганд) экспрессируются в ситуациях, когда иммунная система сталкивается с персистирующим антигеном: хронические вирусные инфекции [120], развитие опухолей [116] и сепсис [121]. При этих заболеваниях прекращения иммунного ответа не происходит, Т-клетки продолжают контактировать с антигеном, а защитный механизм, реализуемый ингибиторными рецепторами, приобретает патологический характер. Продолжительный контакт с антигеном приводит к тому, что специфичные Т-лимфоциты начинают экспрессировать как рецептор PD-1,

так и другие ингибиторные молекулы – Tim-3, Lag-3, CTLA-4 и TIGIT [27]. Вместе с тем такие клетки постепенно утрачивают способность производить цитокины (в частности, IFN- γ) и делиться [122]. В литературе Т-лимфоциты, утратившие функции вследствие продолжительного контакта с антигеном, называют истощенными. При хронических вирусных инфекциях [9], сепсисе [123] и развитии опухолей [124] количество истощенных Т-клеток значительно возрастает. При этом накопление малофункциональных Т-лимфоцитов, специфичных к антигену, нередко способствует прогрессии заболевания [125].

Помимо конститутивной экспрессии ингибиторных рецепторов, истощенные Т-клетки также отличаются от функционально активных Т-лимфоцитов нарушением работы митохондрий. Установлено, что в истощенных CD8⁺ Т-клетках аккумулируются деполяризованные митохондрии с низкой интенсивностью окислительного фосфорилирования и продукции АТФ [126]. Кроме того, в истощенных CD8⁺ Т-лимфоцитах нарушается процесс слияния митохондрий [127], подавляются процессы, связанные с активностью транскрипционного фактора PGC-1 α [128], и митофагия [129]. В совокупности эти изменения приводят к угнетению антиоксидантных процессов и накоплению активных форм кислорода (АФК). Предполагается, что аккумуляция АФК прямо связана с изменениями в структуре хроматина, которые приводят к терминальному истощению Т-лимфоцитов [130]. Так, было показано, что интратуморальное или пероральное введение никотинамид рибозида – предшественника NAD – стимулирует митофагию, снижает уровень АФК в CD8⁺ Т-клетках, инфильтрирующих опухоль, а также повышает их активность против рака прямой кишки и меланомы мыши [129]. Применение метформина для снижения уровня АФК в CD8⁺ Т-лимфоцитах, находящихся в гипоксическом микроокружении опухоли, также приводит к повышению их функциональной активности и снижению экспрессии рецептора PD-1 [131].

Примечательно, что угнетение функции митохондрий не только является неотъемлемой чертой истощенных CD8⁺ Т-клеток, но и само по себе может привести к истощению Т-лимфоцитов. Так, было показано, что индуцированное накопление деполяризованных митохондрий в CD8⁺ Т-клетках, инкубированных в присутствии олигомицина и Mdivi-1 (англ. mitochondrial division inhibitor 1 – ингибитор митохондриального деления 1), приво-

дит к снижению их пролиферативного потенциала, угнетению продукции эффекторных цитокинов и повышению экспрессии ингибиторных молекул PD-1 и LAG-3 [129]. Кроме того, экспериментально вызванное нарушение функции митохондрий в CD8⁺ Т-лимфоцитах приводит к изменению структуры хроматина [129]. При этом эпигенетические изменения, протекающие в этих клетках, сходны с таковыми в истощенных CD8⁺ Т-лимфоцитах. Представленные данные свидетельствуют о том, что CD8⁺ Т-клетки с нарушением функции митохондрий могут переходить в истощенное состояние даже при отсутствии персистирующего антигена.

Механизм, приводящий к истощению клеток с митохондриальной дисфункцией, до сих пор неизвестен. Тем не менее предполагается, что влияние митохондрий на эпигенетический ландшафт клеток имеет определяющее значение в развитии данного процесса [10]. В настоящий момент общепризнано, что митохондрии могут активно влиять на генетический аппарат клетки [132]. При этом существенную роль в регуляции со стороны митохондрий играют продукты ЦТК, задействованные в модификации ДНК и гистонов [133]. Так, для процессов ацетилирования необходим ацетил-КоА, источником которого являются ацетилкарнитин и лимонная кислота, транспортируемые из митохондрий [134]. В связи с этим нарушение функции митохондрий способно привести к сокращению пула ацетил-КоА, гипoaцетилированию гистонов и изменению профиля экспрессируемых генов [135]. Показано, что недостаток ацетил-КоА нарушал ацетилирование гистона H3 в локусе *Ifng* и блокировал продукцию IFN- γ в CD4⁺ Т-лимфоцитах [136]. Как отмечалось ранее, утрата способности продуцировать IFN- γ является одним из основных признаков истощения Т-клеток.

Помимо ацетилирования, митохондрии также способны влиять на уровень метилирования ДНК и гистонов. Показано, что нарушение функции митохондрий приводит к существенному изменению расположения метильных групп и уровня транскрипции целого ряда генов [137]. Связь между митохондриями и метилированием генетического материала обусловлена тем, что ферменты-деметилазы Jmjd3 (англ. Jumonji domain-containing protein-3 – белок 3, содержащий домен Jumonji) и TET (англ. ten-eleven translocation – белки с транслокацией десять-одиннадцать) требуют присутствия α -кетоглутаровой кислоты для своей активности [138, 139].

При этом другие производные ЦТК — янтарная и фумаровая кислоты — угнетают активность данных ферментов [140, 141]. Примечательно, что CD8⁺ Т-лимфоциты, культивируемые при отсутствии глутамин или в присутствии ингибиторов глутаминализа, сохраняют свою функциональную активность даже при персистирующем контакте с антигеном: такие клетки активно пролиферируют и оказывают противоопухолевую активность, а также экспрессируют PD-1 на относительно низком уровне [142]. Добавление α -кетоглутарата в среду с дефицитом глутамин возвращает CD8⁺ Т-клеткам истощенный фенотип [143]. По-видимому, снижение внутриклеточного пула α -кетоглутаровой кислоты препятствует изменению экспрессии генов, регулирующих процесс истощения Т-лимфоцитов.

Таким образом, установлено, что ингибиторные рецепторы и PD-1, в частности, изменяют метаболизм Т-клеток, что отражается на их функции: подавляется активация, пролиферация и продукция цитокинов. Но справедливо и обратное — метаболические сдвиги индуцируют экспрессию PD-1 и, таким образом, ингибируют функциональную активность Т-клеток. Двусторонняя связь между нарушением работы митохондрий и истощением Т-лимфоцитов указывает на то, что нормализация Т-клеточного метаболизма может усилить иммунный ответ на персистирующий антиген. Представленные сведения могут быть особенно актуальны для разработки противоопухолевых препаратов. В настоящий момент для снижения уровня истощения в пуле Т-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, применяют различные виды терапии, основанной на антителах анти-PD-1/PD-L1. Преимуществами ингибиторов сигнального пути PD-1/PD-L1 являются относительная безопасность и эффективность в отношении прогрессирующих опухолей [144]. Тем не менее в ряде случаев вероятность полной ремиссии при приеме антител анти-PD-1 или анти-PD-L1 остается невысокой и значительно зависит от типа опухоли и индивидуальных характеристик пациента [145]. Можно предположить, что нормализация функции митохондрий Т-лимфоцитов дополнит действие ингибиторов данного сигнального пути и сделает лечение более эффективным. К настоящему моменту известна одна работа, проверяющая и подтверждающая эту гипотезу. Chowdhury et al. [146] показали, что агонист транскрипционного фактора PGC-1 α безафибрат усиливает функцию митохондрий в CD8⁺ Т-лимфоцитах и повышает активность антител анти-PD-1 в модели мышинной опухоли.

Таким образом, терапевтические стратегии для лечения опухолей, совмещающие антитела анти-PD-1/PD-L1 и фармакологические регуляторы клеточного метаболизма, требуют дальнейшего детального изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сведения, представленные в настоящей работе, демонстрируют, что на всех этапах жизненного цикла — с момента активации до формирования иммунологической памяти — метаболизм и функции Т-лимфоцитов взаимосвязаны. Эта связь сохраняется и в том случае, когда функциональная активность Т-клеток снижается для завершения иммунного ответа или вследствие истощения. Препараты, направленные на изменение обменных процессов, активно применяются при лечении сердечно-сосудистых заболеваний [147]. Кроме того, в последние годы значительно возросло число ингибиторов, агонистов метаболических путей и антиметаболитов, которые проходят клинические испытания в качестве противоопухолевых препаратов либо уже используются для терапии рака [148]. Вместе с тем представленные сведения требуют повышенного внимания к побочным эффектам, которые регуляторы метаболизма могут оказывать на иммунную систему. Возможные эффекты данных препаратов на метаболизм и функциональную активность иммунных клеток (как позитивные, так и негативные) требуют дальнейшего детального изучения.

Важно отметить, что обратной стороной зависимости между функцией Т-лимфоцитов и их метаболизмом является возможность направлять функциональную активность Т-клеток путем изменения обменных процессов. Так, было показано, что ингибиторы и агонисты метаболических путей способны подавлять пролиферацию Т-клеток, изменять направление их дифференцировки, угнетать или стимулировать формирование иммунологической памяти, а также препятствовать истощению специфичных к антигену клеток. В совокупности эти данные указывают на то, что препараты, воздействующие на метаболизм Т-лимфоцитов, обладают большим потенциалом в контроле иммунных реакций [149].

Дальнейшее развитие этого направления, безусловно, потребует проведения большого количества широкомасштабных исследований. До сих пор мало известно о том, как ингибиторы и агонисты метаболических путей воздействуют на неиммунные клетки организма,

в том числе эпителий кишечника, клетки печени, миоциты и β -клетки поджелудочной железы, отличающиеся высокой активностью обменных процессов. Более того, неизвестно, какие компенсаторные реакции эти препараты вызовут в самих клетках-мишенях. Изучение неспецифических, перекрестных и компенсаторных эффектов соединений, способных воздействовать на метаболизм Т-лимфоцитов, потребует усилий большого количества исследователей. Тем не менее эта большая работа откроет многообещающую перспективу — реальный путь к терапевтическому воздействию на отдельные звенья иммунной системы.

Вклад авторов: Власова В.В. — анализ литературных данных, написание текста статьи, подготовка рисунков; Шмагель К.В. — фор-

мирование концепции обзора, руководство, редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания «Роль метаболизма $CD4^+$ Т-клеток памяти в нарушении регенерации иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне антиретровирусной терапии» (номер государственной регистрации темы: 121112500044-9) и государственного задания «Механизмы регуляции иммунной системы» (номер государственной регистрации темы: АААА-А19-119112290007-7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ghosh-Choudhary, S., Liu, J., and Finkel, T. (2020) Metabolic regulation of cell fate and function, *Trends Cell Biol.*, **30**, 201–212, doi: 10.1016/j.tcb.2019.12.005.
2. Gerriets, V. A., and Rathmell, J. C. (2012) Metabolic pathways in T cell fate and function, *Trends Immunol.*, **33**, 168–173, doi: 10.1016/j.it.2012.01.010.
3. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Araki, K., and Ahmed, R. (2010) From vaccines to memory and back, *Immunity*, **33**, 451–463, doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.008.
4. Bettelli, E., Korn, T., and Kuchroo, V. K. (2007) Th17: the third member of the effector T cell trilogy, *Curr. Opin. Immunol.*, **19**, 652–657, doi: 10.1016/j.coi.2007.07.020.
5. Sakaguchi, S. (2004) Naturally arising $CD4^+$ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses, *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 531–562, doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122.
6. Van der Windt, G. J. W., O'Sullivan, D., Everts, B., Huang, S. C.-C., Buck, M. D., Curtis, J. D., Chang, C. H., Smith, A. M., Ai, T., Faubert, B., Jones, R. G., Pearce, E. J., and Pearce, E. L. (2013) $CD8$ memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 14336–14341, doi: 10.1073/pnas.1221740110.
7. Barbi, J., Pardoll, D., and Pan, F. (2013) Metabolic control of the Treg/Th17 axis, *Immunol. Rev.*, **252**, 52–77, doi: 10.1111/imr.12029.
8. Pennock, N. D., White, J. T., Cross, E. W., Cheney, E. E., Tamburini, B. A., and Kedl, R. M. (2013) T cell responses: naive to memory and everything in between, *Adv. Physiol. Educ.*, **37**, 273–283, doi: 10.1152/advan.00066.2013.
9. Barili, V., Fisicaro, P., Montanini, B., Acerbi, G., Filippi, A., Forleo, G., Romualdi, C., Ferracin, M., Guerrieri, F., Pedrazzi, G., Boni, C., Rossi, M., Vecchi, A., Penna, A., Zecca, A., Mori, C., Orlandini, A., Negri, E., Pesci, M., Massari, M., Missale, G., Levrero, M., Ottonello, S., and Ferrari, C. (2020) Targeting p53 and histone methyltransferases restores exhausted $CD8^+$ T cells in HCV infection, *Nat. Commun.*, **11**, 604, doi: 10.1038/s41467-019-14137-7.
10. Franco, F., Jaccard, A., Romero, P., Yu, Y.-R., and Ho, P.-C. (2020) Metabolic and epigenetic regulation of T-cell exhaustion, *Nat. Metab.*, **2**, 1001–1012, doi: 10.1038/s42255-020-00280-9.
11. Burnet, F. M. (1976) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection, *CA Cancer J. Clin.*, **26**, 119–121, doi: 10.3322/canjclin.26.2.119.
12. Wang, R., and Green, D. R. (2012) Metabolic checkpoints in activated T cells, *Nat. Immunol.*, **13**, 907–915, doi: 10.1038/ni.2386.
13. Patel, D., Salloum, D., Saqcena, M., Chatterjee, A., Mroz, V., Ohh, M., and Foster, D. A. (2017) A late G1 lipid checkpoint that is dysregulated in clear cell renal carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, **292**, 936–944, doi: 10.1074/jbc.M116.757864.
14. Pelletier, J., Riaño-Canalias, F., Almacellas, E., Mauvezin, C., Samino, S., Feu, S., Menoyo, S., Domestegui, A., Garcia-Cajide, M., Salazar, R., Cortés, C., Marcos, R., Tauler, A., Yanes, O., Agell, N., Kozma, S. C., Gentilella, A., and Thomas, G. (2020) Nucleotide depletion reveals the impaired ribosome biogenesis checkpoint as a barrier against DNA damage, *EMBO J.*, **39**, e103838, doi: 10.15252/emboj.2019103838.

15. Pardee, A. B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1286-1290, doi: 10.1073/pnas.71.4.1286.
16. Ge, T., Yang, J., Zhou, S., Wang, Y., Li, Y., and Tong, X. (2020) The role of the pentose phosphate pathway in diabetes and cancer, *Front. Endocrinol.*, **11**, 365, doi: 10.3389/fendo.2020.00365.
17. Reid, M. A., Allen, A. E., Liu, S., Liberti, M. V., Liu, P., Liu, X., Lai, L., and Locasale, J. W. (2018) Serine synthesis through PHGDH coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism, *Nat. Commun.*, **9**, 5442, doi: 10.1038/s41467-018-07868-6.
18. Grassian, A. R., Metallo, C. M., Coloff, J. L., Stephanopoulos, G., and Brugge, J. S. (2011) Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation, *Genes Dev.*, **25**, 1716-1733, doi: 10.1101/gad.16771811.
19. Lee, J., and Ridgway, N. D. (2020) Substrate channeling in the glycerol-3-phosphate pathway regulates the synthesis, storage and secretion of glycerolipids, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1865**, 158438, doi: 10.1016/j.bbalip.2019.03.010.
20. Dimeloe, S., Burgener, A.-V., Grählert, J., and Hess, C. (2017) T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation; a modular view, *Immunology*, **150**, 35-44, doi: 10.1111/imm.12655.
21. Adeva-Andany, M., López-Ojén, M., Funcasta-Calderón, R., Ameneiros-Rodríguez, E., Donapetry-García, C., Vila-Altesor, M., and Rodríguez-Seijas, J. (2014) Comprehensive review on lactate metabolism in human health, *Mitochondrion*, **17**, 76-100, doi: 10.1016/j.mito.2014.05.007.
22. Grist, J. T., Jarvis, L. B., Georgieva, Z., Thompson, S., Kaur Sandhu, H., Burling, K., Clarke, A., Jackson, S., Wills, M., Gallagher, F. A., and Jones, J. L. (2018) Extracellular lactate: a novel measure of T cell proliferation, *J. Immunol.*, **200**, 1220-1226, doi: 10.4049/jimmunol.1700886.
23. Hume, D. A., Radik, J. L., Ferber, E., and Weidemann, M. J. (1978) Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation, *Biochem. J.*, **174**, 703-709, doi: 10.1042/bj1740703.
24. DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C. B. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19345-19350, doi: 10.1073/pnas.0709747104.
25. Lunt, S. Y., and Vander Heiden, M. G. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 441-464, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
26. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science*, **324**, 1029-1033, doi: 10.1126/science.1160809.
27. Catakovic, K., Klieser, E., Neureiter, D., and Geisberger, R. (2017) T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy, *Cell Commun. Signal.*, **15**, 1, doi: 10.1186/s12964-016-0160-z.
28. Trentham, D. R. (1971) Rate-determining processes and the number of simultaneously active sites of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Biochem. J.*, **122**, 71-77, doi: 10.1042/bj1220071.
29. Lemire, J., Mailloux, R. J., and Appanna, V. D. (2008) Mitochondrial lactate dehydrogenase is involved in oxidative-energy metabolism in human astrocytoma cells (CCF-STTG1), *PLoS One*, **3**, e1550, doi: 10.1371/journal.pone.0001550.
30. Wang, R., Dillon, C. P., Shi, L. Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L. L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., and Green, D. R. (2011) The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation, *Immunity*, **35**, 871-882, doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.021.
31. Chapman, N. M., Boothby, M. R., and Chi, H. (2020) Metabolic coordination of T cell quiescence and activation, *Nat. Rev. Immunol.*, **20**, 55-70, doi: 10.1038/s41577-019-0203-y.
32. Jones, N., Vincent, E. E., Cronin, J. G., Panetti, S., Chambers, M., Holm, S. R., Owens, S. E., Francis, N. J., Finlay, D. K., and Thornton, C. A. (2019) Akt and STAT5 mediate naïve human CD4⁺ T-cell early metabolic response to TCR stimulation, *Nat. Commun.*, **10**, 2042, doi: 10.1038/s41467-019-10023-4.
33. Czibik, G., Steeples, V., Yavari, A., and Ashrafian, H. (2014) Citric acid cycle intermediates in cardioprotection, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **7**, 711-719, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000220.
34. Palmieri, F. (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications, *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.*, **447**, 689-709, doi: 10.1007/s00424-003-1099-7.
35. Saggerson, D. (2008) Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells, *Annu. Rev. Nutr.*, **28**, 253-272, doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155434.
36. Huang, B., Song, B.-L., and Xu, C. (2020) Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities, *Nat. Metab.*, **2**, 132-141, doi: 10.1038/s42255-020-0174-0.
37. Ahn, C. S., and Metallo, C. M. (2015) Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation, *Cancer Metab.*, **3**, 1, doi: 10.1186/s40170-015-0128-2.
38. Carr, E. L., Kelman, A., Wu, G. S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., Turay, A. M., and Frauwirth, K. A. (2010) Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation, *J. Immunol.*, **185**, 1037-1044, doi: 10.4049/jimmunol.0903586.
39. DeBerardinis, R. J., and Cheng, T. (2010) Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism,

- cell biology and cancer, *Oncogene*, **29**, 313-324, doi: 10.1038/onc.2009.358.
40. Skaper, S. D., O'Brien, W. E., and Schafer, I. A. (1978) The influence of ammonia on purine and pyrimidine nucleotide biosynthesis in rat liver and brain *in vitro*, *Biochem. J.*, **172**, 457-464, doi: 10.1042/bj1720457.
 41. Young, V. R., and Ajami, A. M. (2001) Glutamine: the emperor or his clothes? *J. Nutr.*, **131**, 2449-2459, doi: 10.1093/jn/131.9.2449S.
 42. Tretter, L., and Adam-Vizi, V. (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress, *Philos. Trans. R. Soc.*, **360**, 2335-2345, doi: 10.1098/rstb.2005.1764.
 43. Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P. E., Zhou, X., Li, C., Shen, G., and Zou, B. (2020) NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential, *Signal Transduction Targeted Ther.*, **5**, 227, doi: 10.1038/s41392-020-00311-7.
 44. Akie, T. E., Liu, L., Nam, M., Lei, S., and Cooper, M. P. (2015) OXPHOS-mediated induction of NAD⁺ promotes complete oxidation of fatty acids and interdicts non-alcoholic fatty liver disease, *PLoS One*, **10**, e0125617, doi: 10.1371/journal.pone.0125617.
 45. Yao, C.-H., Wang, R., Wang, Y., Kung, C.-P., Weber, J. D., and Patti, G. J. (2019) Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation, *ELife*, **8**, e41351, doi: 10.7554/eLife.41351.
 46. Birsoy, K., Wang, T., Chen, W. W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., and Sabatini, D. M. (2015) An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis, *Cell*, **162**, 540-551, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.016.
 47. Pan, S., Fan, M., Liu, Z., Li, X., and Wang, H. (2021) Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer, *Int. J. Oncol.*, **58**, 158-170, doi: 10.3892/ijo.2020.5158.
 48. Tong, X., Zhao, F., and Thompson, C. B. (2009) The molecular determinants of *de novo* nucleotide biosynthesis in cancer cells, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **19**, 32-37, doi: 10.1016/j.gde.2009.01.002.
 49. Baggott, J. E., and Tamura, T. (2015) Folate-dependent purine nucleotide biosynthesis in humans, *Adv. Nutr.*, **6**, 564-571, doi: 10.3945/an.115.008300.
 50. Van der Veen, J. N., Kennelly, J. P., Wan, S., Vance, J. E., Vance, D. E., and Jacobs, R. L. (2017) The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1859**, 1558-1572, doi: 10.1016/j.bbamem.2017.04.006.
 51. Finkelstein, J. D. (1990) Methionine metabolism in mammals, *J. Nutr. Biochem.*, **1**, 228-237, doi: 10.1016/0955-2863(90)90070-2.
 52. Ron-Harel, N., Santos, D., Ghergurovich, J. M., Sage, P. T., Reddy, A., Lovitch, S. B., Dephoure, N., Satterstrom, F. K., Sheffer, M., Spinelli, J. B., Gygi, S., Rabinowitz, J. D., Sharpe, A. H., and Haigis, M. C. (2016) Mitochondrial biogenesis and proteome remodeling promote one-carbon metabolism for T cell activation, *Cell Metab.*, **24**, 104-117, doi: 10.1016/j.cmet.2016.06.007.
 53. Grumont, R., Lock, P., Mollinari, M., Shannon, F. M., Moore, A., and Gerondakis, S. (2004) The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF-kappaB-dependent c-myc expression, *Immunity*, **21**, 19-30, doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.004.
 54. Obst, R. (2015) The timing of T cell priming and cycling, *Front. Immunol.*, **6**, 563, doi: 10.3389/fimmu.2015.00563.
 55. Hommel, M., and Kyewski, B. (2003) Dynamic changes during the immune response in T cell-antigen-presenting cell clusters isolated from lymph nodes, *J. Exp. Med.*, **197**, 269-280, doi: 10.1084/jem.20021512.
 56. Tan, S. Y., Kelkar, Y., Hadjipanayis, A., Shipstone, A., Wynn, T. A., and Hall, J. P. (2020) Metformin and 2-deoxyglucose collaboratively suppress human CD4⁺ T cell effector functions and activation-induced metabolic reprogramming, *J. Immunol.*, **205**, 957-967, doi: 10.4049/jimmunol.2000137.
 57. Macintyre, A. N., Gerriets, V. A., Nichols, A. G., Michalek, R. D., Rudolph, M. C., Deoliveira, D., Anderson, S. M., Abel, E. D., Chen, B. J., Hale, L. P., and Rathmell, J. C. (2014) The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function, *Cell Metab.*, **20**, 61-72, doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.004.
 58. Nian, Y., Iske, J., Maenosono, R., Minami, K., Heinbokel, T., Quante, M., Liu, Y., Azuma, H., Yang, J., Abdi, R., Zhou, H., Elkhali, A., and Tullius, S. G. (2021) Targeting age-specific changes in CD4⁺ T cell metabolism ameliorates alloimmune responses and prolongs graft survival, *Aging Cell*, **20**, e13299, doi: 10.1111/ace1.13299.
 59. Chen, X., Sunkel, B., Wang, M., Kang, S., Wang, T., Gnanaprakasam, J. N. R., Liu, L., Cassel, T. A., Scott, D. A., Muñoz-Cabello, A. M., Lopez-Barneo, J., Yang, J., Lane, A. N., Xin, G., Stanton, B. Z., Fan, T. W., and Wang, R. (2022) Succinate dehydrogenase/complex II is critical for metabolic and epigenetic regulation of T cell proliferation and inflammation, *Sci. Immunol.*, **7**, eabm8161, doi: 10.1126/sciimmunol.abm8161.
 60. Ma, E. H., Bantug, G., Griss, T., Condotta, S., Johnson, R. M., Samborska, B., Mainolfi, N., Suri, V., Guak, H., Balmer, M. L., Verway, M. J., Raissi, T. C., Tsui, H., Boukhalel, G., Henriques da Costa, S., Frezza, C., Krawczyk, C. M., Friedman, A., Manfredi, M., Richer, M. J., Hess, C., and Jones, R. G. (2017) Serine is an essential metabolite for effector T cell expansion, *Cell Metab.*, **25**, 345-357, doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.011.

61. Caro-Maldonado, A., Wang, R., Nichols, A. G., Kuraoka, M., Milasta, S., Sun, L. D., Gavin, A. L., Abel, E. D., Kelsoe, G., Green, D. R., and Rathmell, J. C. (2014) Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells, *J. Immunol.*, **192**, 3626-3636, doi: 10.4049/jimmunol.1302062.
62. Kim, J., Kim, Y.-S., and Park, S.-H. (2021) Metformin as a treatment strategy for Sjögren's syndrome, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7231, doi: 10.3390/ijms22137231.
63. Pählman, C., Qi, Z., Murray, C. M., Ferguson, D., Bundick, R. V., Donald, D. K., and Ekberg, H. (2013) Immunosuppressive properties of a series of novel inhibitors of the monocarboxylate transporter MCT-1, *Transplant Int.*, **26**, 22-29, doi: 10.1111/j.1432-2277.2012.01579.x.
64. Berod, L., Friedrich, C., Nandan, A., Freitag, J., Hagemann, S., Harmrolfs, K., Sandouk, A., Hesse, C., Castro, C. N., Bähre, H., Tschirner, S. K., Gorinski, N., Gohmert, M., Mayer, C. T., Huehn, J., Ponimaskin, E., Abraham, W. R., Müller, R., Lochner, M., and Sparwasser, T. (2014) *De novo* fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells, *Nat. Med.*, **20**, 1327-1333, doi: 10.1038/nm.3704.
65. Littman, D. R., and Rudensky, A. Y. (2010) Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation, *Cell*, **140**, 845-858, doi: 10.1016/j.cell.2010.02.021.
66. Singh, R. P., Hasan, S., Sharma, S., Nagra, S., Yamaguchi, D. T., Wong, D. T., Hahn, B. H., and Hossain, A. (2014) Th17 cells in inflammation and autoimmunity, *Autoimmun. Rev.*, **13**, 1174-1181, doi: 10.1016/j.autrev.2014.08.019.
67. Ohue, Y., and Nishikawa, H. (2019) Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci.*, **110**, 2080-2089, doi: 10.1111/cas.14069.
68. Gerriets, V. A., Kishton, R. J., Nichols, A. G., Macintyre, A. N., Inoue, M., Ilkayeva, O., Winter, P. S., Liu, X., Priyadharshini, B., Slawinska, M. E., Haeberli, L., Huck, C., Turka, L. A., Wood, K. C., Hale, L. P., Smith, P. A., Schneider, M. A., MacIver, N. J., Locasale, J. W., Newgard, C. B., Shinohara, M. L., and Rathmell, J. C. (2015) Metabolic programming and PDHK1 control CD4⁺ T cell subsets and inflammation, *J. Clin. Invest.*, **125**, 194-207, doi: 10.1172/JCI76012.
69. Shi, L. Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D. R., and Chi, H. (2011) HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of T_H17 and T_{reg} cells, *J. Exp. Med.*, **208**, 1367-1376, doi: 10.1084/jem.20110278.
70. Cluxton, D., Petrasca, A., Moran, B., and Fletcher, J. M. (2019) Differential regulation of human Treg and Th17 cells by fatty acid synthesis and glycolysis, *Front. Immunol.*, **10**, 115, doi: 10.3389/fimmu.2019.00115.
71. Wang, H., Teng, X., Abboud, G., Li, W., Ye, S., and Morel, L. (2021) D-mannose ameliorates autoimmune phenotypes in mouse models of lupus, *BMC Immunol.*, **22**, 1, doi: 10.1186/s12865-020-00392-7.
72. Angiari, S., Runtsch, M. C., Sutton, C. E., Pålsson-McDermott, E. M., Kelly, B., Rana, N., Kane, H., Papadopoulou, G., Pearce, E. L., Mills, K. H. G., and O'Neill, L. A. J. (2020) Pharmacological activation of pyruvate kinase M2 inhibits CD4⁺ T cell pathogenicity and suppresses autoimmunity, *Cell Metab.*, **31**, 391-405, doi: 10.1016/j.cmet.2019.10.015.
73. Xu, K., Yin, N., Peng, M., Stamatiades, E. G., Chhangawala, S., Shyu, A., Li, P., Zhang, X., Do, M. H., Capistrano, K. J., Chou, C., Leslie, C. S., and Li, M. O. (2021) Glycolytic ATP fuels phosphoinositide 3-kinase signaling to support effector T helper 17 cell responses, *Immunity*, **54**, 976-987, doi: 10.1016/j.immuni.2021.04.008.
74. Pandit, M., Timilshina, M., and Chang, J.-H. (2021) LKB1-PTEN axis controls Th1 and Th17 cell differentiation via regulating mTORC1, *J. Mol. Med.*, **99**, 1139-1150, doi: 10.1007/s00109-021-02090-2.
75. Miska, J., Lee-Chang, C., Rashidi, A., Muroski, M. E., Chang, A. L., Lopez-Rosas, A., Zhang, P., Panek, W. K., Cordero, A., Han, Y., Ahmed, A. U., Chandel, N. S., and Lesniak, M. S. (2019) HIF-1 α is a metabolic switch between glycolytic-driven migration and oxidative phosphorylation-driven immunosuppression of Tregs in glioblastoma, *Cell Rep.*, **27**, 226-237, doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.029.
76. Chen, X., Li, S., Long, D., Shan, J., and Li, Y. (2021) Rapamycin facilitates differentiation of regulatory T cells via enhancement of oxidative phosphorylation, *Cell. Immunol.*, **365**, 104378, doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104378.
77. Qin, J., Liu, Q., Liu, A., Leng, S., Wang, S., Li, C., Ma, J., Peng, J., and Xu, M. (2022) Empagliflozin modulates CD4⁺ T-cell differentiation via metabolic reprogramming in immune thrombocytopenia, *British Br. J. Haematol.*, **198**, 765-775, doi: 10.1111/bjh.18293.
78. Gualdoni, G. A., Mayer, K. A., Göschl, L., Boucheron, N., Ellmeier, W., and Zlabinger, G. J. (2016) The AMP analog AICAR modulates the Treg/Th17 axis through enhancement of fatty acid oxidation, *FASEBJ.*, **30**, 3800-3809, doi: 10.1096/fj.201600522R.
79. Field, C. S., Baixauli, F., Kyle, R. L., Puleston, D. J., Cameron, A. M., Sanin, D. E., Hippen, K. L., Loschi, M., Thangavelu, G., Corrado, M., Edwards-Hicks, J., Grzes, K. M., Pearce, E. J., Blazar, B. R., and Pearce, E. L. (2020) Mitochondrial integrity regulated by lipid metabolism is a cell-intrinsic checkpoint for Treg suppressive function, *Cell Metab.*, **31**, 422-437, doi: 10.1016/j.cmet.2019.11.021.
80. Zhu, H., Liu, Z., An, J., Zhang, M., Qiu, Y., and Zou, M.-H. (2021) Activation of AMPK α 1 is essential

- for regulatory T cell function and autoimmune liver disease prevention, *Cell. Mol. Immunol.*, **18**, 2609-2617, doi: 10.1038/s41423-021-00790-w.
81. Clambey, E. T., McNamee, E. N., Westrich, J. A., Glover, L. E., Campbell, E. L., Jedlicka, P., de Zoeten, E. F., Cambier, J. C., Stenmark, K. R., Colgan, S. P., and Eltzschig, H. K. (2012) Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 2784-2793, doi: 10.1073/pnas.1202366109.
 82. Zeng, H., Yang, K., Cloer, C., Neale, G., Vogel, P., and Chi, H. (2013) mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function, *Nature*, **499**, 485-490, doi: 10.1038/nature12297.
 83. Allocco, J. B., and Alegre, M.-L. (2020) Exploiting immunometabolism and T cell function for solid organ transplantation, *Cell. Immunol.*, **351**, 104068, doi: 10.1016/j.cellimm.2020.104068.
 84. Lopez-Olivo, M. A., Siddhanamatha, H. R., Shea, B., Tugwell, P., Wells, G. A., and Suarez-Almazor, M. E. (2014) Methotrexate for treating rheumatoid arthritis, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2014**, CD000957, doi: 10.1002/14651858.CD000957.pub2.
 85. Lee, J.-U., Kim, L.-K., and Choi, J.-M. (2018) Revisiting the concept of targeting NFAT to control T cell immunity and autoimmune diseases, *Front. Immunol.*, **9**, 2747, doi: 10.3389/fimmu.2018.02747.
 86. Gao, W., Lu, Y., El Essawy, B., Oukka, M., Kuchroo, V. K., and Strom, T. B. (2007) Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in *de novo* generation of alloantigen-specific regulatory T cells, *Am. J. Transplant.*, **7**, 1722-1732, doi: 10.1111/j.1600-6143.2007.01842.x.
 87. Xu, T., Sun, D., Chen, Y., and Ouyang, L. (2020) Targeting mTOR for fighting diseases: a revisited review of mTOR inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, **199**, 112391, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112391.
 88. Lai, Z.-W., Hanczko, R., Bonilla, E., Caza, T. N., Clair, B., Bartos, A., Miklossy, G., Jimah, J., Doherty, E., Tily, H., Francis, L., Garcia, R., Dawood, M., Yu, J., Ramos, I., Coman, I., Faraone, S. V., Phillips, P. E., and Perl, A. (2012) N-acetylcysteine reduces disease activity by blocking mammalian target of rapamycin in T cells from systemic lupus erythematosus patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum.*, **64**, 2937-2946, doi: 10.1002/art.34502.
 89. Walters, M. T., Rubin, C. E., Keightley, S. J., Ward, C. D., and Cawley, M. I. (1986) A double-blind, cross-over, study of oral N-acetylcysteine in Sjögren's syndrome, *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, **61**, 253-258.
 90. Fernandez, D., Bonilla, E., Mirza, N., Niland, B., and Perl, A. (2006) Rapamycin reduces disease activity and normalizes T cell activation-induced calcium fluxing in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.*, **54**, 2983-2988, doi: 10.1002/art.22085.
 91. Bruyn, G. A. W., Tate, G., Caeiro, F., Maldonado-Cocco, J., Westhovens, R., Tannenbaum, H., Bell, M., Forre, O., Bjorneboe, O., Tak, P. P., Abeywickrama, K. H., Bernhardt, P., van Riel, P. L., and RADD Study Group (2008) Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a 3-month, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study, *Ann. Rheum. Dis.*, **67**, 1090-1095, doi: 10.1136/ard.2007.078808.
 92. Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A., and Kopf, M. (1999) Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection, *Eur. J. Immunol.*, **29**, 291-299, doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<291::AID-IMMU291>3.0.CO;2-K.
 93. Park, B. V., and Pan, F. (2015) Metabolic regulation of T cell differentiation and function, *Mol. Immunol.*, **68**, 497-506, doi: 10.1016/j.molimm.2015.07.027.
 94. Araki, K., Turner, A. P., Shaffer, V. O., Gangappa, S., Keller, S. A., Bachmann, M. F., Larsen, C. P., and Ahmed, R. (2009) mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation, *Nature*, **460**, 108-112, doi: 10.1038/nature08155.
 95. Sukumar, M., Liu, J., Ji, Y., Subramanian, M., Crompton, J. G., Yu, Z., Roychoudhuri, R., Palmer, D. C., Muranski, P., Karoly, E. D., Mohnsey, R. P., Klebanoff, C. A., Lal, A., Finkel, T., Restifo, N. P., and Gattinoni, L. (2013) Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8⁺ T cell memory and antitumor function, *J. Clin. Invest.*, **123**, 4479-4488, doi: 10.1172/JCI69589.
 96. Wenes, M., Jaccard, A., Wyss, T., Maldonado-Pérez, N., Teoh, S. T., Lepez, A., Renaud, F., Franco, F., Waridel, P., Yacoub Maroun, C., Tschumi, B., Dumauthioz, N., Zhang, L., Donda, A., Martín, F., Migliorini, D., Lunt, S. Y., Ho, P. C., and Romero, P. (2022) The mitochondrial pyruvate carrier regulates memory T cell differentiation and antitumor function, *Cell Metab.*, **34**, 731-746, doi: 10.1016/j.cmet.2022.03.013.
 97. He, J., Shangguan, X., Zhou, W., Cao, Y., Zheng, Q., Tu, J., Hu, G., Liang, Z., Jiang, C., Deng, L., Wang, S., Yang, W., Zuo, Y., Ma, J., Cai, R., Chen, Y., Fan, Q., Dong, B., Xue, W., Tan, H., Qi, Y., Gu, J., Su, B., Eugene Chin, Y., Chen, G., Wang, Q., Wang, T., and Cheng, J. (2021) Glucose limitation activates AMPK coupled SENP1-Sirt3 signalling in mitochondria for T cell memory development, *Nat. Commun.*, **12**, 4371, doi: 10.1038/s41467-021-24619-2.
 98. Dumauthioz, N., Tschumi, B., Wenes, M., Marti, B., Wang, H., Franco, F., Li, W., Lopez-Mejia, I. C., Fajas, L., Ho, P. C., Donda, A., Romero, P., and Zhang, L. (2021) Enforced PGC-1 α expression promotes CD8 T cell fitness, memory formation

- and antitumor immunity, *Cell. Mol. Immunol.*, **18**, 1761-1771, doi: 10.1038/s41423-020-0365-3.
99. Pearce, E. L., Walsh, M. C., Cejas, P. J., Harms, G. M., Shen, H., Wang, L.-S., Jones, R. G., and Choi, Y. (2009) Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism, *Nature*, **460**, 103-107, doi: 10.1038/nature08097.
 100. O'Sullivan, D., van der Windt, G. J. W., Huang, S. C.-C., Curtis, J. D., Chang, C.-H., Buck, M. D., Qiu, J., Smith, A. M., Lam, W. Y., DiPlato, L. M., Hsu, F. F., Birnbaum, M. J., Pearce, E. J., and Pearce, E. L. (2014) Memory CD8⁺ T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development, *Immunity*, **41**, 75-88, doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.005.
 101. Cui, G., Staron, M. M., Gray, S. M., Ho, P.-C., Amezcua, R. A., Wu, J., and Kaech, S. M. (2015) IL-7-induced glycerol transport and TAG synthesis promotes memory CD8⁺ T cell longevity, *Cell*, **161**, 750-761, doi: 10.1016/j.cell.2015.03.021.
 102. Pan, Y., Tian, T., Park, C. O., Lofftus, S. Y., Mei, S., Liu, X., Luo, C., O'Malley, J. T., Gehad, A., Teague, J. E., Divito, S. J., Fuhlbrigge, R., Puigserver, P., Krueger, J. G., Hotamisligil, G. S., Clark, R. A., and Kupper, T. S. (2017) Survival of tissue-resident memory T cells requires exogenous lipid uptake and metabolism, *Nature*, **543**, 252-256, doi: 10.1038/nature21379.
 103. Han, S.-J., Glatman Zaretsky, A., Andrade-Oliveira, V., Collins, N., Dzutsev, A., Shaik, J., Morais da Fonseca, D., Harrison, O. J., Tamoutounour, S., Byrd, A. L., Smelkinson, M., Bouladoux, N., Bliska, J. B., Brenchley, J. M., Brodsky, I. E., and Belkaid, Y. (2017) White adipose tissue is a reservoir for memory T cells and promotes protective memory responses to infection, *Immunity*, **47**, 1154-1168, doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.009.
 104. Dimeloe, S., Mehling, M., Frick, C., Loeliger, J., Bantug, G. R., Sauder, U., Fischer, M., Belle, R., Develioglu, L., Tay, S., Langenkamp, A., and Hess, C. (2016) The immune-metabolic basis of effector memory CD4⁺ T cell function under hypoxic conditions, *J. Immunol.*, **196**, 106-114, doi: 10.4049/jimmunol.1501766.
 105. Van der Windt, G. J. W., Everts, B., Chang, C.-H., Curtis, J. D., Freitas, T. C., Amiel, E., Pearce, E. J., and Pearce, E. L. (2012) Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8⁺ T cell memory development, *Immunity*, **36**, 68-78, doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.007.
 106. Prlic, M., and Bevan, M. J. (2009) Immunology: a metabolic switch to memory, *Nature*, **460**, 41-42, doi: 10.1038/460041a.
 107. Luo, L., Li, X., Zhang, J., Zhu, C., Jiang, M., Luo, Z., Qin, B., Wang, Y., Chen, B., Du, Y., Lou, Y., and You, J. (2021) Enhanced immune memory through a constant photothermal-metabolism regulation for cancer prevention and treatment, *Biomaterials*, **270**, 120678, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120678.
 108. Riva, A., and Chokshi, S. (2018) Immune checkpoint receptors: homeostatic regulators of immunity, *Hepatol. Int.*, **12**, 223-236, doi: 10.1007/s12072-018-9867-9.
 109. Fife, B. T., and Pauken, K. E. (2011) The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1217**, 45-59, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05919.x.
 110. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., and Riley, J. L. (2004) SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation, *J. Immunol.*, **173**, 945-954, doi: 10.4049/jimmunol.173.2.945.
 111. Riley, J. L. (2009) PD-1 signaling in primary T cells, *Immunol. Rev.*, **229**, 114-125, doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00767.x.
 112. Francisco, L. M., Sage, P. T., and Sharpe, A. H. (2010) The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity, *Immunol. Rev.*, **236**, 219-242, doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
 113. Patsoukis, N., Bardhan, K., Chatterjee, P., Sari, D., Liu, B., Bell, L. N., Karoly, E. D., Freeman, G. J., Petkova, V., Seth, P., Li, L., and Boussiotis, V. A. (2015) PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation, *Nat. Commun.*, **6**, 6692, doi: 10.1038/ncomms7692.
 114. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity, *Ann. Rev. Immunol.*, **26**, 677-704, doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
 115. Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., and Freeman, G. J. (2007) The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection, *Nat. Immunol.*, **8**, 239-245, doi: 10.1038/ni1443.
 116. Ohaegbulam, K. C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., Yao, Y., and Zang, X. (2015) Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway, *Trends Mol. Med.*, **21**, 24-33, doi: 10.1016/j.molmed.2014.10.009.
 117. Antonangeli, F., Natalini, A., Garassino, M. C., Sica, A., Santoni, A., and Di Rosa, F. (2020) Regulation of PD-L1 expression by NF- κ B in cancer, *Front. Immunol.*, **11**, 584626, doi: 10.3389/fimmu.2020.584626.
 118. Brown, J. A., Dorfman, D. M., Ma, F.-R., Sullivan, E. L., Munoz, O., Wood, C. R., Greenfield, E. A., and Freeman, G. J. (2003) Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production, *J. Immunol.*, **170**, 1257-1266, doi: 10.4049/jimmunol.170.3.1257.
 119. Kinter, A. L., Godbout, E. J., McNally, J. P., Sereti, I., Roby, G. A., O'Shea, M. A., and Fauci, A. S. (2008)

- The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands, *J. Immunol.*, **181**, 6738-6746, doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6738.
120. Blackburn, S. D., Crawford, A., Shin, H., Polley, A., Freeman, G. J., and Wherry, E. J. (2010) Tissue-specific differences in PD-1 and PD-L1 expression during chronic viral infection: implications for CD8 T-cell exhaustion, *Virology*, **84**, 2078-2089, doi: 10.1128/JVI.01579-09.
 121. Zhang, Y., Zhou, Y., Lou, J., Li, J., Bo, L., Zhu, K., Wan, X., Deng, X., and Cai, Z. (2010) PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction, *Critical Care*, **14**, R220, doi: 10.1186/cc9354.
 122. Alfei, F., and Zehn, D. (2017) T cell exhaustion: an epigenetically imprinted phenotypic and functional makeover, *Trends Mol. Med.*, **23**, 769-771, doi: 10.1016/j.molmed.2017.07.006.
 123. He, W., Xiao, K., Xu, J., Guan, W., Xie, S., Wang, K., Yan, P., Fang, M., and Xie, L. (2021) Recurrent sepsis exacerbates CD4⁺ T cell exhaustion and decreases antiviral immune responses, *Front. Immunol.*, **12**, 627435, doi: 10.3389/fimmu.2021.627435.
 124. Philip, M., and Schietinger, A. (2019) Heterogeneity and fate choice: T cell exhaustion in cancer and chronic infections, *Curr. Opin. Immunol.*, **58**, 98-103, doi: 10.1016/j.coi.2019.04.014.
 125. Fenwick, C., Joo, V., Jacquier, P., Noto, A., Banga, R., Perreau, M., and Pantaleo, G. (2019) T-cell exhaustion in HIV infection, *Immunol. Rev.*, **292**, 149-163, doi: 10.1111/imr.12823.
 126. Vardhana, S. A., Hwee, M. A., Berisa, M., Wells, D. K., Yost, K. E., King, B., Smith, M., Herrera, P. S., Chang, H. Y., Satpathy, A. T., van den Brink, M. R. M., Cross, J. R., and Thompson, C. B. (2020) Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation limits the self-renewal of T cells exposed to persistent antigen, *Nat. Immunol.*, **21**, 1022-1033, doi: 10.1038/s41590-020-0725-2.
 127. Liu, Y.-N., Yang, J.-F., Huang, D.-J., Ni, H.-H., Zhang, C.-X., Zhang, L., He, J., Gu, J. M., Chen, H. X., Mai, H.Q., Chen, Q.Y., Zhang, X.S., Gao, S., and Li, J. (2020) Hypoxia induces mitochondrial defect that promotes T cell exhaustion in tumor microenvironment through MYC-regulated pathways, *Front. Immunol.*, **11**, 1906, doi: 10.3389/fimmu.2020.01906.
 128. Scharping, N. E., Rivadeneira, D. B., Menk, A. V., Vignali, P. D. A., Ford, B. R., Rittenhouse, N. L., Peralta, R., Wang, Y., Wang, Y., DePeaux, K., Poholek, A. C., and Delgoffe, G. M. (2021) Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion, *Nat. Immunol.*, **22**, 205-215, doi: 10.1038/s41590-020-00834-9.
 129. Yu, Y.-R., Imrichova, H., Wang, H., Chao, T., Xiao, Z., Gao, M., Rincon-Restrepo, M., Franco, F., Genolet, R., Cheng, W. C., Jandus, C., Coukos, G., Jiang, Y. F., Locasale, J. W., Zippelius, A., Liu, P. S., Tang, L., Bock, C., Vannini, N., and Ho, P. C. (2020) Disturbed mitochondrial dynamics in CD8⁺ TILs reinforce T cell exhaustion, *Nat. Immunol.*, **21**, 1540-1551, doi: 10.1038/s41590-020-0793-3.
 130. Li, W., Cheng, H., Li, G., and Zhang, L. (2020) Mitochondrial damage and the road to exhaustion, *Cell Metab.*, **32**, 905-907, doi: 10.1016/j.cmet.2020.11.004.
 131. Finisguerra, V., Dvorakova, T., Formenti, M., Van Meerbeeck, P., Mignon, L., Gallez, B., and Van den Eynde, B. J. (2023) Metformin improves cancer immunotherapy by directly rescuing tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes from hypoxia-induced immunosuppression, *J. Immunother. Cancer*, **11**, e005719, doi: 10.1136/jitc-2022-005719.
 132. Haws, S. A., Leech, C. M., and Denu, J. M. (2020) Metabolism and the epigenome: a dynamic relationship, *Trends Biochem. Sci.*, **45**, 731-747, doi: 10.1016/j.tibs.2020.04.002.
 133. 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., Dufour, E., Spelbrink, J. N., Weinberg, S. E., Zhao, Y., DeBerardinis, R. J., and Chandel, N. S. (2016) TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions, *Mol. Cell*, **61**, 199-209, doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.002.
 134. Madiraju, P., Pande, S. V., Prentki, M., and Madiraju, S. R. M. (2009) Mitochondrial acetylcarnitine provides acetyl groups for nuclear histone acetylation, *Epigenetics*, **4**, 399-403, doi: 10.4161/epi.4.6.9767.
 135. Lozoya, O. A., Wang, T., Grenet, D., Wolfgang, T. C., Sobhany, M., Ganini da Silva, D., Riadi, G., Chandel, N., Woychik, R. P., and Santos, J. H. (2019) Mitochondrial acetyl-CoA reversibly regulates locus-specific histone acetylation and gene expression, *Life Sci. Alliance*, **2**, e201800228, doi: 10.26508/lsa.201800228.
 136. Peng, M., Yin, N., Chhangawala, S., Xu, K., Leslie, C. S., and Li, M. O. (2016) Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism, *Science*, **354**, 481-484, doi: 10.1126/science.aaf6284.
 137. Delsite, R., Kachhap, S., Anbazhagan, R., Gabrielson, E., and Singh, K. K. (2002) Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells, *Mol. Cancer*, **1**, 6, doi: 10.1186/1476-4598-1-6.
 138. Carey, B. W., Finley, L. W. S., Cross, J. R., Allis, C. D., and Thompson, C. B. (2015) Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells, *Nature*, **518**, 413-416, doi: 10.1038/nature13981.
 139. Liu, P.-S., Wang, H., Li, X., Chao, T., Teav, T., Christen, S., Di Conza, G., Cheng, W. C., Chou, C. H., Vavakova, M., Muret, C., Debackere, K.,

- Mazzone, M., Huang, H. D., Fendt, S. M., Ivanisevic, J., and Ho, P. C. (2017) α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming, *Nat. Immunol.*, **18**, 985-994, doi: 10.1038/ni.3796.
140. Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M. T., Liu, L. X., Jiang, W. Q., Liu, J., Zhang, J. Y., Wang, B., Frye, S., Zhang, Y., Xu, Y. H., Lei, Q. Y., Guan, K. L., Zhao, S. M., and Xiong, Y. (2011) Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases, *Cancer Cell*, **19**, 17-30, doi: 10.1016/j.ccr.2010.12.014.
 141. Sciacovelli, M., Gonçalves, E., Johnson, T.I., Zecchini, V. R., da Costa, A. S. H., Gaude, E., Drubbel, A. V., Theobald, S. J., Abbo, S. R., Tran, M. G., Rajeeve, V., Cardaci, S., Foster, S., Yun, H., Cutillas, P., Warren, A., Gnanapragasam, V., Gottlieb, E., Franze, K., Huntly, B., Maher, E. R., Maxwell, P. H., Saez-Rodriguez, J., and Frezza, C. (2016) Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition, *Nature*, **537**, 544-547, doi: 10.1038/nature19353.
 142. Nabe, S., Yamada, T., Suzuki, J., Toriyama, K., Yasuoka, T., Kuwahara, M., Shiraishi, A., Take-naka, K., Yasukawa, M., and Yamashita, M. (2018) Reinforce the antitumor activity of CD8⁺ T cells via glutamine restriction, *Cancer Sci.*, **109**, 3737-3750, doi: 10.1111/cas.13827.
 143. Suzuki, J., Yamada, T., Inoue, K., Nabe, S., Kuwahara, M., Takemori, N., Matsuda, S., Kanoh, M., Imai, Y., Yasukawa, M., and Yamashita, M. (2018) The tumor suppressor menin prevents effector CD8 T-cell dysfunction by targeting mTORC1-dependent metabolic activation, *Nat. Commun.*, **9**, 3296, doi: 10.1038/s41467-018-05854-6.
 144. Sun, L., Zhang, L., Yu, J., Zhang, Y., Pang, X., Ma, C., et al. (2020) Clinical efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 inhibitors for the treatment of advanced or metastatic cancer: a systematic review and meta-analysis, *Sci. Rep.*, **10**, 2083, doi: 10.1038/s41598-020-58674-4.
 145. Seidel, J. A., Otsuka, A., and Kabashima, K. (2018) Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations, *Front. Oncol.*, **8**, 86, doi: 10.3389/fonc.2018.00086.
 146. Chowdhury, P. S., Chamoto, K., Kumar, A., and Honjo, T. (2018) PPAR-induced fatty acid oxidation in T cells increases the number of tumor-reactive CD8⁺ T cells and facilitates anti-PD-1 therapy, *Cancer Immunol. Res.*, **6**, 1375-1387, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0095.
 147. Abdul-Rahman, T., Bukhari, S. M. A., Herrera, E. C., Awuah, W. A., Lawrence, J., and de Andrade, H. (2022) Lipid lowering therapy: an era beyond statins, *Curr. Probl. Cardiol.*, **47**, 101342, doi: 10.1016/j.cpcardiol.2022.101342.
 148. Lemberg, K. M., Gori, S. S., Tsukamoto, T., Rais, R., and Slusher, B. S. (2022) Clinical development of metabolic inhibitors for oncology, *J. Clin. Invest.*, **132**, e148550, doi: 10.1172/JCI148550.
 149. Peng, M., and Li, M. O. (2023) Metabolism along the life journey of T cells, *Life Metab.*, **2**, 1-9, doi: 10.1093/lifemeta/load002.

T-LYMPHOCYTE METABOLIC FEATURES AND TECHNIQUES TO MODULATE THEM

Review

V. V. Vlasova*[#] and K. V. Shmagel[#]

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
614081 Perm, Russia; e-mail: violetbaudelaire73@gmail.com*

T cells demonstrate a high degree of complexity and a broad range of functions which distinguish them from other immune cells. Throughout life, T lymphocytes experience several functional states: quiescence, activation, proliferation, differentiation, performance of effector and regulatory functions, memory formation, and apoptosis. Metabolism supports all the T cell functions, providing lymphocytes with energy, biosynthetic substrates, and signaling molecules. Therefore, T cells usually restructure their metabolism as they transition from one functional state to another. The strong association between metabolism and T cell function implies that the immune response can be controlled by manipulating metabolic processes within T lymphocytes. This review aims to highlight the main metabolic adaptations necessary for T cell function, as well as the recent progress in techniques to modulate the lymphocyte metabolic features.

Keywords: T lymphocytes, metabolism, glycolysis, TCA, oxidative phosphorylation, mitochondria, proliferation, differentiation, immunological memory, exhaustion

С-КОНЦЕВЫЕ ФРАГМЕНТЫ АПЕЛИНА: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Обзор

© 2023 О.И. Писаренко*, И.М. Студнева

ФГБУ «НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова» Минздрава России,
121552 Москва, Россия; электронная почта: olpi@live.ru

Поступила в редакцию 30.05.2023

После доработки 10.09.2023

Принята к публикации 11.09.2023

В последние годы показано, что адипокин апелин — эндогенный лиганд рецептора APJ — участвует в регуляции сердечно-сосудистой, гипоталамо-гипофизарной, желудочно-кишечной и иммунной системах человека. В обзоре представлены данные литературы о системе апелин/APJ, ее влиянии на сосудистую систему, пищеварение, жировую ткань и водно-электролитный обмен. Обсуждается действие пептидов апелина при ожирении, диабете и сердечно-сосудистых заболеваниях, а также их кардиопротекторные эффекты, связанные с активацией реперфузионных киназ и проявлением антиоксидантных свойств. Обобщены результаты собственных экспериментов по влиянию апелина-13, [Pyr1]апелина-13, апелина-12 и их химически модифицированных аналогов на сердце в норме и при моделировании патофизиологических состояний *in vitro* и *in vivo*. Показано, что спектр действия С-концевых фрагментов апелина на поврежденный миокард охватывает уменьшение гибели кардиомиоцитов от некроза, снижение повреждения клеточных мембран, улучшение метаболического состояния миокарда, снижение образования активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов. Сделан вывод о перспективности молекулярного конструирования фармакологических агонистов рецептора APJ, обладающих протеолитической устойчивостью и стабильностью при хранении, которые могут служить основой для разработки нового класса лекарственных средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апелин, структурные аналоги, сердце, экспериментальная патология, метаболизм, мембраны кардиомиоцитов, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода, антиоксидантные ферменты.

DOI: 10.31857/S0320972523110179, EDN: MMSYTE

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо установлено, что жировая ткань является не только хранилищем запасенной энергии, но и активным эндокринным органом, в котором продуцируются пептидные гормоны — адипокины [1]. Они обладают разнообразными биологическими эффектами и оказывают свое влияние во многих органах прямо или через нейроэндокринные механизмы,

взаимодействуя с гормонами гипофиза, инсулином, катехоламинами. Адипокины влияют на обмен липидов, гомеостаз глюкозы, процессы ангиогенеза, иммунитета, воспаления, свертывания крови, образования костной ткани, опухолевого роста и др. Одним из наиболее активно изучающихся адипокинов является апелин — лиганд сопряженного с G-белком семидоменного трансмембранного рецептора APJ [2]. Апелин активно экспрессируется

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ИМ — инфаркт миокарда; ЛЖ — левый желудочек сердца; ПЭГ — полиэтиленгликоль; ACE2 — ангиотензин-превращающий фермент 2; Akt — протеинкиназа B; APJ — рецептор апелина (APLNR), связанный с G-белком; CAT — каталаза; CD10 — неприлизин; MEK1/2 — киназа митоген-активируемой протеинкиназы (MAP2K); mitoK⁺ATP-каналы — митохондриальные ATP-зависимые K⁺-каналы; mPTP — митохондриальная пора; MDA — малоновый диальдегид; PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; PKC — протеинкиназа C; PLCβ — фосфолипаза Cβ; PRCP — пролилкарбокисептидаза; [Pyr1]апелин-13 — пироглутаминированный по N-концевому глутамину апелин-13; RISK-киназа — киназы спасения от реперфузионного повреждения; SOD — супероксиддисмутаза; O₂[•] — супероксидный анион-радикал; ONOO[•] — пероксинитрит.

* Адресат для корреспонденции.

различными тканями, включая эндотелиальные и гладкомышечные клетки коронарных сосудов и кардиомиоциты. Активация системы апелин/APJ оказывает мощное регуляторное действие на сердечно-сосудистую систему. С-концевые фрагменты апелина способны снижать метаболические и функциональные повреждения сердца при различной экспериментальной патологии [3]. Это указывает на целесообразность использования таких пептидов в качестве потенциальных лекарственных средств. В настоящем обзоре рассмотрены структурные и функциональные свойства природных и модифицированных пептидов апелина и молекулярные механизмы их действия.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АПЕЛИНА

Апелин и его рецептор APJ. Сопряженный с G-белком рецептор APJ, расположенный в 11 хромосоме (локус 11q12), был обнаружен O'Dowd et al. [4] в 1993 г. Он имеет высокую гомологичность с рецептором ангиотензина II 1-го типа AT1 (до 50% по гидрофобным трансмембранным областям), но не связывается с ангиотензином II. Рецептор APJ был идентифицирован у большого числа различных видов животных и человека, он состоит из 377–380 а.о. и содержит 7 трансмембранных доменов. На мембране рецептор существует в форме мономера, димера или олигомера с возможными взаимными превращениями [5], которые могут быть важными для дальнейшей трансдукции сигнала. Рецептор APJ способен к интернализации [6] и ассоциации с другими рецепторами [7, 8]. Его долгое время считали «орфановым» рецептором, пока апе-

лин не был обнаружен в качестве родственного лиганда после выделения из экстрактов желудка крупного рогатого скота в 1998 г. [9]. Рецептор APJ широко распространен в организме, включая скелетную мышцу, сердце, легочную ткань, молочную железу, яичники, головной мозг, почки, поджелудочную железу и надпочечники [10]. Это указывает на роль системы апелин/APJ в регуляции ряда физиологически важных показателей — жидкостного гомеостаза [11], артериального давления [12], метаболического контроля [13] и других. Недавно в эмбриональных стволовых клетках человека был идентифицирован эндогенный лиганд рецептора APJ, названный ELABELA. ELABELA — это пептид, состоящий из 32 а.о., который играет роль в эмбриональном развитии сердца [14].

Ген апелина локализован в X-хромосоме (локус Xq25-q26.1) [15] и кодирует препробелок, состоящий из 77 а.о., с сигнальной последовательностью в N-концевой области. После транслокации в эндоплазматический ретикулум и отделения сигнального пептида образуется пробелок из 55 а.о. Первоначально апелин-55 считался неактивным пробелком, а апелин-36 — предшественником биологически активных изоформ: апелина-17 и апелина-13 [9, 10, 16]. Это было связано с наличием в апелине-36 фрагментов Arg-Arg — типичного сайта расщепления трипсиноподобной эндопептидазой [17]. Апелин-13 может подвергаться посттрансляционному пироглутаминированию, катализируемому глутаминилциклазой (QC), на уровне N-концевого остатка глутамина в [Pyr1]апелин-13. Удаление остатка Gln в апелине-13 приводит к образованию наиболее короткого из биоактивных фрагментов

Таблица 1. Препробелок апелина и его С-концевые фрагменты

Пептид	Аминокислотная последовательность
Препроапелин	MNLRLCVQALLLWLSLTAVCGGSLMPLPDGNGLEDGNVRHLVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRQQRPRLSHKGMPMF
Апелин-55	GSLMPLPDGNGLEDGNVRHLVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRQQRPRLSHKGMPMF
Апелин-36	LVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRQQRPRLSHKGMPMF
Апелин-17	KFRQQRPRLSHKGMPMF
Апелин-13	QRPRLSHKGMPMF
[Pyr1]апелин-13	(pGlu)RPRLSHKGMPMF
Апелин-12	RPRLSHKGMPMF

Примечание. Жирным шрифтом показаны остатки Cys6 и Cys21, обеспечивающие стабильность димера препроапелина.

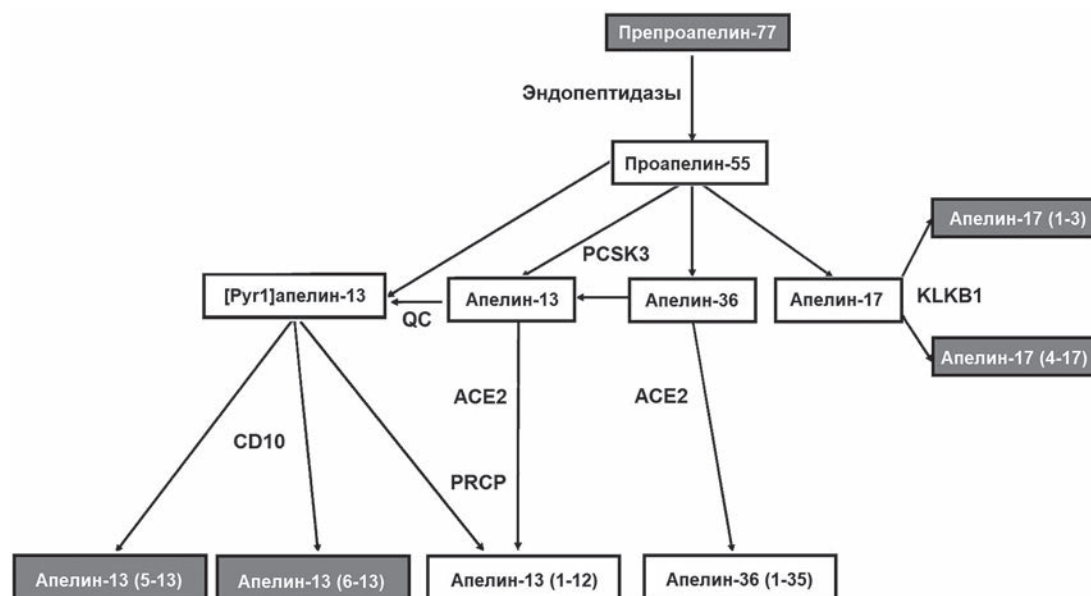


Рис. 1. Ферментативное расщепление пептидов апелина. ACE2 — ангиотензин-превращающий фермент 2; CD10 — неприлизин; KLKB1 — калликреин; PRCP — пролилкарбоксипептидаза; PCSK3 — пропротеинконвертаза субтилизин/кексин 3; QC — глутаминилциклаза. Темным цветом показаны пептиды, не способные связываться с рецептором APJ (апелин-13 (5–13) и апелин-13 (6–13)) или активировать внутриклеточную сигнализацию (апелин-17 (1–3) и апелин-17 (4–17))

апелина-12 (табл. 1). Короткие С-концевые фрагменты апелина ответственны за связывание с рецептором и биологическую активность пептида [16, 18]. Было обнаружено, что препроапелин в нативной ткани существует как димер, стабилизированный дисульфидными мостиками остатков Cys6 и Cys21, а апелин-36 и апелин-13 являются мономерами [15].

Недавние исследования показали, что процессинг апелина сложен. Выяснено, что апелин-55 не является биологически неактивным пробелком и может активировать рецептор APJ, хотя и с меньшей эффективностью, чем более короткие С-концевые фрагменты апелина [19]. В дополнение Shin et al. [20] обнаружили способность пропротеинконвертазы субтилизин/кексин 3 (PCSK3) расщеплять апелин-55 с образованием апелина-13 без образования других изоформ, что представляет новый путь деградации апелина. Кроме того, не ясными остаются процессы, связанные с образованием апелина-13 и -12 из апелина-36 [21]. Чувствительность пептидов апелина к протеолитической деградации значительно ограничивает продолжительность и эффективность их действия в биологических средах. Период полувыведения апелина у человека составляет около 5 минут [17]. Нестабильность апелинов объясняется ферментативной активностью неприлизина (CD10), ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), пролилкарбоксипептидазы (PRCP) и калликреина (KLKB1)

[22–25]. Металлопротеаза CD10 расщепляет [Pyr1]апелин-13 между остатками Arg4 и Leu5 и Leu5 и Ser6, создавая фрагменты 5–13 и 6–13 соответственно. Образующиеся при этом пептиды лишены способности активировать рецептор APJ [22]. ACE2, цинксодержащая карбоксимонопептидаза, отвечает за отщепление С-концевого Phe в апелине-13 и -36 [23]. В результате расщепления ACE2 апелина-13 и -36 образуются два фрагмента — апелин-13 (1–12) и апелин-36 (1–35). Оба фрагмента способны связываться с APJ и активировать внутриклеточную сигнализацию. PRCP способна сходным образом с ACE2 гидролизовать апелин-13 и [Pyr1]апелин-13, но с более низкой скоростью [24]. Сериновая протеаза калликреин расщепляет апелин-17 между Arg3 и Arg4 на две изоформы — апелин-17 (1–3) и апелин-17 (4–17). Эти фрагменты связываются с рецептором APJ с высоким сродством, но не могут активировать передачу сигнала и мобилизацию ионов Ca^{2+} [25]. Пути деградации пептидов апелина могут быть представлены следующей схемой (рис. 1).

Связывание с рецептором. С-концевые фрагменты апелина различаются аффинностью по отношению к APJ. Инкубация ^{125}I -меченных пептидов апелина на мембранах клеток яичника китайского хомячка CHO-A10 показала, что короткие апелины связываются с рецептором прочнее более длинных [16]. Апелин-13, [Pyr1]апелин-13 и апелин-12, являющиеся наи-

более биологически активными изоформами [9, 15], характеризуются более высокими значениями аффинности ($1/K_d$) и максимального связывания (B_{max}), чем апелин-17, -19 и -36 [10]. В то же время апелин-36 может связываться с рецептором APJ дольше, чем более короткие изоформы [16]. Это увеличение занятости рецепторов можно объяснить наличием отрицательно заряженной области рецептора APJ, которая взаимодействует с положительно заряженными аминокислотами в более длинном пептиде апелин-36 [26].

Работы по изучению структуры и активности апелина обнаружили, что последовательности аминокислотных остатков Arg-Pro-Arg-Leu и Lys-Gly-Pro-Met являются наиболее существенными для связывания апелина-13 с рецептором APJ, а замены Gln¹, His⁷, Pro¹² и Phe¹³ незначительно ухудшают сродство с рецептором [27]. В работе Medhurst et al. [27] было также показано, что два С-концевых фрагмента апелина, N-ацетил-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-COOH и N-ацетил-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-COOH, проявляют низкое сродство к рецептору APJ. Кроме того, замена в структуре апелина-13 Leu⁵ или Arg² на Ala приводит к значительному (более чем 50-кратному) снижению способности связываться с рецептором. Таким образом, последовательность Arg-Pro-Arg-Leu в структуре апелина играет ключевую роль для взаимодействия с рецептором APJ. Эта гипотеза подтверждается результатами ¹H-ЯМР-исследований апелина-17 (NH₂-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-COOH), которые показали, что последовательность Arg-Pro-Arg-Leu образует четко определенный тип β-поворота в растворе [28], играющего, как полагают, решающую роль в узнавании и связывании эндогенных пептидов с рецепторами, сопряженными с G-белком [29].

В работе Murza et al. [30] была продемонстрирована исключительная важность пространственной ориентации некоторых аминокислотных остатков апелина-13, в особенности Arg², Pro³, Arg⁴ и в меньшей степени Pro¹². Также было изучено влияние на связывание с рецептором модификации С-концевой части молекулы, состоящей в замене Phe¹³ на различные типы ароматических групп. Оно подтвердило связь С-концевого Phe с электрон-насыщенными аминокислотными остатками кармана связывания APJ-рецептора. Была предпринята попытка модификации центральной части молекулы заменой аминокислот на различные линкеры (полиэтиленгликоль (ПЭГ), аланин),

демонстрируя важность жесткости конструкции и расстояния между двумя эпитопами [30]. Таким образом, показано значение последовательности аминокислот Arg-Pro-Arg-Leu в структуре апелина и С-концевого Phe для связывания с рецептором APJ.

Распределение в организме. мРНК апелина и рецептора APJ экспрессируются практически во всех тканях и органах организма и в центральной нервной системе. Особенно высоки их концентрации в мозжечке, сосудистом эндотелии, сердце, легких, почках, печени, надпочечниках и жировой ткани [9, 16, 31]. Рецепторы APJ в сердце обнаруживаются в эндотелии, гладкомышечных клетках и кардиомиоцитах, так же как и рецептор AT1 [32]. Обширная «география» синтеза апелина в организме свидетельствует о широком спектре его регуляторного влияния на физиологические и биохимические процессы. Таким образом, апелин является не только гормоноподобным веществом, циркулирующим в крови, но и аутопаракринным, и паракринным фактором в целом ряде тканей-мишеней. Считается, что апелин оказывает значимую часть своего влияния паракринным путем, хотя и эндокринный путь является очень важным [33].

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ СИСТЕМЫ АПЕЛИН/APJ

В последние годы подтверждена существенная роль апелина в физиологии человека как регуляторного пептида в сердечно-сосудистой, гипоталамо-гипофизарной, желудочно-кишечной и иммунной системах [34]. Многочисленные работы демонстрируют, что активация рецептора APJ апелинами вовлечена в регуляцию тонуса сосудов, сердечной сократимости, водного баланса, метаболизма, клеточной пролиферации, апоптоза и воспаления [35].

Влияние на сосудистую систему. Апелин-13 и [Pyr1]апелин-13 влияют на сосудистый тонус *in vivo*, вызывая снижение артериального давления у крыс [15, 36] и вазодилатацию резистивных сосудов предплечья у человека [37]. *In vitro* апелин-13 вызывает вазодилатацию висцеральной артерии человека [38] преимущественно благодаря NO-зависимому механизму. Под действием образующегося в эндотелиальных клетках оксида азота (NO) происходит активация растворимой гуанилатциклазы в гладкомышечных клетках, которая приводит к образованию циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) и расслаблению этих кле-

ток, вызывая вазодилатацию. Однако апелин может вызвать и вазоконстрикторный эффект при контакте с дисфункциональным эндотелием. Показано, что [Pyr1]апелин-13 вызывает вазоконстрикцию подкожной вены [39] и грудной артерии [40] человека *in vitro*. В этом случае пептид действует напрямую на гладкомышечные клетки сосуда, которые также экспрессируют APJ-рецептор, увеличивая концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} и вызывая их сокращение. Работы, проведенные на нокаутных по гену апелинового рецептора мышах, показали присутствие баланса между сигнальным путем ангиотензина II, который повышает кровяное давление, и сигнальным путем апелина, который снижает давление [35].

Активация рецептора APJ участвует в формировании новых кровеносных сосудов [35]. Ангиогенная активность — это следствие действия апелина на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Показано, что апелин-13 является мощным ангиогенным фактором [41, 42] и митогеном эндотелиальных [40, 43] и гладкомышечных [44] клеток сосудов. Он активирует внутри клетки сигнальные каскады (фосфорилирование ERK, Akt (протеинкиназы B) и p70S6-киназ), которые приводят к пролиферации эндотелиальных клеток и формированию новых кровеносных сосудов. Исследования на клетках микрососудов мозга мышей показали, что апелин действует как митогенный, хемотаксический и антиапоптотический агент для эндотелиальных клеток. Было продемонстрировано, что нокаут по гену апелина у мышей связан со снижением развития ретинальных сосудов, а нокаут по гену апелинового рецептора приводит к дефектам развития сердечно-сосудистой системы [45]. Подобно многим другим ангиогенным факторам, экспрессия APJ возрастает в условиях гипоксии [42].

Инотропное действие. Рецептор APJ экспрессируется на начальных стадиях формирования сердца в эмбриональном периоде, где он регулирует миграцию прогениторных клеток, дифференцирующихся в сократительные клетки — кардиомиоциты [46]. Экспрессия APJ также обнаружена в кардиомиоцитах взрослых животных, где апелин является мощным стимулятором сердечной сократимости [47, 48]. Показано, что [Pyr1]апелин-13 и апелин-16 оказывают положительный инотропный эффект на сердце лабораторных животных и человека *in vivo* благодаря прямому действию [49, 50]. При этом полумаксимальная эффективная концентрация EC_{50} составляет

около 40 пМ в ткани сердца человека [48] и 33 пМ — в ткани сердца крысы [49]. Пожилые нокаутные по генам апелина и рецептора APJ мыши показывают прогрессивное ухудшение сердечной сократимости независимо от внутриклеточного транспорта ионов Ca^{2+} , потерю способности к укорочению саркомеров и уменьшение скорости сокращения и расслабления миофибрилл [51].

Регуляция жидкостного гомеостаза. Экспрессия апелина и его рецептора, подобно антидиуретическому гормону (вазопрессину), происходит также в магноцеллюлярных нейронах супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса, т.е. в областях мозга, включенных в регуляцию потребления пищи и воды [15]. Введение апелина-13 увеличивает потребление воды, а также уменьшает в гипоталамусе секрецию вазопрессина. Показано, что интрацеребровентрикулярная инъекция апелина-13 мышам ингибирует активность вазопрессиновых нейронов и высвобождение вазопрессина, уменьшая его концентрацию в плазме и усиливая диурез [52]. Обезвоживание усиливает экспрессию апелина и уменьшает экспрессию вазопрессина у крыс [53]. Этот диуретический эффект апелина вместе с его гипотензивным эффектом принимает глобальное участие в гомеостатической регуляции жидкостей тела.

Пищеварение. Рецептор APJ экспрессируется в желудочных энтерохромаффиноподобных клетках, некоторых клетках поджелудочной железы, эпителиальных клетках кишечника [54]. В желудке активация рецепторов APJ на энтерохромаффиноподобных клетках апелином, секретлируемым париетальными клетками, может ингибировать высвобождение энтерохромаффиноподобными клетками гистамина, который, в свою очередь, уменьшает секрецию кислоты париетальными клетками. В поджелудочной железе апелин ингибирует секрецию инсулина, индуцированную глюкозой. Предполагается существование функциональной взаимозависимости между сигнальными путями апелина и инсулина на уровне адипоцитов, где инсулин стимулирует продукцию апелина [35].

Влияние на жировую ткань. Адипоциты, секретлирующие апелин, являются возможными источниками плазматического апелина [35]. На экспрессию апелина в жировой ткани влияют многие факторы, в том числе голодание, гипоксия [36, 55] и инсулин [56]. В то время как инсулин стимулирует экспрессию апелина жировой тканью [35, 56], апелин ингибирует секрецию инсулина [57], демонстрируя взаи-

мозависимость этих двух систем. Активация системы апелин/APJ также принимает участие в усвоении глюкозы благодаря активации AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) и Akt [58]. Апелин может быть также вовлечен в васкуляризацию жировой ткани [55].

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ АПЕЛИНА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Ожирение и диабет. Данные, имеющиеся в современной литературе, указывают, что плазматический апелин положительно коррелирует с индексом массы тела человека, а увеличенная экспрессия апелина в плазме и жировой ткани у пациентов с ожирением может быть снижена благодаря низкокалорийной диете, приводящей к потере веса [59]. Однако на моделях ожирения у мышей было показано, что не ожирение, а уровень инсулина является основным фактором, определяющим повышение экспрессии апелина [35]. Это означает, что экспрессия апелина увеличивается не просто при ожирении, а в ответ на гиперинсулинемию, связанную с ожирением, хотя исследование влияния плазматического апелина на сахарный диабет 2-го типа дает разрозненные результаты [60, 61]. Регуляция экспрессии апелина при ожирении может быть полезной при метаболическом синдроме, потому что периферийное введение апелина снижает толерантность к глюкозе и улучшает ее утилизацию при ожирении у инсулин-резистентных мышей [58]; и наоборот, нокаутные по гену апелина мыши обладают сниженной чувствительностью к инсулину [62]. Апелин также уменьшает количество жировой ткани у мышей с ожирением, не изменяя потребление пищи, путем увеличения экспрессии разобщающего белка UCP1 и расхода энергии [63]. Очевидно, что регуляция метаболизма апелином при ожирении может также оказать благоприятное действие на сердечно-сосудистую систему, снижая артериальное давление и повышая сократимость сердца.

Сердечно-сосудистые заболевания. В исследованиях Chen et al. [64], Chong et al. [65] и Miettinen et al. [66] были отмечены изменения уровня апелина в плазме крови человека в условиях сердечной дисфункции с довольно противоречивыми результатами и очень широким диапазоном концентраций (20–4000 пг/мл) в зависимости от уровня патологии и метода определения пептида. В основном предполагается, что уровень плаз-

матического апелина возрастает на ранних стадиях сердечной недостаточности [64], но возвращается к исходному уровню или снижается на более поздних стадиях [65, 66]. Было установлено, что экспрессия мРНК APJ снижается в левом желудочке (ЛЖ) у пациентов с идиопатической дилатационной кардиомиопатией [67]. Эти данные позволяют предположить, что увеличение уровня экспрессии апелина на ранних стадиях заболевания может быть компенсаторным действием, повышающим силу сокращения сердца. Уровень экспрессии апелина и его рецептора затем может подавляться на более поздних стадиях сердечной недостаточности, когда положительное инотропное действие апелина начнет ухудшать состояние сердца в связи с увеличением потребности в кислороде. Уровень [Pyr1]апелина-13 в сердце возрастает в ответ на гипоксию через гипоксия-индуцибельный фактор-1 [68]. Кроме того, уровень экспрессии апелина и его рецептора повышается при ишемической сердечной недостаточности у крыс [66, 69].

В ряде исследований были предприняты попытки изучить роль системы апелин/APJ в патогенезе атеросклероза. Так, в 2007 г. с помощью трансгенных моделей у мышей Hashimoto et al. [70] показали, что апелин-13 стимулирует экспрессию субъединицы NADPH-оксидазы и индуцирует связанную с окислительным стрессом пролиферацию в гладкомышечных клетках сосудов, а рецептор APJ может участвовать в развитии атеросклероза, связанного с гиперхолестеринемией. У человека уровень экспрессии апелина увеличивается в атеросклеротической коронарной артерии [71]. Кроме того, уровни экспрессии апелина и APJ увеличиваются при стенозе аортального клапана — процессе, который отражает некоторые признаки атеросклероза [72], демонстрируя вовлеченность апелиновой системы в атеросклероз у человека. Апелин также предотвращает образование аневризмы аорты у мышей [73].

Предполагается участие системы апелин/APJ при патофизиологическом ангиогенезе, который способствует портосистемной коллатерализации и висцеральной неоваскуляризации у портальных гипертензивных крыс [74], неоангиогенезу при циррозе печени [75] и неоангиогенезу опухоли [76, 77]. Тем не менее ангиогенное действие апелина [78, 79] может вносить серьезный вклад в восстановление сердца после ишемии. Таким образом, апелин очень важен для сохранения функции поврежденного сердца.

Защитное действие апелина при ишемическом и реперфузионном повреждении сердца. Имеющиеся в современной литературе данные показывают, что под действием апелина происходит уменьшение ишемического и реперфузионного (И/Р) повреждения миокарда *in vitro* и *in vivo*. В работе Zeng et al. [80] на модели изолированного сердца крысы было показано, что глобальная ишемия приводит к значительному увеличению экспрессии APJ-рецептора на уровне мРНК и продукции белка, а также к ухудшению функции сердца, которая существенно улучшается после перфузии раствором, содержащим апелин-13. Кроме того, эти же авторы на модели аноксии/реоксигенации неонатальных кардиомиоцитов крысы продемонстрировали, что апелин-13 уменьшает апоптоз и генерацию активных форм кислорода (АФК), увеличивает активность супероксиддисмутазы (SOD) и снижает образование малонового диальдегида (MDA) [80]. На модели изолированного сердца крысы Rastaldo et al. [81] показали отсутствие достоверного влияния апелина-13 на снижение размера инфаркта миокарда (ИМ) и повреждение клеточных мембран при введении пептида до ишемии. Однако перфузия апелином-13 по окончании периода глобальной ишемии приводила к уменьшению ИМ вдвое, по сравнению с контролем, и ограничению реперфузионной контрактуры, а также к снижению активности лактатдегидрогеназы (LDH) в миокардиальном эффуенте. Существенно, что эти эффекты отменялись в присутствии ингибитора NO-синтазы N^G-нитро-L-аргинина (L-NNA), демонстрируя NO-зависимый механизм кардиозащитного действия апелина. Кроме того, было показано, что ишемический период увеличивает экспрессию APJ-рецептора на уровне белка [81]. Simpkin et al. [82] провели сравнительное исследование эффективности действия двух C-концевых фрагментов: апелина-13 и апелина-36. На модели изолированного сердца крысы и острого ИМ у мышей *in vivo* под действием апелина-13 уменьшение размеров ИМ происходило в большей степени, чем под действием апелина-36. В хронических экспериментах *in vivo* пятидневное введение крысам [Pyr1]апелина-13 после окклюзии коронарной артерии уменьшало размеры ИМ к окончанию двухнедельного периода реперфузии [83]. В ряде работ показано, что кардиозащитное действие пептидов апелина при И/Р-повреждении связано с активацией PI3K → Akt → NO и MEK1/2 → ERK1/2 сигнальных путей в кардиомиоцитах [81, 84–86].

МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ АПЕЛИНА

Запуск каскада реперфузионных киназ (RISK-сигнализация). Кардиопротекторное действие апелина включает стимуляцию механизмов запрограммированного клеточного выживания, которые запускаются реперфузионными киназами (RISK) [87, 88]. Связывание пептидов апелина с рецептором APJ активирует сигналинг через Gi/o-белок с дальнейшим фосфорилированием PI3K и Akt-киназы [34, 89] (рис. 2). В пользу активации Gi/o-белков свидетельствует то, что апелин снижает стимулированную форсколином и гормонами активность аденилатциклазы в клетках, где экспрессируется рецептор APJ [90]. Существенно, что данный путь включает образование NO в результате активации eNOS протеинкиназой B (Akt). Последующая активация гуанилатциклазы под действием NO приводит к образованию cGMP, который, в свою очередь, активирует протеинкиназу G (PKG) и ε-изоформу протеинкиназы C (PKC). Следствием этого является открытие митохондриальных АТР-зависимых K⁺-каналов (mitoK⁺АТР-каналов), инициирующих закрытие митохондриальной поры (mPTP) [88, 91]. Участие mitoK⁺АТР-каналов в механизмах защитного действия апелинов было подтверждено тем, что 5-гидроксидеканоат (5-HD) — ингибитор mitoK⁺АТР-каналов — отменял/снижал влияние C-концевых фрагментов апелина-12 на размеры ИМ [92]. Еще одной мишенью Akt является киназа гликогенсинтазы-3β (GSK-3β). В результате ингибирования GSK-3β происходит блокирование открытия митохондриальной поры и, как следствие, — защита клетки от гибели [88, 93].

Другие сигнальные пути связаны с активацией Ras-белков [89, 94], приводящей к запуску митоген-активируемого протеинкиназного (MAP-киназного) каскада. Так, сопряжение APJ с Gi/o может стимулировать передачу сигнала через PKC — активатор малого G-белка Ras. Ras затем активирует MAP-киназный каскад Raf-1 → MEK1/2 → ERK1/2. Данные MAP-киназы подавляют проапоптотические белки BAX и BAD либо напрямую, либо посредством дистальных сигнальных компонентов, таких как рибосомальные p70S6- и p90RS-киназы, что, в свою очередь, приводит к ингибированию высвобождения цитохрома c (Cyt c), препятствуя открытию mPTP (рис. 2). Сопряжение APJ с Gq/11 может стимулировать передачу сигнала через фосфо-

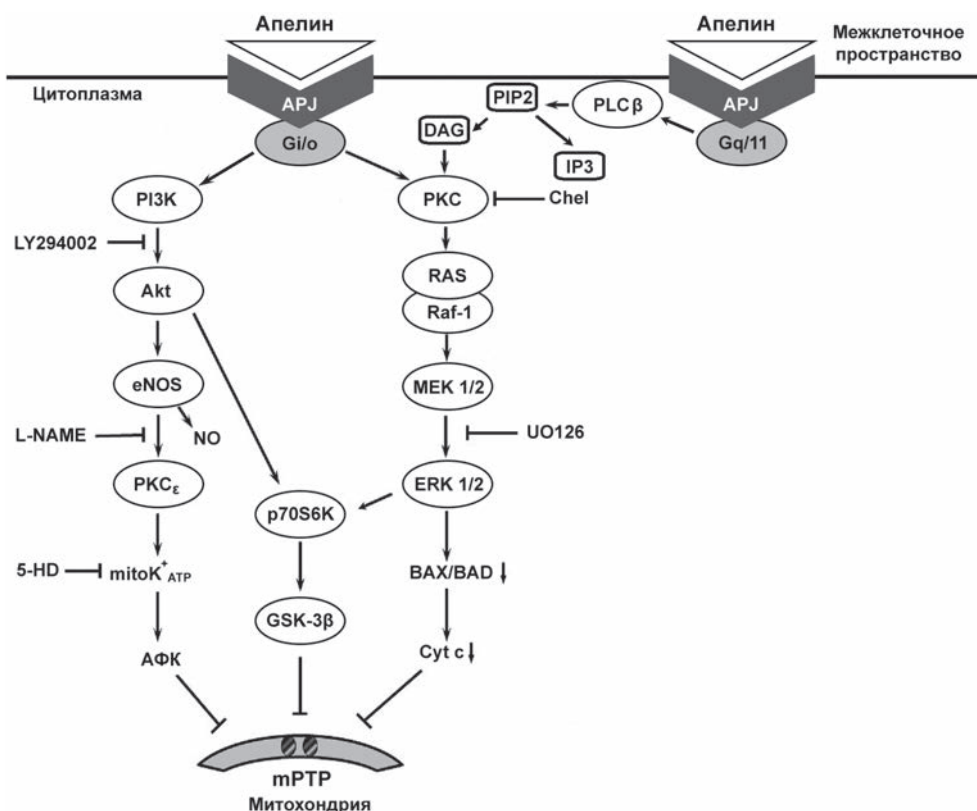


Рис. 2. Активация RISK-сигналикации системой апелин/рецептор APJ в ишемизированном кардиомиоците предупреждает открытие митохондриальной поры (mPTP). Ras – семейство малых G-белков; MEK1/2 – киназа митоген-активируемой протеинкиназы (MAP2K); ERK1/2 – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; BAX/BAD – проапоптотические белки; Cyt c – цитохром c; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; Akt – протеинкиназа B; eNOS – эндотелиальная NO-синтаза; PKCε – ε-изоформа протеинкиназы C; mitoK⁺ATP-каналы – митохондриальные ATP-зависимые K⁺-каналы; GSK-3β – киназа гликогенсинтазы 3β; p70S6K – рибосомная протеиновая киназа S6 β1; Chel – хелеритрин; PLCβ – фосфолипаза Cβ; PIP2 – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; IP3 – инозитол-1,4,5-трисфосфат; DAG – диацилглицерол; АФК – активные формы кислорода; LY294002 – селективный ингибитор PI3K; Raf-1 – серин/треониновая протеинкиназа

липазу Cβ (PLCβ), включающую гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2) до инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG). DAG далее активирует протеинкиназу C (PKC). В результате активации RAS под действием PKC происходит запуск MAP-киназного каскада Raf-1 → MEK1/2 → ERK1/2. Наконец, Gq/11 может сигнализировать независимо от PLCβ и PKC через Ras и этот каскад MAPK [93]. (Этот путь не представлен на рис. 2.)

Активация MAP-киназных каскадов связана с реперфузионным повреждением и нарушениями сердечного ритма. Было показано, что изменения в сигнальных путях MAP-киназ у больных после кардиохирургических вмешательств, кардиоплегии и искусственного кровообращения, участвуют в коронарной микроциркуляторной дисфункции с негативными последствиями для перфузии миокарда [95]. Блокирование RISK-сигналикации (рис. 2) селективными ингибиторами PI3K (LY294002 или вортманнином) [80, 82], инги-

биторами ERK1/2 (UO126 или PD098059) [44] или ингибитором p70S6-киназы рапамицином [90] отменяет действие апелина-13 на митохондриальную пору и приводит к гибели кардиомиоцитов, усиливая некроз и апоптоз.

Механизмы антиоксидантной защиты. Помимо ингибирования открытия mPTP, уменьшение реперфузионного повреждения миокарда под действием апелина может быть связано с антиоксидантными свойствами NO. В культуре кардиомиоцитов при моделировании гипоксии и реоксигенации экзогенный апелин-13 уменьшал образование вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов MDA и супероксидного анион-радикала (O₂^{•-}), а также увеличивал экспрессию антиоксидантного фермента SOD, утилизирующей O₂^{•-} [80]. Было показано, что при введении апелина-13 отмечаются меньшие нарушения структуры мембран кардиомиоцитов и снижение продукции MDA в поврежденном изопротеренолом миокарде крыс *in vivo* [96]. Подавление окислительного стресса, инду-

цированного пероксидом водорода (H_2O_2) в изолированных неонатальных кардиомиоцитах крысы, с помощью [Pyr1]апелина-13 сопровождалось повышением уровня мРНК и активности каталазы (CAT) [97]. Также у мышей *in vivo* под действием диеты, обогащенной [Pyr1]апелином-13, снижение гипертрофии ЛЖ сопровождалось уменьшением концентрации липогидропероксидов в плазме и увеличением активности CAT в миокарде [97]. Таким образом, действие апелина может быть связано со снижением генерирования АФК, вызванным возрастанием экспрессии генов, кодирующих SOD и CAT и увеличением продукции NO.

В присутствии NO $O_2^{\cdot-}$ образует пероксинитрит ($ONOO^{\cdot}$), который расщепляется на высокоактивный цитотоксичный гидроксильный радикал ($^{\cdot}OH$) и радикал диоксида азота ($NO_2^{\cdot}$) (рис. 3) [98]. Наличие АФК и азота ($O_2^{\cdot-}$, $ONOO^{\cdot}$, $^{\cdot}OH$, $NO_2^{\cdot}$) приводит к дисфункции и гибели клеток. Можно предположить, что удаление избытка супероксида за счет повышения активности SOD под влиянием апелина должно уменьшать окислительный стресс. В то же время увеличение активности SOD способствует образованию H_2O_2 , менее токсичного соединения, но также способного инициировать повреждения миокарда. Как известно, H_2O_2 разлагается на воду и кислород под действием CAT [97], активность которой может возрастать под действием апелина. Также пероксид водорода может быть трансформирован в воду под действием глутатионпероксидазы (GSHPx) в результате окисления восстановленного глутатиона до дисульфида глутатиона. Поскольку апелин активирует эндотелиальную NO-синтазу, то образующийся вследствие этого NO способен конкурировать с SOD за супероксид-анион $O_2^{\cdot-}$. Вероятно, увеличения активности SOD под действием апелина достаточно для того, чтобы предупредить образование цитотоксичного $ONOO^{\cdot}$ и тем самым снижать нежелательные последствия окислительного стресса.

Этот гипотетический механизм частично объясняет, каким образом С-концевые фрагменты апелина могут участвовать в регуляции свободнорадикального окисления и улучшать антиоксидантный потенциал ишемизированного сердца при реперфузии.

СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ АПЕЛИНА

Циклические аналоги апелина-12 и -13. Необходимость повышения устойчивости пеп-

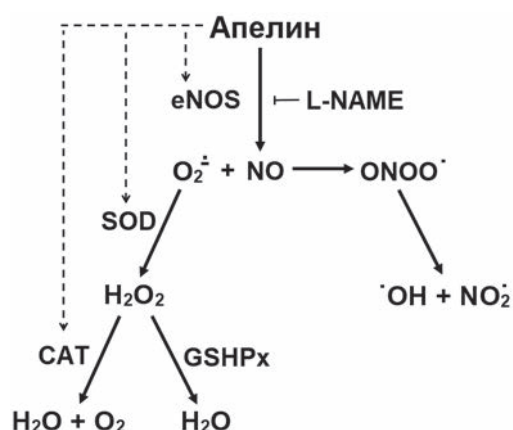


Рис. 3. Антиоксидантное действие апелина. eNOS — эндотелиальная NO-синтаза; SOD — супероксиддисмутаза; CAT — каталаза; GSHPx — глутатионпероксидаза; L-NAME — ингибитор eNOS метиловый эфир N-нитро-L-аргинина

тидов апелина по отношению к действию аминокислот и карбоксипептидаз в биологических системах [18] обусловила новое направление работ, связанных с синтезом фармакологических агонистов APJ-рецептора. Было показано, что циклические аналоги апелина (рис. 4) связываются с апелиновым рецептором и обладают функциональной активностью, обусловленной запуском внутриклеточной сигнализации [99, 100]. В работе Macaluso et al. [99] по оценке возможностей конкурентного связывания с APJ циклических фрагментов апелина-13 различной длины (рис. 4) было выяснено, что соединения, содержащие последовательность Arg-Pro-Arg-Leu, демонстрируют четко определенный β -поворот, необходимый для связывания с рецептором. Циклические аналоги апелина-12 показали дозозависимый ингибиторный эффект по отношению к форсколин-индуцированному накоплению cAMP. Кроме того, они, аналогично природному пептиду, могут влиять на пути внутриклеточной сигнализации [100].

Модификации апелина-13 и апелина-36. В работе Wang et al. [101] было изучено влияние двух структурных аналогов [Pyr1]апелина-13, включающих бромирование С-концевого фенилаланина, на И/Р-повреждение сердца у мышей *in vivo*. При этом наиболее оптимальная модификация пептида не приводила к ухудшению кардиопротекторных свойств по сравнению с природным [Pyr1]апелином-13. Введение этой структуры уменьшало размер ИМ у мышей, по сравнению с контролем, более чем в 2 раза. Одновременно наблюдалась меньшая деградация модифицированной структуры под действием ACE2. Влияние модификации

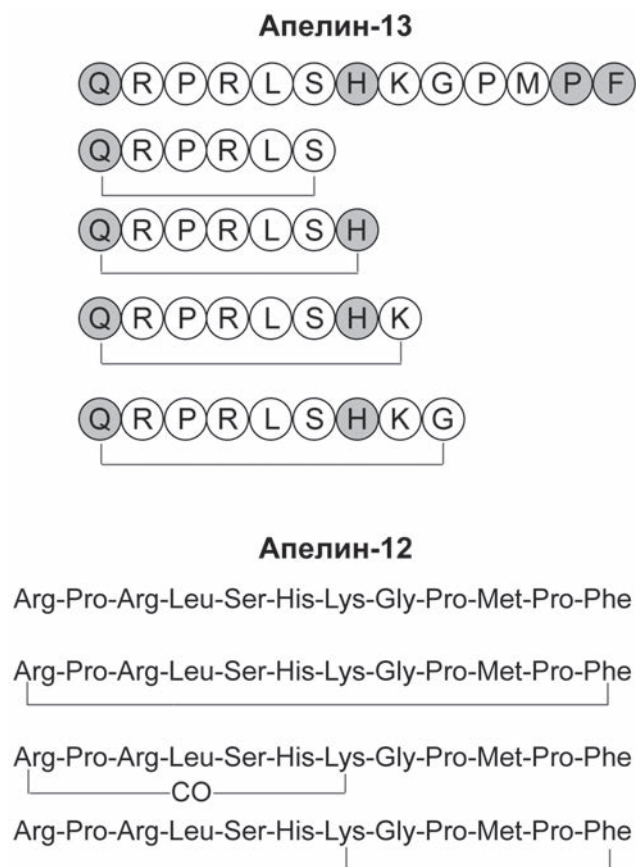


Рис. 4. Циклические аналоги апелина-13 и апелина-12. Апелин-13 — линии обозначают амидные связи между *N*- и *C*-концами (циклизация «от головы к хвосту»). Затемненные кружки обозначают аминокислотные остатки с наибольшим влиянием на связывание с рецептором APJ. Апелин-12 — линии обозначают связи между аминокислотными остатками; CO — карбонильная группа

апелина-36 по *N*-концу полиэтиленгликолем (ПЭГ, 40 кДа) было изучено на крысах в работе Jia et al. [102]. Инфузия конъюгата ПЭГ—апелин-36 в течение 20 минут поддерживала более высокий уровень апелина-36 в плазме крови в течение 2 часов и обеспечивала увеличение фракции выброса сердца по сравнению с инфузией немодифицированного апелина-36 после моделирования ИМ у крыс.

Также впервые был синтезирован не-пептидный агонист апелинового рецептора E339-3D6, который проявил себя как частичный агонист в отношении образования cAMP и как полный агонист в отношении интернализации рецептора APJ [103]. Это соединение более эффективно препятствовало вазоконстрикции колец аорты крысы, вызванной норадреналином, по сравнению с природным апелином-17.

Результаты исследований по влиянию модификации *C*-концевой части молекулы апелина на связывание с APJ-рецептором [18, 104,

105] показали, что замена или удаление *C*-концевого Phe снижает гипотензивные свойства апелина-13 и ингибирует интернализацию апелинового рецептора. Кроме того, Iturrioz et al. [105] продемонстрировали наличие гидрофобной полости в нижней части кармана связывания рецептора APJ, в которую вкладывается *C*-концевой Phe пептидов апелина-13 или апелина-17 благодаря Trp¹⁵², Trp²⁵⁹ и Phe²⁵⁵, которые, как было установлено с помощью молекулярного моделирования, являются ключевыми аминокислотными остатками для интернализации рецептора. Однако имеются данные, свидетельствующие о том, что удаление или замена *C*-концевого Phe влияет только на интернализацию рецептора APJ, но не оказывает влияния на связывание апелина с рецептором или сопряжение с G-белком. Так, Pitkin et al. [106] показали, что структура, аналогичная [Pyr1]апелин-13, без *C*-концевого Phe обнаруживала сродство к апелиновому рецептору и проявляла активность агониста в опытах *in vitro* на подкожной вене человека. Macaluso et al. [107] удалось создать антагонист рецептора APJ со свойствами конкурентного ингибитора, состоящий из двух циклизованных последовательностей Arg-Pro-Leu-Arg, соединенных между собой линкерным участком Lys-His. Работы Murza et al. [30] по изучению возможности связывания соединений пептидной природы с APJ-рецептором привели к созданию ряда синтетических агонистов с более высоким сродством и протеолитической устойчивостью в плазме по сравнению с природным [Pyr1]апелином-13.

Структурные аналоги апелина-12. С целью повышения протеолитической устойчивости природного апелина-12 и стабильности при хранении были синтезированы его структурные аналоги (табл. 2) [108, 109].

Одна из модификаций апелина-12 заключалась в метилировании *N*-концевого Arg (пептиды AII и AIII). Показано, что введение в пептидную цепь *N*^α-метиламинокислот существенно повышает устойчивость этих соединений к ферментативной биodeградации, в том числе к действию аминопептидаз [110, 111]. Кроме того, *C*-концевая часть молекул пептидов AIII и AIV была защищена от действия карбоксипептидаз амидной группой. Модификация AIV заключалась также во введении нитрогруппы в гуанидиновую группу остатка Arg для увеличения продукции NO. Стабильность этих структурных аналогов апелина-12 при хранении была повышена за счет замены легко окисляющегося Met на Nle — природную аминокислоту небелкового

Таблица 2. Апелин-12 и его структурные аналоги

Структура	М, г/моль	Обозначения пептидов
H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH	1422,7	Апелин-12
H-(N ^ε Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH	1418,7	АII
H-(N ^ε Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-NH ₂	1417,7	АIII
H-(N ^ε NO ₂)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-NH ₂	1448,7	АIV
H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-dAla-OH	1346,6	AV

Примечание. Модификации в структуре природного апелина-12 выделены жирным шрифтом.

происхождения, устойчивую к окислению кислородом. Для оценки роли C-концевого Phe в кардиопротекторном действии апелина-12 при ишемии и реперфузии сердца эта аминокислота была заменена на d-Ala в модификации AV. Полученные аналоги апелина-12 были исследованы на моделях различного физиологического уровня при ишемии и реперфузии сердца.

Было показано, что синтезированные на основе апелина-12 агонисты рецептора APJ способны подавлять процессы свободнорадикального окисления в культуре кардиомиоцитов в изолированном перфузируемом сердце и в целом организме [112]. Их действие включает перехват супероксид-аниона, снижение продукции пероксида водорода в митохондриях кардиомиоцитов, а также уменьшение образования АФК в ишемизированном миокарде при реперфузионном стрессе. Снижение генерации короткоживущих АФК под действием этих пептидов сочетается с уменьшением образования продуктов свободнорадикального окисления липидов в моделях *ex vivo* и *in vivo* и уменьшением Cu²⁺-индуцированного окисления липопротеидов низкой плотности в плазме крови человека *in vitro* [113, 114]. Антиоксидантные эффекты аналогов апелина-12 в реперфузированном миокарде проявляются увеличением активности Cu,Zn-SOD, CAT и GSHPx [113], которое, вероятно, связано с экспрессией генов этих ферментов под влиянием пептидов [97]. Существенно, что защита миокарда от реперфузионного повреждения на различных экспериментальных моделях фармакологическими агонистами APJ, состоящими из 12 а.о., включает уменьшение повреждения мембран кардиомиоцитов и улучшение энергетического состояния кардиомиоцитов [109, 114–116].

В нашей лаборатории было показано, что одним из наиболее эффективных структурных аналогов апелина-12 является пептид H-(N^εMe)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-

Pro-Nle-Pro-Phe-OH (AII). Роль сигнальных механизмов, участвующих в посткондиционировании сердца с AII, была изучена на анестезированных крысах *in vivo*, подвергнутых окклюзии коронарной артерии и восстановлению коронарного кровотока [85]. Ингибиторы MEK1/2 и PI3K (UO126 и LY294002 соответственно) снижали защитную эффективность AII. Об этом свидетельствовала отмена ограничения размеров ИМ, ослабление метаболического восстановления зоны риска ЛЖ сердца и нарушения целостности сарколеммы при совместном введении AII с этими ингибиторами. Это показывает, что MEK1/2 и PI3K являются принципиально важными внутриклеточными молекулами, участвующими в эффектах AII, так же, как и в случае природного апелина-13 и апелина-36 [80, 82]. Дополнительно было выяснено, что ингибирование NO-синтазы (NOS) с помощью метилового эфира N-нитро-L-аргинина (L-NAME) снижает полезные эффекты AII при посткондиционировании сердца крыс *in vivo* [85]. Как известно, образование NO приводит к открытию mitoK⁺АТР-каналов, препятствуя открытию mPTP [117, 118]. Введение блокатора mitoK⁺АТР-каналов (5-HD) совместно с AII отменяло влияние пептида на снижение размера ИМ, уменьшение активности маркеров некроза и ухудшало метаболическое восстановление зоны риска к окончанию реперфузии [92], указывая на участие агониста AII в этом механизме защиты. Недавно была завершена разработка новой технологии синтеза структурного аналога AII с использованием Fmoc-методологии в сочетании с временной защитой гуанидиновых остатков Arg протонированием (солеобразованием) на стадии образования амидной связи [119]. Она позволила исключить образование побочных продуктов и повысить целевой выход пептида. Существенно, что изучение биоактивности полученного по новой схеме агониста AII на кроликах с хронической сердечной недоста-

точностью (ХСН), вызванной длительным введением доксорубина, подтвердило его способность уменьшать дисфункцию ЛЖ при инфузии. Очевидно, что эта технология может быть использована для синтеза фармакологических лигандов рецептора APJ с метилированным *N*-концевым аргинином, которые могут иметь терапевтический потенциал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований, выполненных в различных лабораториях в течение последнего десятилетия, показали, что система апелин/рецептор APJ является важным регулятором сердечно-сосудистой системы в нормальных и патологических условиях. Создание фармакологических лигандов рецептора APJ, которые обладают повышенной устойчивостью к воздействию протеолитических ферментов и стабильностью при хранении, указывает на возможность разработки новых лекарственных средств для применения при реперфузионном повреждении сердца, сердечной недостаточности и окислительном стрессе. Наши работы показывают, что одним из перспективных подходов к созданию таких лигандов является модификация *C*- и *N*-концевых остатков аминокислот в молекуле апелина-12, обладающего высокой биологической активностью, и замена остатка легко окисляющегося Met на Nle [108]. Это позволило синтезировать устойчивый к действию протеаз аналог природного апелина-12 H-(N^εMe)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-

Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH (АП), оказывающий мощное влияние на сердце в условиях дефицита кислорода и энергетических субстратов. Он обеспечивает меньшее повреждение функции сердца при окислительном стрессе, снижает необратимые повреждения кардиомиоцитов и улучшает метаболическое состояние миокарда после ишемии и реперфузии, а также обладает выраженными антиоксидантными свойствами. Структурный аналог АП не уступает по эффективности кардиозащиты природным пептидам апелину-12, апелину-13 и [Pyr1]апелину-13. Мы полагаем, что это соединение, доклиническое исследование которого завершается в настоящее время, может найти применение при терапии целого ряда заболеваний, связанных с сердечной патологией.

Вклад авторов. О.И. Писаренко – концепция и руководство работой, И.М. Студнева – анализ данных литературы. Оба автора подготовили рукопись к печати.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-015-0008-а и 18-015-0009-а).

Благодарности. Авторы признательны М.В. Сидоровой и Ю.А. Пелогейкиной за ценные советы при обсуждении этого обзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coelho, M., Oliveira, T., and Fernandes, R. (2013) Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ, *Arch. Med. Sci.*, **9**, 191-200, doi: 10.5114/aoms.2013.33181.
2. Castan-Laurell, I., Masri, B., and Valet, P. (2019) The apelin/APJ system as a therapeutic target in metabolic diseases, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **23**, 215-225, doi: 10.1080/14728222.2019.1561871.
3. Kinjo, T., Higash, H., Un, K., and Kuramoto, N. (2021) Apelin/apelin receptor system molecular characteristics, physiological roles, and prospects as a target for disease prevention and pharmacotherapy, *Curr. Mol. Pharmacol.*, **14**, 210-221, doi: 10.2174/1874467213666200602133032.
4. O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., Shi, X., Petronis, A., George, S. R., and Nguyen, T. (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11, *Gene*, **136**, 355-360, doi: 10.1016/0378-1119(93)90495-o.
5. Cai, X., Bai, B., Zhang, R., Wang, Ch., and Chen, J. (2017) Apelin receptor homodimer-oligomers revealed by single-molecule imaging and novel G protein-dependent signaling, *Sci. Rep.*, **7**, 40335, doi: 10.1038/srep40335.
6. Charo, D. N., Ho, M., Fajardo, G., Kawana, M., Kundu, R. K., Sheikh, A. Y., Finsterbach, Th. P., Leeper, N. J., Ernst, K. V., Chen, M. M., Ho, Y. D., Chun, H. J., Bernstein, D., Ashley, E. A., and Quertermous, Th. (2009) Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **297**, 1904-1913, doi: 10.1152/ajpheart.00686.2009.
7. Li, Y., Chen, J., Bai, B., Du, H., Liu, Y., and Liu, H. (2012) Heterodimerization of human apelin and kappa

- opioid receptors: roles in signal transduction, *Cell Signal.*, **24**, 991-1001, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.012.
8. Abbasloo, E., Najafipour, H., and Esmacili-Mahani, S. (2016) Induction of antinociceptive tolerance to the chronic intrathecal administration of apelin-13 in rat, *Neuropeptides*, **60**, 7-12, doi: 10.1016/j.npep.2016.08.001.
 9. Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M. X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., and Fujino, M. (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 471-476, doi: 10.1006/bbrc.1998.9489.
 10. Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001) Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding, *Biochim. Biophys. Acta*, **1538**, 162-171, doi: 10.1016/S0167-4889(00)00143-9.
 11. Roberts, E. M., Newson, M. J. F., Pope, G. R., Landgraf, R., Lolait, S. J., and O'Carroll, A. M. (2009) Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice, *J. Endocrinol.*, **202**, 453-462, doi: 10.1677/JOE-09-0134.
 12. Mughal, A., and O'Rourke, S. T. (2018) Vascular effects of apelin: mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.*, **190**, 139-147, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.013.
 13. Bertrand, C., Valet, P., and Castan-Laurell, I. (2015) Apelin and energy metabolism, *Front. Physiol.*, **6**, 115, doi: 10.3389/fphys.2015.00115.
 14. Chung, S. C., Ho, L., Tian, J., and Reversade, B. (2013) ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the Apelin receptor, *Dev. Cell.*, **27**, 672-680, doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.002.
 15. Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., Osmond, D. H., George, S. R., and O'Dowd, B. F. (2000) Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor, *J. Neurochem.*, **74**, 34-41, doi: 10.1074/jbc.M908417199.
 16. Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2000) Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin, *J. Biol. Chem.*, **275**, 21061-21067, doi: 10.1074/jbc.M908417199.
 17. Kleinz, M. J., and Davenport, A. P. (2005) Emerging roles of apelin in biology and medicine, *Pharmacol. Ther.*, **107**, 198-211, doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.04.001.
 18. Japp, A. G., and Newby, D. E. (2016) Unlocking the therapeutic potential of apelin, *Hypertension*, **68**, 307-309, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07057.
 19. Shin, K., Chapman, N. A., Sarker, M., Kenward, C., Huang, S. K., Weatherbee-Martin, N., Pandey, A., Dupré, D. J., and Rainey, J. K. (2017) Bioactivity of the putative apelin proprotein expands the repertoire of apelin receptor ligands, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub.*, **1861**, 1901-1912, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.05.017.
 20. Shin, K., Pandey, A., Liu, X. Q., Anini, Y., and Rainey, J. K. (2013) Preferential apelin-13 production by the proprotein convertase PCSK3 is implicated in obesity, *FEBS Open Bio.*, **3**, 328-333, doi: 10.1016/j.fob.2013.08.001.
 21. Adam, F., Khatib, A. M., Lopez, J. J., Vazier, C., Turpin, S., Muscat, A., Soulet, F., Aries, A., Jardin, I., Bobe, R., Stepanian, A., de Prost, D., Dray, C., Rosado, J. A., Valet, P., Feve, B., and Siegfried, G. (2016) Apelin: an antithrombotic factor that inhibits platelet function, *Blood*, **127**, 908-920, doi: 10.1182/blood-2014-05-578781.
 22. McKinnie, S. M., Fischer, C., Tran, K. M., Wang, W., Mosquera, F., Oudit, G. Y., and Vederas, J. C. (2016) The metalloprotease neprilysin degrades and inactivates apelin peptides, *Chem. Bio. Chem.*, **17**, 1495-1498, doi: 10.1002/cbic.201600244.
 23. Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., and Tummino, P. (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 14838-14843, doi: 10.1074/jbc.M200581200.
 24. Kehoe, K., Elzen, R., Verkerk, R., Sima, Y., van der Veken, P., Lambeir, A. M., and De Meester, I. (2016) Prolyl carboxypeptidase purified from human placenta: its characterization and identification as an apelin-cleaving enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1481-1488, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.07.004.
 25. Fischer, C., Lamer, T., Wang, W., McKinnie, S. M. K., Iturrioz, X., Llorens-Cortes, C., Oudit, G. Y., and Vederas, J. C. (2019) Plasma kallikrein cleaves and inactivates apelin-17: palmitoyl- and PEG-extended apelin-17 analogs as metabolically stable blood pressure-lowering agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **166**, 119-124, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.040.
 26. Ma, Y., Yue, Y., Ma, Y., Zhang, Q., Zhou, Q., Song, Y., Shen, Y., Li, X., Ma, X., Li, C., Hanson, M. A., Han, G. W., Sickmier, E. A., Swaminath, G., Zhao, S., Stevens, R. C., Hu, L. A., Zhong, W., Zhang, M., and Xu, F. (2017) Structural basis for apelin control of the human apelin receptor, *Structure*, **25**, 858-866.e4, doi: 10.1016/j.str.2017.04.008.
 27. Medhurst, A. D., Jennings, C. A., Robbins, M. J., Davis, R. P., Ellis, C., Winborn, K. Y., Lawrie, K. W., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J. E., Herrity, N. C., Murdock, P., and Darker, J. G. (2003) Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin, *J. Neurochem.*, **84**, 1162-1172, doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01587.x.

28. Langelan, D. N., Bebbington, E. M., Reddy, T., and Rainey, J. K. (2009) Structural insight into G-protein coupled receptor binding by apelin, *Biochemistry*, **48**, 537-548, doi: 10.1021/bi801864b.
29. Tyndall, J. D., Pfeiffer, B., Abbenante, G., and Fairlie, D. P. (2005) Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure, *Chem. Rev.*, **105**, 793-826, doi: 10.1021/cr040689g.
30. Murza, A., Parent, A., Besserer-Offroy, E., Tremblay, H., Karadereye, F., Beaudet, N., Leduc, R., Sarret, P., and Marsault, É. (2012) Elucidation of the structure-activity relationships of apelin: influence of unnatural amino acids on binding, signaling, and plasma stability, *Chem. Med. Chem.*, **7**, 318-325, doi: 10.1002/cmdc.201100492.
31. Kleinz, M. J., and Davenport, A. P. (2004) Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endothelial cells, *Regul. Pept.*, **118**, 119-125, doi: 10.1016/j.regpep.2003.11.002.
32. Kleinz, M. J., Skepper, J. N., and Davenport, A. P. (2005) Immunocytochemical localization of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells, *Regul. Pept.*, **126**, 233-240, doi: 10.1016/j.regpep.2004.10.019.
33. Barnes, G., Japp, A. G., and Newby, D. E. (2010) Translational promise of the apelin-APJ system, *Heart*, **96**, 1011-1016, doi: 10.1136/hrt.2009.191122.
34. Chapman, N. A., Dupré, D. J., and Rainey, J. K. (2024) The apelin receptor: physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR, *Biochem. Cell Biol.*, **92**, 431-440, doi: 10.1139/bcb-2014-0072.
35. Pitkin, S. L., Maguire, J. J., Bonner, T. I., and Davenport, A. P. (2010) International union of basic and clinical pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function, *Pharmacol. Rev.*, **62**, 331-342, doi: 10.1124/pr.110.002949.
36. Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M. X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., and Fujimiya, M. (2001) The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism, *Regul. Pept.*, **99**, 87-92, doi: 10.1016/s0167-0115(01)00236-1.
37. Japp, A. G., Cruden, N. L., Amer, D. A., Li, V. K., Goudie, E. B., Johnston, N. R., Sharma, S., Neilson, I., Webb, D. J., Megson, I. L., Flapan, A. D., and Newby, D. E. (2008) Vascular effects of apelin *in vivo* in man, *Am. Coll. Cardiol.*, **52**, 908-913, doi: 10.1016/j.jacc.2008.06.013.
38. Salcedo, A., Garijo, J., Monge, L., Fernandez, N., Luis García-Villalon, A., Sánchez Turrión, V., Cuervas-Mons, V., and Diéguez, G. (2007) Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids, *Regul. Pept.*, **144**, 50-55, doi: 10.1016/j.regpep.2007.06.005.
39. Katugampola, S. D., Maguire, J. J., Matthewson, S. R., and Davenport, A. P. (2001) [125I]-(Pyr1) Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man, *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 1255-1260, doi: 10.1038/sj.bjp.0703939.
40. Maguire, J. J., Kleinz, M. J., Pitkin, S. L., and Davenport, A. P. (2009) [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease, *Hypertension*, **54**, 598-604, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134619.
41. Kasai, A., Shintani, N., Oda, M., Kakuda, M., Hashimoto, H., Matsuda, T., Hinuma, S., and Baba, A. (2004) Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 395-400, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.042.
42. Cox, C. M., D'Agostino, S. L., Miller, M. K., Heimark, R. L., and Krieg, P. A. (2006) Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo, *Dev. Biol.*, **296**, 177-189, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.04.452.
43. Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2004) Apelin (65-77) activates p70S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells, *FASEB J.*, **18**, 1909-1911, doi: 10.1096/fj.04-1930fje.
44. Li, F., Li, L., Qin, X., Pan, W., Feng, F., Chen, F., Zhu, B., Liao, D., Tanowitz, H., Albanese, C., and Chen, L. (2008) Apelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation: the regulation of cyclin D1, *Front. Biosci.*, **13**, 3786-3792, doi: 10.2741/2967.
45. Kasai, A., Shintani, N., Kato, H., Matsuda, S., Gomi, F., Haba, R., Hashimoto, H., Kakuda, M., Tano, Y., and Baba, A. (2008) Retardation of retinal vascular development in apelin deficient mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1717-1722, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.163402.
46. Zhang, Q., Shen, Y., Niloy, S. I., O'Rourke, S. T., and Sun, C. (2023) Chronic effects of apelin on cardiovascular regulation and angiotensin II-induced hypertension, *Pharmaceuticals (Basel)*, **16**, 600, doi: 10.3390/ph16040600.
47. Berry, M. F., Pirololi, T. J., Jayasankar, V., Burdick, J., Morine, K. J., Gardner, T. J., and Woo, Y. J. (2004) Apelin has *in vivo* inotropic effects on normal and failing hearts, *Circulation*, **110**, II187-II193, doi: 10.1161/01.CIR.0000138382.57325.5c.
48. Aydin, S., Eren, M. N., Sahin, I., and Aydin, S. (2014) The role of apelins in the physiology of the heart, *Protein Pept. Lett.*, **21**, 2-9, doi: 10.2174/09298665113209990083.
49. Szokodi, I., Tavi, P., Földes, G., Voutilainen-Myllylä, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkariainen, S., Piuhola, J., Rysä, J., Tóth, M., and Ruskoaho, H. (2002) Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility, *Circ. Res.*, **91**,

- 434-440, doi: 10.1161/01.res.0000033522.37861.69.
50. Ashley, E. A., Powers, J., Chen, M., Kundu, R., Finsterbach, T., Caffarelli, A., Deng, A., Eichhorn, J., Mahajan, R., Agrawal, R., Greve, J., Robbins, R., Patterson, A. J., Bernstein, D., and Quertermous, T. (2005) The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading *in vivo*, *Cardiovasc. Res.*, **65**, 73-82, doi: 10.1016/j.cardiores.2004.08.018.
 51. Scimia, M. C., Hurtado, C., Ray, S., Metzler, S., Wei, K., Wang, J., Woods, C. E., Purcell, N. H., Catalucci, D., Akasaka, T., Bueno, O. F., Vlasuk, G. P., Kaliman, P., Bodmer, R., Smith, L. H., Ashley, E., Mercola, M., Brown, J. H., and Ruiz-Lozano, P. (2012) APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy, *Nature*, **488**, 394-398, doi: 10.1038/nature11263.
 52. De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., Kordon, C., Vaudry, H., Moos, F., and Llorens-Cortes, C. (2004) Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10464-10469, doi: 10.1073/pnas.0403518101.
 53. Reaux-Le Goazigo, A., Morinville, A., Burlet, A., Llorens-Cortes, C., and Beaudet, A. (2004) Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons, *Endocrinology*, **145**, 4392-4400, doi: 10.1210/en.2004-0384.
 54. Huang, Zh., Luo, X., Liu, M., and Chen, L. (2019) Function and regulation of apelin/APJ system in digestive physiology and pathology, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 7796-7810, doi: 10.1002/jcp.27720.
 55. Kunduzova, O., Alet, N., Delesque-Touchard, N., Millet, L., Castan-Laurell, I., Muller, C., Dray, C., Schaeffer, P., Herault, J. P., Savi, P., Bono, F., and Valet, P. (2008) Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes, *FASEB J.*, **22**, 4146-4153, doi: 10.1096/fj.07-104018.
 56. Wei, L., Hou, X., and Tatemoto, K. (2005) Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes, *Regul. Pept.*, **132**, 27-32, doi: 10.1016/j.regpep.2005.08.003.
 57. Sorhede Winzell, M., Magnusson, C., and Ahren, B. (2005) The APJ receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice, *Regul. Pept.*, **131**, 12-17, doi: 10.1016/j.regpep.2005.05.004.
 58. Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buléon, M., Cani, P. D., Attané, C., Guigné, C., Carpéné, C., Burcelin, R., Castan-Laurell, I., and Valet, P. (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice, *Cell. Metab.*, **8**, 437-445, doi: 10.1016/j.cmet.2008.10.003.
 59. Castan-Laurell, I., Vítková, M., Daviaud, D., Dray, C., Kováčiková, M., Kovacova, Z., Hejnova, J., Stich, V., and Valet, P. (2008) Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ, *Eur. J. Endocrinol.*, **158**, 905-910, doi: 10.1530/EJE-08-0039.
 60. Li, L., Yang, G., Li, Q., Tang, Y., Yang, M., Yang, H., and Li, K. (2006) Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects, *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.*, **114**, 544-548, doi: 10.1055/s-2006-948309.
 61. Castan-Laurell, I., Dray, C., Knauf, C., Kunduzova, O., and Valet, P. (2012) Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends. Endocrinol. Metab.*, **23**, 234-241, doi: 10.1016/j.tem.2012.02.005.
 62. Yue, P., Jin, H., Aillaud, M., Deng, A. C., Azuma, J., Asagami, T., Kundu, R. K., Reaven, G. M., Quertermous, T., and Tsao, P. S. (2010) Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **298**, E59-E67, doi: 10.1152/ajpendo.00385.2009.
 63. Higuchi, K., Masaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., and Yoshimatsu, H. (2007) Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice, *Endocrinology*, **148**, 2690-2697, doi: 10.1210/en.2006-1270.
 64. Chen, M. M., Ashley, E. A., Deng, D. X., Tsalenko, A., Deng, A., Tabibiazar, R., Ben-Dor, A., Fenster, B., Yang, E., King, J. Y., Fowler, M., Robbins, R., Johnson, F. L., Bruhn, L., McDonagh, T., Dargie, H., Yakhini, Z., Tsao, P. S., and Quertermous, T. (2003) Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction, *Circulation*, **108**, 12, 1432-1439, doi: 10.1161/01.CIR.0000091235.94914.75.
 65. Chong, K. S., Gardner, R. S., Morton, J. J., Ashley, E. A., and McDonagh, T. A. (2006) Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure, *Eur. J. Heart. Fail.*, **8**, 355-360, doi: 10.1016/j.ejheart.2005.10.007.
 66. Miettinen, K. H., Magga, J., Vuolteenaho, O., Vanninen, E. J., Punnonen, K. R., Ylitalo, K., Tuomainen, P., and Peuhkurinen, K. J. (2007) Utility of plasma apelin and other indices of cardiac dysfunction in the clinical assessment of patients with dilated cardiomyopathy, *Regul. Pept.*, **140**, 178-184, doi: 10.1016/j.regpep.2006.12.004.
 67. Foldes, G., Horkay, F., Szokodi, I., Vuolteenaho, O., Ilves, M., Lindstedt, K. A., Mäyränpää, M., Sárman, B., Seres, L., Skoumal, R., Lakó-Futó, Z., deChâtel, R., Ruskoaho, H., and Tóth, M. (2003) Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 3, 480-485, doi: 10.1016/s0006-291x(03)01424-4.
 68. Ronkainen, V. P., Ronkainen, J. J., Hanninen, S. L.,

- Leskinen, H., Ruas, J. L., Pereira, T., Poellinger, L., Vuolteenaho, O., and Tavi, P. (2007) Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin, *FASEB J.*, **21**, 1821-1830, doi: 10.1096/fj.06-7294com.
69. Sheikh, A. Y., Chun, H. J., Glassford, A. J., Kundu, R. K., Kutschka, I., Ardigo, D., Hendry, S. L., Wagner, R. A., Chen, M. M., Ali, Z. A., Yue, P., Huynh, D. T., Connolly, A. J., Pelletier, M. P., Tsao, P. S., Robbins, R. C., and Quertermous, T. (2008) *In vivo* genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **294**, H88-H98, doi: 10.1152/ajpheart.00935.2007.
 70. Hashimoto, T., Kihara, M., Imai, N., Yoshida, S., Shimoyamada, H., Yasuzaki, H., Ishida, J., Toya, Y., Kiuchi, Y., Hirawa, N., Tamura, K., Yazawa, T., Kitamura, H., Fukamizu, A., and Umemura, S. (2007) Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis, *Am. J. Pathol.*, **171**, 1705-1712, doi: 10.2353/ajpath.2007.070471.
 71. Pitkin, S. L., Maguire, J. J., Kuc, R. E., and Davenport, A. P. (2010) Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man, *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 1785-1795, doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00821.x.
 72. Peltonen, T., Napankangas, J., Vuolteenaho, O., Ohtonen, P., Soini, Y., Juvonen, T., Satta, J., Ruskoaho, H., and Taskinen, P. (2009) Apelin and its receptor APJ in human aortic valve stenosis, *J. Heart Valve Dis.*, **18**, 644-652.
 73. Leeper, N. J., Tedesco, M. M., Kojima, Y., Schultz, G. M., Kundu, R. K., Ashley, E. A., Tsao, P. S., Dalman, R. L., and Quertermous, T. (2009) Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **296**, H1329-H1335, doi: 10.1152/ajpheart.01341.2008.
 74. Tiani, C., Garcia-Pras, E., Mejias, M., de Gottardi, A., Berzigotti, A., Bosch, J., and Fernandez, M. (2009) Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension, *J. Hepatol.*, **50**, 296-305, doi: 10.1016/j.jhep.2008.09.019.
 75. Principe, A., Melgar-Lesmes, P., Fernandez-Varo, G., del Arbol, L. R., Ros, J., Morales-Ruiz, M., Bernardi, M., Arroyo, V., and Jiménez, W. (2008) The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease, *Hepatology*, **48**, 1193-1201, doi: 10.1002/hep.22467.
 76. Kalin, R. E., Kretz, M. P., Meyer, A. M., Kispert, A., Heppner, F. L., and Brändli, A. W. (2007) Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis, *Dev. Biol.*, **305**, 599-614, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.03.004.
 77. Sorli, S. C., Le Gonidec, S., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2007) Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis, *Oncogene*, **26**, 7692-7699, doi: 10.1038/sj.onc.1210573.
 78. Eyries, M., Siegfried, G., Ciumas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F., and Soubrier, F. (2008) Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis, *Circ. Res.*, **103**, 432-440, doi: 10.1161/circresaha.108.179333.
 79. Kidoya, H., Naito, H., and Takakura, N. (2010) Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia, *Blood*, **115**, 3166-3174, doi: 10.1182/blood-2009-07-232306.
 80. Zeng, X. J., Zhang, L. K., Wang, H. X., Lu, L. Q., Ma, L. Q., and Tang, C. S. (2009) Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat, *Peptides*, **30**, 1144-1152, doi: 10.1016/j.peptides.2009.02.010.
 81. Rastaldo, R., Cappello, S., Folino, A., Berta, G. N., Sprio, A. E., Losano, G., Samaja, M., and Pagliaro, P. (2011) Apelin-13 limits infarct size and improves cardiac postischemic mechanical recovery only if given after ischemia, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **300**, H2308-H2315, doi: 10.1152/ajpheart.01177.2010.
 82. Simpkin, J. C., Yellon, D. M., Davidson, S. M., Lim, S. Y., Wynne, A. M., and Smith, C. C. (2007) Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury, *Basic Res. Cardiol.*, **102**, 518-528, doi: 10.1007/s00395-007-0671-2.
 83. Azizi, Y., Faghihi, M., Imania, A., Roghanib, M., and Nazari, A. (2013) Post-infarct treatment with [Pyr1]-apelin-13 reduces myocardial damage through reduction of oxidative injury and nitric oxide enhancement in the rat model of myocardial infarction, *Peptides*, **46**, 76-82, doi: 10.1016/j.peptides.2013.05.006.
 84. Yang, S., Li, H., Tang, L., Ge, G., Ma, J., Qiao, Z., Liu, H., and Fang, W. (2015) Apelin-13 Protects the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury through the RISK-GSK-3-MPTP Pathway, *Arch. Med. Sci.*, **11**, 1065-1073, doi: 10.5114/aoms.2015.54863.
 85. Pisarenko, O. I., Shulzhenko, V. S., Studneva, I. M., Serebryakova, L. I., Pelogeykina, Y. A., and Veselova, O. M. (2015) Signaling pathways of a structural analogue of apelin-12 involved in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury, *Peptides*, **73**, 67-76, doi: 10.1016/j.peptides.2015.09.001.
 86. An, S., Wang, X., Shi, H., Zhang, X., Meng, H., Li, W., Chen, D., and Ge, J. (2020) Apelin protects against ischemia-reperfusion injury in diabetic myocardium via Inhibiting apoptosis and oxidative stress through PI3K and P38-MAPK signaling pathways, *Aging*, **12**, 25120-25137, doi: 10.18632/aging.104106.
 87. Kleinz, M. J., and Baxter, G. F. (2008) Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase, *Regul. Pept.*, **146**, 271-277, doi: 10.1016/j.regpep.2007.10.002.
 88. Smith, C. C., Mocanu, M. M., Bowen, J., Wynne, A. M., Simpkin, J. C., Dixon, R. A., Cooper, M. B., and Yellon, D. M. (2007) Temporal changes in myocardial salvage kinases during reperfusion following

- ischemia: studies involving the cardioprotective adipocytokine apelin, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **21**, 409-414, doi: 10.1007/s10557-007-6054-y.
89. O'Carroll, A.-M., Lolait, S. J., Harris, L. E., and Pope, G. R. (2013) The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis, *J. Endocrinol.*, **219**, R13-R35, doi: 10.1530/joe-13-0227.
 90. Masri, B., Morin, N., Pedebernade, L., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2006) The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments, *J. Biol. Chem.*, **281**, 18317-18326, doi: 10.1074/jbc.M600606200.
 91. Kennedy, S. G., Kandel, E. S., Cross, T. K., and Hay, N. (1999) Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome *c* from mitochondria, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5800-5810, doi: 10.1128/MCB.19.8.5800.
 92. Pisarenko, O., Shulzhenko, V., Studneva, I., Serebryakova, L., and Veselova, O. (2017) 5-Hydroxydecanoate abolishes cardioprotective effects of a structural analogue of apelin-12 in ischemia/reperfusion injury, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **23**, 333-341, doi: 10.1007/s10989-016-9565-1.
 93. Miura, T., Tanno, M., and Sato, T. (2010) Mitochondrial kinase signaling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis, *Cardiovasc. Res.*, **88**, 7-15, doi: 10.1093/cvr/cvq206.
 94. Chapman, N. A., Dupré, D. J., and Rainey, J. K. (2014) The apelin receptor: physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR, *Biochem. Cell Biol.*, **92**, 431-440, doi: 10.1139/bcb-2014-0072.
 95. Khan, T. A., Bianchi, C., Ruel, M., Voisine, P., and Sellke, F. W. (2004) Mitogen-activated protein kinase pathways and cardiac surgery, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **127**, 806-811, doi: 10.1016/j.jtcvs.2003.04.001.
 96. Jia, Y. X., Pan, C. S., Zhang, J., Geng, B., Zhao, J., Gerns, H., Yang, J., Chang, J. K., Tang, C. S., and Qi, Y. F. (2006) Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats, *Regul. Pept.*, **133**, 147-154, doi: 10.1016/j.regpep.2005.09.033.
 97. Foussal, C., Lairez, O., Calise, D., Pathak, A., Guilbeau-Frugieret, C., Valet, P., Parini, A., and Kunduzova, O. (2010) Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy, *FEBS Lett.*, **584**, 2363-2370, doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.025.
 98. Rastaldo, R., Cappello, S., Folino, A., and Losano, G. (2011) Effect of apelin-apelin receptor system in post-ischaemic myocardial protection: a pharmacological postconditioning tool? *Antioxid. Redox Signal.*, **14**, 909-922, doi: 10.1089/ars.2010.3355.
 99. Macaluso, N. J., and Glen, R. C. (2010) Exploring the 'RPRL' motif of apelin-13 THROUGH molecular simulation and biological evaluation of cyclic peptide analogues, *Chem. Med. Chem.*, **5**, 1247-1253, doi: 10.1002/cmdc.201000061.
 100. Hamada, J., Kimura, J., Ishida, J., Kohda, T., Morishita, S., Ichihara, S., and Fukamizu, A. (2008) Evaluation of novel cyclic analogues of apelin, *Int. J. Mol. Med.*, **22**, 547-552, doi: 10.3892/ijmm.00000054.
 101. Wang, W., McKinnie, S. M., Patel, V. B., Haddad, G., Wang, Z., Zhabyeyev, P., Das, S. K., Basu, R., McLean, B., Kandalam, V., Penninger, J. M., Kassiri, Z., Vederas, J. C., Murray, A. G., and Oudit, G. Y. (2013) Loss of apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic apelin analogues, *J. Am. Heart Assoc.*, **2**, e000249, doi: 10.1161/JAHA.113.000249.
 102. Jia, Z. Q., Hou, L., Leger, A., Wu, I., Kudej, A. B., Stefano, J., Jiang, C., Pan, C. Q., and Akita, G. Y. (2012) Cardiovascular effects of a PEGylated apelin, *Peptides*, **38**, 181-188, doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.003.
 103. Iturrioz, X., Alvear-Perez, R., De Mota, N., Franchet, C., Guillier, F., Leroux, V., Dabire, H., Le Jouan, M., Chabane, H., Gerbier, R., Bonnet, D., Berdeaux, A., Maignet, B., Galzi, J. L., Hibert, M., and Llorens-Cortes, C. (2010) Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist, *FASEB J.*, **24**, 1506-1517, doi: 10.1096/fj.09-140715.
 104. Murali, S., and Aradhyam, G. K. (2023) Structure-function relationship and physiological role of apelin and its G protein coupled receptor, *Biophys. Rev.*, **15**, 127-143, doi: 10.1007/s12551-023-01044-x.
 105. Iturrioz, X., Gerbier, R., Leroux, V., Alvear-Perez, R., Maignet, B., and Llorens-Cortes, C. (2010) By interacting with the C-terminal Phe of apelin, Phe255 and Trp259 in helix VI of the apelin receptor are critical for internalization, *J. Biol. Chem.*, **285**, 32627-32637, doi: 10.1074/jbc.M110.127167.
 106. Pitkin, S., Macaluso, N., Maguire J., Glen, R., and Davenport, A. (2009) Role for apelin in human atherosclerosis and discovery of novel agonist for its receptor APJ, *Proc. Br. Pharmacol. Soc.*, URL: <http://www.pa2online.org/abstracts/Vol7Issue4abst027P.pdf>.
 107. Macaluso, N. J., Pitkin, S. L., Maguire, J. J., Davenport, A. P., and Glen, R. C. (2011) Discovery of a competitive apelin receptor (APJ) antagonist, *Chem. Med. Chem.*, **6**, 1017-1023, doi: 10.1002/cmdc.201100069.
 108. Sidorova, M. V., Azmuko, A. A., Pal'keeva, M. E., Molokoedov, A. S., and Bushuev, V. N. (2012) Synthesis and cardioprotective properties of apelin-12 and its structural analogs [in Russian], *Bioorg. Khim.*, **38**, 40-51, doi: 10.1134/s1068162012010177.
 109. Молокоедов А. С., Беспалова Ж. Д., Пелогейкина Ю. А., Азьмуко А. А., Масенко В. П., Писаренко О. И., Шульженко В. С., Терещенко С. Н., Сидорова М. В., Палькеева М. Е. (2012) Додекапептиды, обладающие кардиопротекторными свойствами, Патент РФ № 2457216 (27.07.2012).
 110. Филатова М. П., Крит Н. А., Комарова О. М.,

- Орехович В. И., Рейссманн З., Лиепиня И. Т., Никифорович Г. В. (1986) Синтез и исследование конформационно ограниченных аналогов пептидных ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, *Биоорг. Хим.*, **12**, 59-70.
111. Janecka, A., Kruszynski, R., Fichna, J., Kosson, P., and Janecki, T. (2006) Enzymatic degradation studies of endomorphin-2 and its analogs containing N-methylated amino acids, *Peptides.*, **27**, 131-135, doi: 10.1016/j.peptides.2005.06.015.
 112. Pisarenko, O., Shulzhenko, V., Studneva, I., Pelogeykina, Yu., Timoshin, A., Anesia, R., Valet, P., Parini, A., and Kunduzova, O. (2015) Structural apelin analogues: mitochondrial ROS inhibition and cardiometabolic protection in myocardial ischaemia-reperfusion injury, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 2933-2945, doi: 10.1111/bph.13038.
 113. Pisarenko, O. I., Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Serebryakova, L. I., Shulzhenko, V. S., Timoshin, A. A., Tskitishvili, O. V., Pelogeykina, Y. A., and Studneva, I. M. (2014) Apelin-12 and its structural analog enhance antioxidant defense in experimental myocardial ischemia and reperfusion, *Mol. Cell. Biochem.*, **391**, 241-250, doi: 10.1007/s11010-014-2008-4.
 114. Pelogeykina, Y. A., Konovalova, G. G., Pisarenko, O. I., and Lankin, V. Z. (2015) Antioxidant action of apelin-12 peptide and its structural analog *in vitro*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **159**, 604-606, doi: 10.1007/s10517-015-3024-4.
 115. Pisarenko, O. I., Shulzhenko, V. S., Pelogeykina, Y. A., and Studneva, I. M. (2015) Enhancement of crystalloid cardioplegic protection by structural analogs of apelin-12, *J. Surg. Res.*, **194**, 18-24, doi: 10.1016/j.jss.2014.11.007.
 116. Pisarenko, O. I., and Studneva, I. M. (2023) Modified APJ receptor peptide ligands as postconditioning drugs in myocardial ischaemia/reperfusion injury, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **29**, 23, doi: 10.1007/s10989-023-10498-2.
 117. Tao, J., Zhu, W., Li, Y., Xin, P., Li, J., Liu, M., Li, J., Redington, A. N., and Wei, M. (2011) Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, H1471-H1486, doi: 10.1152/ajpheart.00097.2011.
 118. Hausenloy, D. J., and Yellon, D. M. (2007) Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion, *Pharmacol. Ther.*, **116**, 173-191, doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.06.005.
 119. Sidorova, M., Studneva, I., Bushuev, V., Pal'keeva, M., Molokoedov, A., Veselova, O., Ovchinnikov, M., and Pisarenko, O. (2020) [MeArg1, NLe10]-apelin-12: Optimization of solid-phase synthesis and evaluation of biological properties *in vitro* and *in vivo*, *Peptides*, **129**, 170320, doi: 10.1016/j.peptides.2020.170320.

APELIN C-TERMINAL FRAGMENTS: BIOLOGICAL PROPERTIES AND THERAPEUTIC POTENTIAL

Review

O. I. Pisarenko* and I. M. Studneva

*National Medical Research Center of Cardiology named after Academician E. I. Chazov,
121552 Moscow, Russia; e-mail: olpi@live.ru*

The creation of bioactive molecules for the treatment of cardiovascular diseases based on natural peptides stimulates intensive experimental research. In recent years, it has been established that the C-terminal fragments of apelin, an endogenous ligand of the APJ receptor, reduce metabolic and functional disorders in experimental heart damage. The review presents literature data and generalized results of our own experiments on the effect of apelin-13, [Pyr]apelin-13, apelin-12, and their chemically modified analogues on the heart in normal conditions and when modeling pathophysiological conditions *in vitro* and *in vivo*. It has been shown that the spectrum of action of apelin peptides on the damaged myocardium covers a decrease in the death of cardiomyocytes from necrosis, a decrease in cardiomyocyte membrane damage, an improvement in the metabolic state of the myocardium, and a decrease in the formation of reactive oxygen species and lipid peroxidation products. The mechanisms of the protective action of these peptides associated with the activation of the APJ receptor and the manifestation of antioxidant properties are discussed. The data presented in the review indicate the promise of molecular design of pharmacological APJ receptor agonists, which can serve as the basis for the development of cardioprotectors that affect the processes of free radical oxidation and metabolic adaptation.

Keywords: apelin, structural analogs, heart, experimental pathology, metabolism, cardiomyocyte membranes, lipid peroxidation, reactive oxygen species, antioxidant enzymes

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯТЫ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА: ОТ МОЛЕКУЛ ДО НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Обзор

© 2023 Н.И. Новиков, Е.С. Бражник, В.Ф. Кичигина*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: vkitchigina@gmail.com*

Поступила в редакцию 08.06.2023

После доработки 22.09.2023

Принята к публикации 22.09.2023

Болезнь Паркинсона (БП) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, возникающее в результате гибели дофаминергических нейронов черной субстанции и появления в телах нейронов белковых агрегатов, состоящих преимущественно из альфа-синуклеина, известных как тельца Леви. БП в настоящее время признана мультисистемным расстройством, характеризующимся тяжелыми нарушениями двигательной функции и различными немоторными симптомами. Снижение когнитивных функций является одним из наиболее распространенных и тревожных немоторных симптомов. Умеренные когнитивные нарушения (КН), диагностируемые уже на ранних стадиях БП, завершаются, как правило, глубокой деменцией. Основные типы КН, наблюдаемые при БП, включают нарушение исполнительных функций, ухудшение внимания и памяти, зрительно-пространственные нарушения и вербальный дефицит. Согласно данным литературы, существенное значение в развитии когнитивных дисфункций при БП имеют следующие механизмы: (1) изменение конформационной структуры синаптических белков; (2) нарушение синаптической передачи; (3) нейровоспаление (патологическая активация нейроглии); (4) дисфункция митохондрий и окислительный стресс; (5) метаболические нарушения; (6) перестройки нейронных сетей. Перечисленные молекулярные и синаптические изменения в мозге способны привести к гибели дофаминсинтезирующих клеток черной субстанции и дисфункции других медиаторных систем, а также частичной клеточной атрофии в неокортексе и подкорковых ядрах. В результате нарушается работа нейронных сетей, участвующих в процессах передачи информации, связанной с регуляцией двигательной активности и когнитивными функциями. Выяснение причин изменений, происходящих при БП, и поиск методов их устранения помогут созданию новых подходов в терапии данного заболевания. Целью обзора является анализ патологических процессов в мозге, лежащих в основе возникновения когнитивных нарушений при БП. В обзоре проанализированы данные, полученные как в исследованиях на БП-пациентах, так и на животных моделях этого заболевания (у грызунов и приматов), применяемых при изучении механизмов этиологии и развития БП у человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Паркинсона, дофамин, когнитивные нарушения, биомаркеры, α -синуклеин, транзиттерная патология, гипометаболизм глюкозы, нейровоспаление, митохондриальные дисфункции, позитронно-эмиссионная и магнитно-резонансная томография, структурные изменения, модели у животных.

DOI: 10.31857/S0320972523110180, **EDN:** MMXSXC

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, ко-

торым страдают миллионы людей. Наиболее характерными признаками БП являются двигательные нарушения (акинезия, брадикинезия, ригидность мышц, тремор, постуральная

Принятые сокращения: БА — болезнь Альцгеймера; БП — болезнь Паркинсона; КН — когнитивные нарушения; МРТ — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; ФВ — функциональное взаимодействие (коннективность); фМРТ — функциональная магнитно-резонансная томография; α -Син — альфа-синуклеин; ЦСЖ — цереброспинальная жидкость; А β — бета-амилоиды; APP — белок-предшественник амилоида; BDNF — нейротрофический фактор мозга; NGF — фактор роста нервов; 6-OHDA — 6-гидроксидофамин.

* Адресат для корреспонденции.

неустойчивость), которые связывают с гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции и дофаминергической денервацией стриатума, ведущими к критическим изменениям работы моторных нейросетей [1–7].

Важный нейропатологический признак БП — наличие телец Леви и Леви-нейритов в сохранившихся дофаминергических нигростриарных нейронах [8]. Ключевым (но не единственным) компонентом телец Леви являются аномальные агрегаты белка альфа-синуклеина (α -Син) [9, 10].

До недавнего времени большая часть исследований, посвященных БП, была сосредоточена на анализе и выяснении механизмов двигательных нарушений. Меньше внимания уделялось изучению когнитивных нарушений, сопутствующих развитию БП. К настоящему времени накопилось достаточно сведений, указывающих, что у больных БП обнаруживаются разнообразные когнитивные дисфункции. Они могут появляться уже на ранних стадиях развития болезни, еще до постановки клинического диагноза БП [11]. Известно, что первые моторные симптомы обнаруживаются при достижении критической точки заболевания, т.е. при потере 50–60% дофаминергических нейронов в черной субстанции и 70–80% дофаминергических терминалей в стриатуме [12], в то время как когнитивные нарушения (КН) на несколько лет предшествуют началу двигательных нарушений [13]. Когнитивные отклонения варьируют от умеренных в начале заболевания до деменции — на поздней его стадии [11, 14, 15]. Ослабление когнитивных функций при БП представляет собой непрерывный процесс, наблюдаемый почти у всех пациентов. Уже при постановке диагноза примерно 20–25% БП-пациентов имеют умеренные КН, при этом средний период времени от начала заболевания до деменции составляет 10–15 лет [11, 15, 16]. Несмотря на то что эти нарушения встречаются при БП часто, их механизмы полностью не выяснены. Поэтому важно определить время начала когнитивных дисфункций и оценить их сочетание с другими патологическими характеристиками в продромальной фазе БП, чтобы предотвратить или отсрочить дальнейшее прогрессирование болезни [11]. Наряду с клиническими исследованиями, для понимания механизмов возникновения и прогрессирования этого заболевания необходимо также моделирование БП у животных. В данном обзоре проанализированы результаты исследований, в которых изучались нарушения когнитивных функций у животных на моделях БП.

Знание механизмов, лежащих в основе когнитивного дефицита при БП, может лечь в основу новых подходов для терапии этого заболевания.

СВЯЗЬ МЕЖДУ КОГНИТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ И ПАТОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ В МОЗГЕ ПРИ БП

В данном обзоре рассмотрены патологические корреляты когнитивных дисфункций при трех основных типах когнитивных нарушений, наблюдаемых у БП-пациентов: (1) дефицит исполнительных функций (координации внимания, оценки происходящих событий и прогнозирования, планирования, когнитивной гибкости, тормозного контроля, манипулирования информацией в рабочей памяти и ее извлечение из долговременной памяти [17]); (2) ослабление внимания и памяти (кратковременной и долговременной декларативной памяти [18–22] и процедурной памяти [23]) и (3) зрительно-пространственные нарушения [24–26]. Оценка нарушений различных фенотипов когнитивных функций у пациентов с двигательными расстройствами выявила, что наиболее часто страдают исполнительные функции и память (33,3%), за ними следуют зрительно-пространственные отклонения (27,3%) и нарушение внимания (21,2%) [26].

Информация о механизмах, лежащих в основе когнитивных нарушений при БП, получена по результатам: (1) клинико-патологических исследований с применением методов визуализации, электрофизиологических и генетических подходов, а также анализа биожидкостей с целью выявления биомаркеров болезни Паркинсона; (2) исследований на моделях БП у животных, обнаруживающих когнитивный дефицит.

Обзор данных литературы указывает на то, что возникновение когнитивных дисфункций при БП базируется на механизмах, представляющих собой разные уровни патофизиологии этого заболевания и определяющие сложную динамику нейропластических перестроек ЦНС на фоне текущего нейродегенеративного процесса. К ним относятся: (1) изменение конформационной структуры синаптических белков; (2) нарушение синаптической передачи; (3) нейровоспаление (патологическая активация нейроглии); (4) дисфункция митохондрий и окислительный стресс; (5) метаболические нарушения (гипометаболизм глюкозы, дисфункция метаболизма гликолипидов);

(6) перестройки нейронных сетей. Эти механизмы не исчерпывают всех патологических изменений, наблюдаемых при развитии БП, однако они являются наиболее частыми и значимыми.

Изменение конформационной структуры синаптических белков. Установлено, что при БП первоначальное повреждение дофаминергических нейронов черной субстанции и денервация ядер базальных ганглиев приводит к обширным функциональным изменениям нейронных сетей, контролирующих движение [27, 28].

Существенную роль в патофизиологии БП и когнитивных дисфункциях играют несколько трансмембранных (синаптических) белков: (1) α -Син, (2) предшественник бета-амиоида (APP), (3) нейрогранин и (4) SNAP25.

α -Синуклеин считается основным патологическим молекулярным субстратом БП [29]. Агрегация α -Син и его прионоподобное распространение вовлечены в патогенез болезни Паркинсона. Главный локус патологических отложений агрегатов α -Син [15] — пресинаптические окончания [30]. Этот белок, участвующий в образовании синаптического везикулярного комплекса, регулирует в норме синаптический гомеостаз, высвобождение везикул и нейротрансмиттеров [30]. Отложения олигомеров (α -Син) в пресинапсе пресинапсе сопровождается потерей дендритных шипиков, играющих важную роль в пластических процессах в мозге и, следовательно, в когнитивных функциях. Так, у трансгенных мышей ((Thy1)-h[A30P] α SYN), экспрессирующих мутантный α -Син, выполнение когнитивных задач нарушалось раньше, чем возникал двигательный дефицит. При анализе ткани этих мышей обнаружена α -синуклеинопатия в нескольких областях мозга, в том числе в центральном ядре миндалевидного тела, восприимчивом к патологии α -Син у пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) [31, 32] (подробнее см. в разделе «Исследование когнитивных функций на моделях БП у животных»).

Предшественник бета-амиоида, другой трансмембранный белок, также локализован в пресинаптических окончаниях. В процессе функционирования он первоначально расщепляется на несколько биологически активных метаболитов, бета-амилоидов (A β), в том числе A β 1–38, A β 1–40, и A β 1–42, при этом последний особенно склонен к паренхиматозному отложению в мозге [33]. Высвобождение бета-амилоидов в тканевую жидкость происходит за счет пресинаптической активности и эндоцитоза [34]. Белковые отложения в цито-

плазме нейронов, включающие α -Син и A β , приводят к их гибели вследствие некроза и/или апоптоза (см. обзор Dionísio et al. [35]).

Нейрогранин, третий синаптический белок, является субстратом протеинкиназы C. Он локализован и интенсивно экспрессируется преимущественно в плазматической мембране постсинаптических дендритных шипиков [36].

SNAP25 (synaptosomal-associated protein, 25-kD), синаптический белок, компонент белкового комплекса SNARE, осуществляет стыковку синаптической везикулы с пресинаптической мембраной нейрона и процесс их слияния с последующим высвобождением нейромедиатора [37, 38]. Обнаружено, что снижение содержания в синапсах нейронов неокортекса нейрогранина и SNAP25, а также транспортера цинка ZnT3, маркера синаптической пластичности, связаны с когнитивной дисфункцией при БП [39, 40]. Также в процессах синаптической дисфункции большую роль играют аномальные конформационные изменения синаптических белков [15].

Другие белки — дегликаза DJ-1, паркин и, предположительно, киназа PINK1, связаны с генетическими факторами, лежащими в основе нескольких типов наследственной болезни Паркинсона. Эти белки, как и ранее перечисленные, играют определенную роль в развитии синаптической дисфункции при БП [41, 42]. Считается, что они важны для митохондриальной активности и защиты последних от окислительного стресса [41].

Отметим, что наличие одновременно нескольких протеинопатий дает аддитивный эффект [42, 43] (подробнее см. ниже). При этом наиболее распространенной сопутствующей патологией при БП являются изменения, свойственные и БА [44, 45]. Посмертные гистологические исследования мозга БП-пациентов с деменцией показали, что только у 38% имеется патология исключительно с наличием телец Леви (сформированных преимущественно агрегатами α -Син), тогда как в 59% случаев наблюдалось одновременное присутствие телец Леви и бета-амилоидных бляшек, а в 3% — к ним добавлялись нейрофибриллярные тау-клубки [39, 46].

Нейротрансмиттерная патология. Известно, что дофаминергическая иннервация мезолимбических и мезокортикальных нейросетей связана с когнитивными функциями. Оценить влияние дофаминергических нейронов на когнитивные функции сложно, поскольку противопаркинсонические препараты могут улучшать, ухудшать или не влиять на когнитивные способности [47]. Кроме того, недофаминерги-

ческие медиаторные системы также поражаются при БП, что, очевидно, способствует нарушению когнитивных функций [48]. Выявлено, что холинергическая денервация неокортекса при БП сопровождается ухудшением внимания и исполнительных функций [49]. Многочисленные данные свидетельствуют, что дегенерация ядра Мейнерта и его холинергических корковых проекций лежит в основе снижения когнитивных способностей при деменции, связанной с прогрессированием как БА, так и БП (см. обзор Gratwicke et al. [50]). Постмортем-исследования и использование визуализации мозга БП-пациентов показывают, что холинергическая система при БП поражается относительно рано [51, 52]. Это объясняет положительный эффект ингибиторов холинэстеразы на когнитивные функции при БП, а также их ухудшение при назначении препаратов с антихолинергической активностью [53]. Известно, что моноаминергические ядра, такие как норадренергическое голубое пятно (locus coeruleus) и серотонинергические ядра шва (raphe nuclei) с их обширными связями с мезокортикальными отделами мозга, способны влиять на когнитивные процессы [54–57]. При БП была обнаружена значительная потеря норадренергических нейронов в голубом пятне, а также дисфункция рецепторов 5HT_{1B}, что свидетельствует об участии норадренергической и серотонинергической систем в развитии заболевания [58, 59].

Дисфункция митохондрий и окислительный стресс. Известно, что митохондрии производят клеточную энергию и поддерживают гомеостаз в клетках; нарушение их функций вызывает окислительный стресс и запускает сигнальные пути, ведущие к нейродегенерации [60]. Гистологические постмортем-исследования мозга человека показали, что митохондриальные дисфункции, особенно окислительный стресс, являются патологическим механизмом, ведущим к БП [61, 62]. В синапсах активность митохондрий особенно высока. Она имеет решающее значение для их функционирования и, следовательно, для межнейронных коммуникаций и когнитивной деятельности. Нарушения активности митохондрий в нейронах связывают с уменьшением их числа в пресинапсе и снижением окислительно-восстановительного потенциала, а также уменьшением числа активных зон, т.е. факторов, приводящих к нарушению межнейронных взаимодействий в нейросетях [63, 64]. На уровне синапсов была продемонстрирована связь между содержанием α -Син и митохондриальной активностью [65, 66]. Однако их причинно-следственные отно-

шения нуждаются в дальнейшем изучении. Выявлено, что дефицит активности митохондриального комплекса I и снижение уровня митохондриальной ДНК в префронтальной коре возникали при БП как с деменцией, так и без деменции, однако в первом случае этот дефицит был выражен сильнее [67].

В исследованиях на дрозофиле [68] показано, что нейрональная митохондриальная дисфункция стимулирует ретроградный сигнальный ответ, который контролирует экспрессию генов, ответственных за когнитивное поведение. Если эти данные подтвердятся, митохондриальная передача сигналов может стать терапевтической мишенью для замедления формирования когнитивных расстройств при БП.

Метаболические нарушения. Установлено, что при БП метаболические паттерны, коррелирующие с когнитивными и моторными функциями, статистически независимы друг от друга [69, 70]. Нижняя теменная доля известна как область, в которой снижается метаболизм глюкозы при деменциях, включая БА, деменцию с тельцами Леви и БП. В исследованиях с использованием позитронно-эмиссионной томографии с 18F-фтордезоксиглюкозой (ФДГ-ПЭТ) обнаружено уменьшение скорости церебрального метаболизма глюкозы при БП, которое было наиболее выражено в затылочных областях неокортекса [71, 72]. У пациентов с недавно диагностированной БП показано снижение скорости метаболизма глюкозы в неокортексе, при этом оно коррелировало с результатами нейропсихологических тестов. Кроме того, показано, что снижение метаболизма глюкозы в париетальной коре коррелировало с повышенным риском нарушения когнитивных функций и развития деменции при БП [73]. Предполагается, что снижение метаболизма ФДГ в этой области может рассматриваться в качестве биомаркера нарушения когнитивных функций на ранних стадиях БП [73].

В клинических исследованиях обнаружена положительная корреляция степени ухудшения памяти на слова и вербальной ассоциативной памяти при БП со сниженным метаболизмом глюкозы в нижней теменной области, задней поясной коре и предклинье (precuneus), но не во фронтальной ассоциативной коре [74]. При усилении КН обнаружен гипометаболизм глюкозы также в префронтальной коре и нижней теменной области в сочетании с повышением уровня метаболизма в полушариях мозжечка [70]. Показано также, что снижение уровня метаболизма глюкозы в кортикальных структурах при БП совпадает по времени

с ухудшением когнитивных функций [73, 75, 76]. Это отчасти объясняется тем, что церебральный метаболизм глюкозы в кортикальных областях отражает синаптическую плотность и активность синапсов [77, 78]. Вероятно, снижение церебрального метаболизма глюкозы при БП и связанное с этим уменьшение активности синапсов могут привести к ухудшению когнитивных функций.

В работе Хоменко и соавт. [76] представлена развернутая картина скорости метаболизма глюкозы у БП-пациентов, имевших КН. Она включает наличие гипометаболизма глюкозы во фронтальной (поля Бродмана 9, 10, 11, 46 и 47), затылочной (19), теменной (39), височной (20, 37) и поясной (32) областях неокортекса. Изменения метаболизма глюкозы наблюдаются уже на ранних этапах развития КН у БП-пациентов и достоверно отличаются от показателей контрольной группы. При использовании ФДГ-ПЭТ выявлены два паттерна изменения метаболизма глюкозы при КН у больных с разными формами БП – акинетикоригидной формой БП и БП с тремором [79]. В первой группе наблюдалось снижение скорости метаболизма глюкозы во фронтальных областях, однако более выраженная корреляция скорости метаболизма с КН отмечена в теменной и задней поясной корках. Во второй группе была показана отрицательная корреляция показателей когнитивных тестов со скоростью метаболизма глюкозы преимущественно во фронтальной и передней поясной, а также теменной и височной долях коры. Полученные результаты дают возможность предположить наличие разных механизмов патогенеза когнитивных нарушений, соответствующих разным подтипам клинической симптоматики БП [79].

Нарушения метаболизма гликолипидов совпадают с ухудшениями когнитивных и двигательных функций у БП-пациентов. При этом более тяжелая симптоматика выявлена у БП-пациентов в сочетании с депрессией [80]. Представлены также доказательства того, что у БП-пациентов с КН часто встречается инсулинорезистентное состояние мозга [81, 82], влияющее на молекулярные каскады, лежащие в основе функций гиппокампа и когнитивных способностей (в частности, памяти) [83]. Показано, что длительная гиперактивация продукции инсулина/инсулиноподобных факторов роста может приводить к отложению Аβ в нейронах мозга, поскольку инсулин и Аβ конкурируют за один и тот же фермент, обеспечивающий их удаление [84].

Структурные нарушения в мозге при БП. Melzer et al. [85] в 2012 г. обнаружили, что ги-

бель нервных клеток во многих отделах мозга при БП коррелирует со снижением когнитивных показателей, но не с выраженностью двигательных нарушений. При этом умеренные КН ассоциируются с частичной клеточной атрофией в височной, теменной и фронтальной областях коры, а также двусторонне – в каудальном гиппокампе и парагиппокампальных областях, в хвостатом ядре, миндалевидном теле и правой скорлупе. Обнаружено также, что снижение толщины височно-теменной и префронтальной коры у БП-пациентов коррелирует с нарушениями исполнительных функций, зрительно-пространственными расстройствами, дефицитом внимания и памяти [86]. Данная работа частично подтверждает результаты, полученные ранее, согласно которым дефицит исполнительной функции у БП-пациентов является, в частности, следствием дегенерации фронто-стриарной сети [87].

В отдельных работах у БП-пациентов обнаружено уменьшение объема субполей гиппокампа [89] при параллельном снижении уровня Аβ в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) [88–90]. Интересно, что между уровнями Аβ42 в ЦСЖ и эффективностью запоминания обнаружена отрицательная корреляция [89, 91], в том числе у субъектов с нормальным уровнем Аβ42 (т.е. без признаков формирования амилоидных бляшек) [89].

Нейровоспаление и нейротрофические факторы. Нейровоспаление имеет серьезные негативные последствия на когнитивные функции при БП [92]. Считается, что активация микроглии приводит к гибели клеток на поздней стадии БП, когда развивается деменция [93]. Активация микроглии, сопровождающаяся ростом уровня цитокинов в ЦСЖ коррелирует с выраженностью когнитивных нарушений при БП [94], поэтому уровень цитокинов в ЦСЖ также может служить прогностическим биомаркером развития деменции (см. ниже). Нейровоспаление, наряду с митохондриальной дисфункцией и нарушением процессов репаративного нейрогенеза, является механизмом, приводящим к инсулинорезистентному состоянию мозга и БП [95, 96]. При обследовании 36 БП-пациентов, 12 из которых страдали диабетом, установлена связь между наличием диабета, тяжестью нейродегенерации во фронтальных областях мозга и когнитивными нарушениями в этой группе больных с БП [97].

Нейротрофические факторы имеют решающее значение для пластичности нейронов и, соответственно, для обучения и других когнитивных функций. Показано, что когнитивные нарушения при БП связаны со снижением

в ЦСЖ [98] и плазме крови [99] содержания ростовых факторов — мозгового фактора роста нервов (NGF) и эпидермального фактора роста. Показано, что NGF-депривация, например, после внутримозговой инъекции нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-OHDA), приводит к снижению активности митохондрий и активации каспазы 3, что сопровождается гибелью нейронов [100]. С другой стороны, введение NGF увеличивает содержание антиоксидантных ферментов, гемооксигеназы-1 и предотвращает апоптоз за счет индукции сигнальных путей антиапоптотических генов даже после воздействия 6-OHDA и 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (MPTP) [101]. Показано, что уровень NGF у БП-пациентов снижен [102]. Другой нейротрофический фактор, BDNF, способствует выживанию нейронов черной субстанции (в опытах *in vitro*) и защищает их от различных нейротоксических атак (*in vitro* и *in vivo*) [103, 104]. Кроме того, низкие уровни BDNF положительно коррелировали с дегенерацией дофаминергических нейронов полосатого тела [105]. Также показано снижение соотношения уровней BDNF/TrkB у БП-пациентов, что было связано с дегенерацией дофаминергических нейронов [106].

Нарушения нейросетевых взаимодействий. Исследования с применением функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) в состоянии покоя проводятся для изучения патофизиологии нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Паркинсона. При использовании фМРТ выявляются функциональные взаимодействия (ФВ) между областями мозга. Адекватные ФВ внутри и между сетями корково-подкорковых отделов, а также быстрая реконфигурация нейронных взаимодействий лежат в основе эффективной нейронной коммуникации и гибкого функционирования нейросетей мозга у здоровых людей. Специфическая морфологическая, а также функциональная патология нейронных сетей способна привести к появлению двигательных и когнитивных нарушений при БП. Функциональные сетевые взаимодействия могут использоваться для анализа внутрисетевой и межсетевой когерентности. Результаты фМРТ не только свидетельствуют о важной роли процессов реорганизации и адаптации мозговых сетей при БП, но также выявляют изменения функциональных межструктурных связей при отслеживании динамики и прогнозировании развития БП.

При использовании фМРТ у пациентов с БП обнаружены aberrantные изменения в сетевых функциональных связях как на ранней,

так и на поздней стадиях заболевания с участием дофаминергических корково-стриарных и мезолимбических-стриарных нейросетей, что вносит ценный вклад в понимание механизмов, лежащих в основе возникновения моторной симптоматики при БП [107, 108]. Кроме того, выявленные изменения в ФВ могут быть результатом повреждения нейронных сетей, а также свидетельствовать о наличии компенсаторной реакции сетей на развившиеся функциональные дефекты. По сравнению с соответствующими показателями в группе здоровых людей, у пациентов на ранней стадии БП повышается функциональная когерентность в сенсомоторных сетях (включающих первичную и вторичную соматосенсорные коры и дополнительную двигательную область) и в центральных исполнительных сетях (мезофронтальных областях коры, включая переднюю поясную и параингулярную коры) при отсутствии изменений межсетевых функциональных взаимодействий. На поздней стадии БП повышенная функциональная когерентность обнаружена в центральных исполнительных сетях, но сниженная когерентность показана в мозжечковых нейросетях. Кроме того, усиливались функциональные связи между сенсомоторными сетями и сетями, обеспечивающими переключение внимания и позволяющими извлечь из памяти события прошлого. Полученные данные свидетельствуют о том, что характеристики измененных ФВ-сетей мозга могут быть потенциальными маркерами дифференциации ранней и поздней стадий БП [109].

У БП-пациентов с когнитивными нарушениями описано несколько типов изменений функциональных взаимодействий в нейронных сетях, которые, вероятно, являются результатом гетерогенных процессов, лежащих в основе снижения когнитивной функции. Показатели изменений нейросетевых взаимодействий, полученные разными группами исследователей, варьируют в широком диапазоне. Описано как минимум два подтипа когнитивных синдромов при БП [110]: (1) фронто-стриарный, характеризующийся дефицитом внимания и исполнительных функций и связанный с дисфункцией дофаминергической системы, обусловленный потерей нейронов черной субстанции; и (2) задне-кортикальный, характеризующийся дефицитом зрительно-пространственных функций, памяти и речи и связанный с дисфункцией недофаминергической системы и наличием телец Леви в определенных областях неокортекса. В соответствии с «гипотезой двойного синдрома» при БП [111], показано, что подтипы КН могут

быть обусловлены специфическими изменениями в ФВ. Так, у БП-пациентов с задне-кортикальным дефицитом повышена внутрисетевая когерентность в базальных ганглиях, тогда как у пациентов с фронто-стриарным дефицитом снижена как внутрисетевая, так и межсетевая когерентность. Эти сети включают сенсомоторные исполнительные нейросети внимания, базальные ганглии и фронто-теменные, отличающиеся по характеристикам от таковых у здоровых людей, когнитивно-сохранных БП-пациентов и пациентов с задне-кортикальным подтипом [112]. Предполагается, что неодинаковость фенотипов ФВ может быть использована для идентификации конкретных когнитивных подтипов.

В клинических исследованиях с применением фМРТ у пациентов с недавно диагностированной БП и характеризующихся как когнитивно-сохранные, либо с умеренными когнитивными нарушениями, различия были обнаружены между обеими группами пациентов и контрольной группой при изучении нейронных сетей, связанных с моторным контролем (моторная кора), пространственным вниманием и визуальным восприятием [108]. При анализе магнито-энцефалограмм обнаружено, что у пациентов с БП, не получавших медикаментозное лечение, уменьшается эффективность рабочей памяти (т.е. точность), а также нарушается функциональная связь между левой нижне-фронтальной корой и левой надмаргинальной-верхней височной корами в фазе кодирования и обработки рабочей информации. Более того, при БП ослабевают нейронные взаимодействия между префронтальными исполнительными нейросетями и центрами временного хранения слов в верхней височной коре во время фазы кодирования стимула, что может лежать в основе сниженной функции рабочей памяти [113].

Анализ сетевых отношений с помощью фМРТ показал, что при тестировании исполнительной функции у пациентов с БП ослабевала функциональная связь базальных ганглиев с кортикальными нейросетями (префронтальными, премоторной и предклиновидной областями), что сопровождалось ухудшением результатов при выполнении когнитивных задач [114]. В метааналитическом обзоре рассмотрены результаты 17 исследований с участием БП-пациентов, имевших когнитивные нарушения. Было обследовано 222 пациента с умеренными когнитивными нарушениями, 68 пациентов с деменцией, 289 пациентов без когнитивных нарушений; контрольную группу составили 353 здоровых человека. Установле-

но, что когнитивные нарушения при БП связаны с уменьшением функциональной когерентности в нейросетях, имеющих отношение к обучению и памяти. Авторы предположили, что специфические изменения во внутри-региональных и межрегиональных функциональных отношениях способствуют, вероятно, снижению когнитивных функций у БП-пациентов и могут стать биомаркером когнитивных нарушений при БП [115].

Недавние разработки в области функциональной нейрохирургии при двигательных расстройствах и результаты внедрения новых электрофизиологических методов показали особую роль осцилляций в α -, β - и γ -диапазонах в мозговой активности при болезни Паркинсона. Появление осцилляторной активности в нескольких частотных диапазонах и их кросс-частотные взаимодействия в пространственно разделенных базально-таламо-кортикальных нейросетях могут быть связаны с различными компонентами клинических нарушений как моторных, так и немоторных. Понимание различий их характеристик приведет к улучшению вмешательств при терапии БП (таких как глубокая стимуляция мозга), адаптированных к конкретным компонентам клинических нарушений и связанных с ними пространственных и спектральных признаков [116].

При изучении событийной (event-related, ER) мощности в электроэнцефалограмме (ЭЭГ) в частотно-временном диапазоне у четырех групп пациентов — БП с когнитивными нарушениями и без них, БП с деменцией и у здоровых людей — установлено, что снижение синхронизации в дельта-диапазоне, связанное с событием, отражающим ухудшение способности обработки информации, характерно для когнитивных нарушений любой этиологии при БП. Снижение ER-синхронизации в β -диапазоне, связанное с событием, отражающим дефицит двигательной функции, было характерно для всех БП-пациентов. Снижение ER-синхронизации в α -диапазоне, связанное с событием, характерным для наличия зрительных галлюцинаций, обнаружено при деменции. Эти результаты показывают, что специфические изменения частотных паттернов осцилляторной активности способны отражать определенные клинические симптомы и являются потенциальным маркером сетевой дисфункции при БП [117].

В работах, связанных с изучением паттернов функциональной когерентности в ЭЭГ БП-пациентов с умеренными когнитивными нарушениями, показано снижение ФВ в задних отделах коры в β -частотах и дельта-частотах

с генерализованным распределением в мозге. У пациентов с БП, по сравнению со здоровыми людьми, обнаружены более низкие коэффициенты кластеризации в α -диапазоне и укороченная длительность эпизодов в дельта- и тета-диапазонах. Кроме того, у пациентов с КН изменения исполнительской функции и рабочей памяти существенно коррелировали с синхронизацией активности в β -диапазоне [118]. При анализе нейронной синхронизации и когерентности в ЭЭГ пациентов с КН и без них количественная региональная когерентность с использованием фазовых отношений была получена для каждого диапазона частот, при этом изменения когнитивной функции

оценивались для всего мозга. Выявлено, что степень когнитивных нарушений связана со снижением когерентности в α -диапазоне в корковых сетях головного мозга. Региональная когерентность в левой, но не в правой фронтально-теменной области показала наиболее высокую корреляцию с показателями когнитивных функций. Результаты указывают на снижение эффективности функционирования мозга и сложную клиническую картину нарушения нейронной синхронизации при различных типах когнитивной дисфункции [119].

Приведенная ниже таблица кратко демонстрирует вероятные механизмы КН, наблюдаемых при БП.

Механизмы, предположительно вносящие вклад в развитие когнитивных нарушений при болезни Паркинсона

Вероятные механизмы патологии	Исследуемые маркеры	Ссылки
Изменение конформационной структуры синаптических белков	α -синуклеин	15, 29–32, 121
	предшественник бета-амилоида (APP)	33–35
	нейрогранин	36, 39, 40
	SNAP25	37–40
	дегликаза DJ-1, паркин, киназа PINK1	41, 42
	комбинация агрегатов α -синуклеина и бляшек бета-амилоида	42–45
Нарушение синаптической передачи	холинергическая система	49–54
	норадренергическая и серотонинергическая системы	54–59
Дисфункция митохондрий/окислительный стресс	число митохондрий в пресинапсе, число активных зон, окислительно-восстановительный потенциал	61–64
	уровень митохондриальной ДНК в префронтальной коре	68
Метаболические нарушения	метаболизм глюкозы, метаболизм гликолипидов	70–76, 79
	инсулин/инсулиноподобный фактор роста	81–84
Структурные нарушения в мозге	нейронная дегенерация/атрофия мозговой ткани	85–88
Нейровоспаление и нейротрофические факторы	микроглия/цитокины	93–95
	ростовые факторы	99–105
Нарушения функциональных нейросетевых взаимодействий	функциональное взаимодействие/функциональная когерентность (фМРТ)	108–110
	осцилляции в α -, β - и γ -диапазонах	117–119

ИССЛЕДОВАНИЕ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ НА МОДЕЛЯХ БП У ЖИВОТНЫХ

Модели нейродегенеративных заболеваний у животных — важный инструмент для изучения механизмов их развития у человека. Существуют генетические (трансгенные) и негенетические (нейротоксические) модели БП, воспроизводящие спорадическую форму БП. Генетические модели удобны для изучения так называемой семейной формы БП, в частности, конкретных молекулярных мишеней нейронной дегенерации при этом заболевании. Разработаны также модели: (1) крыс и мышей с внутримозговым введением нейротоксина 6-OHDA и (2) грызунов (с внутримозговым) и приматов (с внутривенным) введением нейротоксина МРТР. Другие модели — ротеноновая и синуклеиновая, получили меньшее распространение.

Когнитивные нарушения у животных с генетическими моделями БП. У трансгенных мышей (Thy1)-h[A30P]αSYN), экспрессирующих мутантный α-синуклеин, формирующий фибриллы, оценивали когнитивные нарушения в водном лабиринте Морриса и в тесте активного избегания. В возрасте 4 месяца поведение трансгенных мышей не отличалось от контрольных; однако в 12 месяцев выполнение обеих задач у них было нарушено. После завершения когнитивных тестов ткани мозга были взяты для анализа. В отличие от 4-месячных животных, у 12-месячных трансгенных мышей обнаружена α-синуклеинопатия в нескольких областях мозга, в частности, в центральном ядре миндалевидного тела и соматосенсорной коре [120]. Известно, что миндалина критически вовлечена в процесс обучения активного избегания [121], а центральное ядро миндалины является местом α-синуклеинопатии у людей при БП [32]. Таким образом, фибриллизация α-Син в определенном возрасте в некоторых областях мозга положительно коррелирует со снижением когнитивных функций, а на моделях трансгенных мышей она может имитировать деменцию с тельцами Леви, наблюдаемую при БП у человека.

На генетических моделях у мышей показано, что сочетание двух протеинопатий (отложения α-Син и Aβ) имеет аддитивный эффект [43]. В частности, для изучения механизмов развития БП, сопровождаемой в ряде случаев признаками БА, использовали линии трансгенных мышей: (1) с экспрессией в нейронах α-Син человека (hSYN), (2) с экспрессией Aβ, образуемых из предшественника APP (hAPP) и (3) с экспрессией двух фак-

торов (hSYN/hAPP) — за счет скрещивания мышей обеих линий [43]. Выявлено, что церебральные уровни hSYN, как правило, были выше у мышей hSYN/hAPP, чем у hSYN-мышей. Некоторые из этих включений были фибриллярными у мышей hSYN/hAPP, тогда как у мышей hSYN все включения были аморфными. Таким образом, присутствие APP/Aβ способствует повышению уровня и фибриллизации α-Син. При тестировании двигательной активности на ротароде у мышей hSYN/hAPP в возрасте 6 месяцев регистрировался двигательный дефицит, в то же время у hSYN- и hAPP-мышей он не был обнаружен. В возрасте 12 месяцев двигательные нарушения наблюдались у мышей hSYN/hAPP и hSYN, но не у hAPP-мышей. Вероятно, hAPP/Aβ ускоряет развитие hSYN-зависимого двигательного дефицита у трансгенных мышей. Исследование когнитивного поведения этих мышей в водном лабиринте Морриса в возрасте 6 месяцев показало, что все группы одинаково хорошо выполняли тест с видимой платформой. Это свидетельствует, что моторный дефицит у мышей линии hSYN/hAPP не препятствует нормальному выполнению задач. В сеансах со скрытой платформой у мышей hSYN/hAPP и hAPP отмечен значительный дефицит в обучении, в то время как у hSYN-мышей этого не наблюдалось. Однако в возрасте 12 месяцев у мышей линии hSYN дефицит пространственной памяти проявился [43]. Такая динамика развития и прогрессирования патологических симптомов в hSYN-группе мышей в целом соответствует развитию симптоматики БП у человека.

Когнитивные нарушения у животных на модели спорадической формы БП. Важные результаты получены в работе Schneider и Kowolowski [122] на обезьянах (макаках), которые наиболее близки по характеру симптоматики и динамике ее развития к БП человека (по характеру прогрессирования симптомов). Авторы исследовали влияние токсина МРТР в низких дозах на пространственную рабочую память, требующую включения внимания, при тестировании отсроченной реакции и отсроченного чередования, а также распознавании зрительных образов. Все задачи выполнялись с помощью сенсорных экранов, на которые подавались цветные сигналы, требующие ответных реакций. Обнаружено, что у обезьян после хронического (5–13 месяцев) воздействия малых доз МРТР никогда не развивались двигательные нарушения. Однако у всех животных выявлен когнитивный дефицит: нарушение отсроченных реакций и отсроченного чередования, в то время как способность распознавания

зрительных образов не ухудшалась [122]. Таким образом, было показано, что дефицит внимания и рабочей памяти не зависит от моторного дефицита. Эти типы КН, отражающие дисфункцию фронтальных долей неокортекса и/или стриатума [123], сходны с таковыми, описанными у пациентов с БП [13, 18, 19, 32, 45, 124]. На этой же модели (у макак с односторонними двигательными нарушениями) наблюдались нарушения памяти в задачах с извлечением объекта или пищевого вознаграждения из коробки, находящейся за пределами клетки [125].

У мышей на модели с введением МРТР в экспериментах в водном лабиринте Морриса показано значительное нарушение процесса обучения (отсутствие сокращения пути к невидимой платформе при повторяющихся сеансах) [126] и долговременной памяти (при старте из нового исходного положения через 24 часа) [127]. Можно предположить, что дефицит дофамина в мозге нарушает зависящие от гиппокампа когнитивные функции. Известно, что дегенерация дофаминергических нейронов в черной субстанции может приводить к истощению запасов дофамина не только в стриатуме [128], но и в гиппокампе [129]. У МРТР-крыс нарушались как рабочая, так и долговременная память (по результатам теста в водном лабиринте Морриса) [130]. Выявлены также изменения в тестах на эпизодически-подобную память и в тесте на распознавание объектов [46], в задачах на пассивное избегание и социальное распознавание [131, 132]. У 6-OHDA-крыс выявлен значительный дефицит при выполнении задач на устойчивое внимание для получения вознаграждения [125].

Несмотря на многочисленные данные, полученные в исследованиях последних лет, сложность механизмов возникновения и развития БП и сопровождающих ее КН, не позволяет предложить надежные методы лечения, которое в настоящее время ограничивается временным устранением симптомов БП. Поэтому концепция нейропротекции, предусматривающая предотвращение гибели дофаминергических нейронов и, следовательно, замедление или остановку прогрессирования болезни, кажется многообещающей.

МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ БП

Болезнь Паркинсона — гетерогенное заболевание, вызывающее не только двигательную дисфункцию, но и когнитивные, психические, вегетативные и сенсорные нарушения. При-

мерно от 60% до 80% людей с БП испытывают когнитивные нарушения, которые влияют на качество их жизни. Снижение когнитивных функций является основным признаком заболевания и часто может проявляться до появления двигательных симптомов. Понимание патофизиологии, лежащей в основе этих симптомов, имеет важное значение для разработки целевых терапевтических стратегий.

В настоящее время лечение БП является симптоматическим и направлено на устранение двигательных (тремор, ригидность, брадикинезия) и немоторных нарушений (включая ухудшение когнитивных способностей). Терапия препаратами леводопы, предшественника дофамина, или агонистами дофаминергических рецепторов обычно помогает при возникающих в начале болезни двигательных нарушениях. Устранение немоторной симптоматики требует использования недофаминергических средств (например, селективных ингибиторов обратного захвата серотонина — при психических нарушениях, ингибиторов холинэстеразы — при когнитивных расстройствах). Реабилитационная терапия и физические упражнения дополняют медикаментозное лечение. Отметим, что на сегодняшний день нет препаратов, способных излечить или замедлить прогрессирование заболевания и когнитивных нарушений при БП, поэтому их создание остается приоритетом для исследователей.

Лечение когнитивных и нейропсихиатрических нарушений при БП плохо изучено, а терапевтические результаты неудовлетворительны. Механизмы, лежащие в основе снижения когнитивных функций при БП, остаются в значительной степени неясными. Наличие дефицита нейротрансмиттерных связей позволяет определить наиболее важные терапевтические цели, а дисфункция дофаминергической, холинергической, норадренергической и серотонинергической систем также имеет значение; нарушение каждой из них может быть причиной симптомов болезни Паркинсона [133].

Дофаминергические препараты (карбидопа-леводопа, агонисты дофамина) помогают при двигательной дисфункции, но могут иметь потенциальные когнитивные побочные эффекты [134]. Фармакологическое устранение когнитивных нарушений основано на применении симптоматически активных веществ, используемых также при БА. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы (ривастигмин) и, возможно, мемантин, NMDA-антагонист [135–137], обеспечивают умеренное и временное ослабление симптомов деменции и улучшение когнитивных функций, а также психотических нару-

шений, как правило, без отрицательного воздействия на двигательные функции. Агонисты дофамина, селективные агонисты серотонина и ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина имеют некоторый положительный эффект при депрессии, связанной с БП. Некоторые атипичные антипсихотические препараты позволяют устранять галлюцинации, бред и поведенческие проблемы с минимальным вредным воздействием на двигательные функции и познавательные способности, однако их безопасность для пожилых пациентов недавно поставлена под сомнение [138–140].

Отметим, что немоторные нарушения, включая когнитивные, нервно-психические нарушения, расстройства сна, вегетативные и сенсорные нарушения, вызванные внутренней патологией БП или побочными эффектами приема лекарств, привлекают все большее внимание из-за их негативного влияния на качество жизни. Симптоматическая и модифицирующая заболевание роль физических упражнений, когнитивной тренировки и нейромодуляции когнитивных нарушений при БП находятся в стадии изучения. В настоящее время нейропротекторные методы лечения широко изучаются в доклинических исследованиях. Кроме того, нефармацевтические методы лечения, в том числе глубокая стимуляция мозга (DBS), генная терапия, клеточная заместительная терапия и некоторые дополнительные методы лечения, такие как йога, традиционные травы и молекулярная целевая терапия, также считаются эффективными альтернативами классической фармацевтики [141].

Мультидисциплинарные подходы к когнитивным нарушениям с эффективным лечением сопутствующих заболеваний, правильной реабилитацией и поддержанием здорового образа жизни в дополнение к фармацевтическому лечению могут улучшить качество жизни пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре представлен анализ патологических процессов в мозге, лежащих в основе возникновения когнитивных нарушений при БП. Информация о механизмах, лежащих в основе таких нарушений при БП, получена по результатам клинко-патологических исследований с применением методов визуализации, электрофизиологических и генетических подходов и исследований на моделях БП у животных. Показано, что в основе дефицита исполнительных функций, ослабления внимания и памяти, а также зрительно-пространственных нарушений лежат такие патологические процессы в мозге, как изменение конформационной структуры синаптических белков, нейротрансмиттерная патология, дисфункция митохондрий и окислительный стресс, метаболические и структурные нарушения в мозге, нейровоспаление, дисфункция нейротрофических факторов, а также нарушения нейросетевых взаимодействий. Мы полагаем, что лучшее понимание патогенеза болезни Паркинсона, связанное с созданием новых лабораторных моделей БП и поиском биомаркеров прогрессирования заболевания, увеличат вероятность появления новых методов лечения когнитивных нарушений при болезни Паркинсона.

Вклад авторов. В.Ф.К. — идея написания и редактирование обзора. Все авторы внесли равный вклад в написание рукописи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-01025-23-01.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Обзор написан с соблюдением этических норм, принятых РФ и международными организациями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левин О. С., Федорова Н. В. (2009) *Болезнь Паркинсона*, Издательство Orion Pharma, Москва.
2. Lees, A. J., Hardy, J., and Revesz, T. (2009) Parkinson's disease, *Lancet*, **373**, 2055–2066, doi: 10.1016/s0140-6736(09)60492-x.
3. Brazhnik, E., Novikov, N., McCoy, A. J., Cruz, A. V., and Walters, J. R. (2014) Functional correlates of exaggerated oscillatory activity in basal ganglia output in hemiparkinsonian rats, *Exp. Neurol.*, **26**, 1563–1577, doi: 10.1016/j.expneurol.2014.07.010.
4. Brazhnik, E., Novikov, N., McCoy, A. J., Ilieva, N. M., Ghraib, M. W., and Walters, J. R. (2021) Early decreases in cortical mid-gamma peaks coincide with the onset of motor deficits and precede exaggerated beta build-up in rat models for Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **155**, 105393, doi: 10.1016/j.nbd.2021.105393.
5. Novikov, N. I., Brazhnik, E. S., and Kichigina, V. F. (2019) Application of opto- and chemogenetic methods to study motor disorders in Parkinson's disease

- [in Russian], *Modern Technologies in Medicine*, **11**, 150-163, doi: 10.17691/stm2019.11.2.21.
6. Morozova, M. V., Brazhnik, E. S., Mysyn, I. E., Popova, L. B., and Novikov, N. I. (2021) Contribution of the outer part of the pallidum to the oscillatory activity of motor neural networks in experimental model of Parkinson's disease [in Russian], *J. Higher Nerve Act.*, **72**, 103-118, doi: 10.31857/S0044467722010063.
 7. Ugryumov, M. V. (2015) Development of preclinical diagnostics and preventive treatment of neurodegenerative diseases, *J. Neurol. Psychiatry*, **11**, 4-14, doi: 10.17116/jnevro20151151114-14.
 8. Volles, M. J., and Lansbury, P. T. Jr. (2003) Zeroing in on the pathogenic form of α -synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease, *Biochemistry*, **42**, 7871-7878, doi: 10.1021/bi030086j.
 9. Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease, *Science*, **302**, 819-822, doi: 10.1126/science.1087753.
 10. Pastukhov, Yu. F., Ekimova, I. V., and Chesnokova A. Yu. (2014) Molecular mechanisms of the pathogenesis of Parkinson's disease and prospects for preventive therapy, in: *Neurodegenerative Diseases: From the Genome to the Whole Organism* (Ugryumov, M. V., ed), Vol. 1, pp. 309-348, Nauka, Moscow.
 11. Liepelt-Scarfone, I., Ophey, A., and Kalbe, E. (2022) Cognition in prodromal Parkinson's disease, *Prog. Brain Res.*, **269**, 93-111, doi: 10.1016/bs.pbr.2022.01.003.
 12. Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., and Seitelberger, F. (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations, *J. Neurol. Sci.*, **20**, 415-455, doi: 10.1016/0022-510x(73)90175-5.
 13. Weil, R. S., Costantini, A. A., and Schrag, A. E. (2018) Mild cognitive impairment in Parkinson's disease-what is it? *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **18**, 17, doi: 10.1007/s11910-018-0823-9.
 14. Goldman, J. G., and Sieg, E. (2020) Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease, *Clin. Geriatr. Med.*, **36**, 365-377, doi: 10.1016/j.cger.2020.01.001.
 15. Aarsland, D., Brønnick, K., and Fladby, T. (2011) Mild cognitive impairment in Parkinson's disease, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **11**, 371-378, doi: 10.1007/s11910-011-0203-1.
 16. Svenningsson, P., Westman, E., Ballard, C., and Aarsland, D. (2012) Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnosis, biomarkers, and treatment, *Lancet Neurol.*, **11**, 697-707, doi: 10.1016/S1474-4422(12)70152-7.
 17. Blair, C. (2017) Educating executive function, *Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci.*, **8**, e1403, doi: 10.1002/wcs.1403.
 18. Sagar, H. J., Sullivan, E. V., Gabrieli, J. D. E., Corkin, S., and Growdon, J. H. (1988) Temporal ordering and short-term memory deficits in Parkinson's disease, *Brain*, **111**, 525-539, doi: 10.1093/brain/111.3.525.
 19. Beato, R., Levy, R., Pillon, B., Vidal, C., Du Montcel, S. T., Deweer, B., Bonnet, A. M., Houeto, J. L., Dubois, B., and Cardoso, F. (2008) Working memory in Parkinson's disease patients: clinical features and response to levodopa, *Arq. Neuropsiquiatr.*, **66**, 147-151, doi: 10.1590/s0004-282x2008000200001.
 20. Rottschy, C., Kleiman, A., Dogan, I., Langner, R., Mirzazade, S., Kronenburger, M., Werner, C., Shah, N. J., Schulz, J. B., Eickhoff, S. B., and Reetz, K. (2013) Diminished activation of motor working memory networks in Parkinson's disease, *PLoS One*, **8**, e61786, doi: 10.1371/journal.pone.0061786.
 21. Cooper, J. A., Sagar, H. J., Jordan, N., Harvey, N. S., and Sullivan, E. V. (1991) Cognitive impairment in early untreated Parkinson's disease and its relationship to motor disability, *Brain*, **114**, 2095-2122, doi: 10.1093/brain/114.5.2095.
 22. Kamei, S. (2012) Electroencephalogram and event-related potential analyses in Parkinson's disease, *Brain Nerve*, **64**, 433-443.
 23. Wang, X. P., Sun, B. M., and Ding, H. L. (2009) Changes of procedural learning in Chinese patients with non-demented Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.*, **449**, 161-163, doi: 10.1016/j.neulet.2008.10.086.
 24. Mesulam, M.-M. (2002) The frontal lobes: transcending the default mode through contingent encoding, in *Principles of Frontal Lobe Function* (Stuss, D. T., Knight, R. T., eds), Oxford University Press, Oxford/New York, doi: 10.1093/acprof:oso/9780195134971.003.0002.
 25. Muslimovic, D., Post, B., Speelman, J. D., and Schmand, B. (2007) Motor procedural learning in Parkinson's disease, *Brain*, **130**, 2887-2897, doi: 10.1093/brain/awm211.
 26. Pereira, J. B., Svenningsson, P., Weintraub, D., Brønnick, K., Lebedev, A., Westman, E., and Aarsland, D. (2014) Initial cognitive decline is associated with cortical thinning in early Parkinson's disease, *Neurology*, **82**, 2017-2025, doi: 10.1212/WNL.0000000000000483.
 27. Bellucci, A., Mercuri, N. B., Venneri, A., Faustin, G. J., Longhena, F., Pizzi, M., Missale, C., and Spano, P. (2016) Review: Parkinson's disease: from synaptic loss to connectome dysfunction, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **42**, 77-94, doi: 10.1111/nan.12297.
 28. Deng, I., Corrigan, F., Zhai, G., Zhou, X.-F., and Bobrovskaya, L. (2020) Lipopolysaccharide animal models of Parkinson's disease: recent progress and relevance to clinical disease, *Brain Behav. Immun. Health*, **4**, 100060, doi: 10.1016/j.bbih.2020.100060.
 29. Sun, F., Salinas, A. G., Filser, S., Blumenstock, S., Medina-Luque, J., Herms, J., and Sgobio, C. (2022) Impact of α -synuclein spreading on the nigrostriatal dopaminergic pathway depends on the onset of the pathology, *Brain Pathol.*, **32**, e13036, doi: 10.1111/bpa.13036.

30. Schulz-Schaeffer, W. J. (2010) The synaptic pathology of α -synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia, *Acta Neuropathol.*, **120**, 131-143, doi: 10.1007/s00401-010-0711-0.
31. Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R. A., Jansen, E. N., Bohl, J., and Jellinger, K. (1994) Amygdala pathology in Parkinson's disease, *Acta Neuropathol.*, **88**, 493-500, doi: 10.1007/BF00296485.
32. Marui, W., Iseki, E., Nakai, T., Miura, S., Kato, M., Uéda, K., and Kosaka, K. (2002) Progression and staging of Lewy pathology in brains from patients with dementia with Lewy bodies, *J. Neurol. Sci.*, **195**, 153-159, doi: 10.1016/S0022-510X(02)00006-0.
33. Blennow, K., and Zetterberg, H. J. (2015) Amyloid and Tau biomarkers in CSF, *Prev. Alzheimers Dis.*, **2**, 46-50, doi: 10.14283/jpad.2015.41.
34. Cirrito, J. R., Kang, J. E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., Bu, G., Mennerick, S., and Holtzman, D. M. (2008) Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta *in vivo*, *Neuron*, **58**, 42-51, doi: 10.1016/j.neuron.2008.02.003.
35. Dionísio, P. A., Amaral, J. D., and Rodrigues, C. M. P. (2021) Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease, *Ageing Res Rev.*, **67**, 101263, doi: 10.1016/j.arr.2021.101263.
36. Kvartsberg, H., Portelius, E., Andreasson, U., Brinkmalm, G., Hellwig, K., Lele, L. N., Kornhuber, J., Hansson, O., Minthon, L., Spitzer, P., Maler, J. M., Zetterberg, H., Blennow, K., and Lewczuk, P. (2015) Characterization of the postsynaptic protein neurogranin in paired cerebrospinal fluid and plasma samples from Alzheimer's disease patients and healthy controls, *Alzheimers Res. Ther.*, **7**, 40, doi: 10.1186/s13195-015-0124-3.
37. Yasuda, T., Nakata, Y., Choong, C.-J., and Mochizuki, H. (2013) Neurodegenerative changes initiated by presynaptic dysfunction, *Transl. Neurodegener.*, **2**, 1-5, doi: 10.1186/2047-9158-2-16.
38. Agliardi, C., Meloni, M., Guerini, F. R., Zanzottera, M., Bolognesi, E., Baglio, F., and Clerici, M. (2021) Oligomeric α -Syn and SNARE complex proteins in peripheral extracellular vesicles of neural origin are biomarkers for Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **148**, 105185, doi: 10.1016/j.nbd.2020.105185.
39. Desikan, R. S., Segonne, F., Fischl, B., Quinn, B. T., Dickerson, B. C., Blacker, D., Buckner, R. L., Dale, A. M., Maguire, R. P., Hyman, B. T., Albert, M. S., and Killiany, R. J. (2006) An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest, *NeuroImage*, **31**, 968-980, doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.01.021.
40. Hessen, E., Stav, A. L., Auning, E., Selnes, P., Blomsø, L., Holmeide, C. E., Johansen, K. K., Eliassen, C. F., Reinvang, I., Fladby, T., and Aarsland, D. J. (2016) Neuropsychological profiles in mild cognitive impairment due to Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Parkinsons Dis.*, **6**, 413-421, doi: 10.3233/JPD-150761.
41. Picconi, B., Piccoli, G., and Calabresi, P. (2012) Synaptic dysfunction in Parkinson's disease, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **970**, 553-572, doi: 10.1007/978-3-7091-0932-8_24.
42. Feany, M. B., and Bender, W. W. (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease, *Nature*, **404**, 394-398, doi: 10.1038/35006074.
43. Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Sagara, Y., Mallory, M., Hashimoto, M., and Mucke, L. (2001) beta-Amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12245-12250, doi: 10.1073/pnas.211412398.
44. Zhang, W., Zhang, Q., Yang, Q., Liu, P., Sun, T., Xu, Y., Qian, X., Qiu, W., and Ma, C. (2020) Contribution of Alzheimer's disease neuropathologic change to the cognitive dysfunction in human brains with Lewy body-related pathology, *Neurobiol. Aging*, **91**, 56-65, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.02.022.
45. Ryman, S. G., Yutsis, M., Tian, L., Henderson, V. W., Montine, T. J., Salmon, D. P., Galasko, D., and Poston, K. L. (2021) Cognition at each stage of lewy body disease with co-occurring Alzheimer's disease pathology, *J. Alzheimers Dis.*, **80**, 1243-1256, doi: 10.3233/JAD-201187.
46. Burton, E. J., McKeith, I. G., Burn, D. J., Williams, D., and O'Brien, J. T. (2004) Cerebral atrophy in Parkinson's disease with and without dementia: a comparison with Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and controls, *Brain*, **127**, 791-800, doi: 10.1093/brain/awh088.
47. Kulisevsky, J., Avila, A., Barbanoj, M., Antonijoan, R., Berthier, M. L., and Gironell, A. (1996) Acute effects of levodopa on neuropsychological performance in stable and fluctuating Parkinson's disease patients at different levodopa plasma levels, *Brain*, **119**, 2121-2132, doi: 10.1093/brain/119.6.2121.
48. Halliday, G. M., Leverenz, J. B., Schneider, J. S., and Adler, C. H. (2014) The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, **29**, 634-650, doi: 10.1002/mds.25857.
49. Bohnen, N. I., Kaufer, D. I., Hendrickson, R., Ivancov, L. S., Lopresti, B. J., Constantine, G. M., Mathis, C. A., Davis, J. G., Moore, R. Y., and DeKosky, S. T. (2006) Cognitive correlates of cortical cholinergic denervation in Parkinson's disease and parkinsonian dementia, *J. Neurol.*, **253**, 242-247, doi: 10.1007/s00415-005-0971-0.
50. Gratwicke, J., Jahanshahi, M., and Foltyniec, T. (2015) Parkinson's disease dementia: a neural networks perspective, *Brain*, **138**, 1454-1476, doi: 10.1093/brain/awv104.

51. Kim, I., Shin, N.-Y., Bak, Y., Lee, P. H., Lee, S.-K., and Lim, S. M. (2017) Early-onset mild cognitive impairment in Parkinson's disease: altered corticopetal cholinergic network, *Sci. Rep.*, **7**, 2381, doi: 10.1038/s41598-017-02420-w.
52. Lee, D. J., Milosevic, L., Gramer, R., Sasikumar, S., Al-Ozzi, T. M., De Vloo, P., Dallapiazza, R. F., Elias, G. J. B., Cohn, M., Kalia, S. K., Hutchison, W. D., Fasano, A., and Lozano, A. M. (2019) Nucleus basalis of Meynert neuronal activity in Parkinson's disease, *J. Neurosurg.*, **132**, 574-582, doi: 10.3171/2018.11.JNS182386.
53. Ehrh, U., Broich, K., Larsen, J. P., Ballard, C., and Aarsland, D. (2010) Use of drugs with anticholinergic effect and impact on cognition in Parkinson's disease: a cohort study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, **81**, 160-165, doi: 10.1136/jnnp.2009.186239.
54. Kitchigina, V., Vankov, A., Harley, C., and Sara, S. J. (1997) Novelty-elicited, noradrenaline-dependent enhancement of excitability in the dentate gyrus, *Eur. J. Neurosci.*, **9**, 41-47, doi: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01351.x.
55. Kitchigina, V. F., Kutyreva, E. V., and Brazhnik, E. S. (2003) Modulation of theta rhythmicity in the medial septal neurons and hippocampal EEG in the awake rabbit via actions at noradrenergic α_2 -receptors, *Neuroscience*, **120**, 509-521, doi: 10.1016/s0306-4522(03)00331-2.
56. Bari, A., and Robbins, T. W. (2013) Noradrenergic versus dopaminergic modulation of impulsivity, attention and monitoring behaviour in rats performing the stop-signal task: possible relevance to ADHD, *Psychopharmacology*, **230**, 89-111, doi: 10.1007/s00213-013-3141-6.
57. Callahan, P. M., Callahan, P. M., Plagenhoef, M. R., Blake, D. T., and Terry, A. V. Jr. (2019) Atomoxetine improves memory and other components of executive function in young-adult rats and aged rhesus monkeys, *Neuropharmacology*, **155**, 65-75, doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.05.016.
58. Varrone, A., Svenningsson, P., Marklund, P., Fatouros-Bergman, H., Forsberg, A., Halldin, C., Nilsson, L.-G., and Farde, L. (2015) 5-HT1B receptor imaging and cognition: a positron emission tomography study in control subjects and Parkinson's disease patients, *Synapse*, **69**, 365-374, doi: 10.1002/syn.21823.
59. Ye, Z., Rae, C. L., Nombela, C., Ham, T., Rittman, T., Jones, P. S., Rodriguez, P. V., Coyle-Gilchrist, I., Regenthal, R., Altena, E., Housden, C. R., Maxwell, H., Sahakian, B. J., Barker, R. A., Robbins, T. W., and Rowe, J. B. (2016) Predicting beneficial effects of atomoxetine and citalopram on response inhibition in Parkinson's disease with clinical and neuroimaging measures, *Hum. Brain Mapp.*, **37**, 1026-1037, doi: 10.1002/hbm.23087.
60. Mattson, M. P., Gleichmann, M., and Cheng, A. (2008) Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders, *Neuron*, **60**, 748-766, doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.010.
61. Chaturvedi, R. K., and Beal, M. F. (2008) Mitochondrial approaches for neuroprotection, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1147**, 395-412, doi: 10.1196/annals.1427.027.
62. Isobe, C., and Abe, T. Y. (2010) Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process, *Neurosci. Lett.*, **469**, 159-163, doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.065.
63. Vijayanathan, Y., Lim, F. T., Lim, S. M., Vijayanathan, Y., Lim, F. T., Lim, S. M., Long, C. M., Tan, M. P., Majeed, A. B. A., and Kalavathy, R. (2017) 6-OHDA lesioned adult zebrafish as a useful Parkinson's disease model for dopaminergic neuroregeneration, *Neurotoxicity Res.*, **32**, 496-508, doi: 10.1007/s12640-017-9778-x.
64. Robea, M. A., Balmus, I. M., Ciobica, A., Strungaru, S., Plavan, G., Gorgan, L. D., Savuca, A., and Nicoara, M. (2020) Parkinson's disease-induced zebrafish models: focussing on oxidative stress implications and sleep processes, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2020**, 1370837, doi: 10.1155/2020/1370837.
65. Monzio Compagnoni, G., Di Fonzo, A., Corti, S., Comi, G. P., Bresolin, N., and Masliah, E. (2020) The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: the lesson from Alzheimer's disease and Parkinson's disease, *Mol. Neurobiol.*, **57**, 2959-2980, doi: 10.1007/s12035-020-01926-1.
66. Johnson, J., Mercado-Ayon, E., Mercado-Ayon, Y., Dong, Y. N., Halawani, S., Ngaba, L., and Lynch, D. R. (2021) Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases, *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108698, doi: 10.1016/j.abb.2020.108698.
67. Gatt, A. P., Duncan, O. F., Attems, J., Francis, P. T., Ballard, C. G., and Bateman, J. M. (2016) Dementia in Parkinson's disease is associated with enhanced mitochondrial complex I deficiency, *Movement Disorders*, **31**, 352-359, doi: 10.1002/mds.26513.
68. Cagin, U., Duncana, O. F., Gatt, A. P., Dionneb, M. S., Sweeney, S. T., and Batemana, J. M. (2015) Mitochondrial retrograde signaling regulates neuronal function, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **112**, E6000-E6009, doi: 10.1073/pnas.1505036112.
69. Lozza, C., Baron, J. C., Eidelberg, D., Mentis, M. J., Carbon, M., and Marie, R. M. (2004) Executive processes in Parkinson's disease: FDG-PET and network analysis, *Hum Brain Mapp.*, **22**, 236-245, doi: 10.1002/hbm.20033.
70. Huang, Y.-X., Zhang, Q.-L., Huang, C.-L., Wu, W.-Q., and Sun, J.-W. (2021) Association of decreased serum BDNF with restless legs syndrome in Parkinson's disease patients, *Front. Neurol.*, **12**, 734570, doi: 10.3389/fneur.2021.734570.

71. Eidelberg, D., Moeller, J. R., Dhawan, V., Spetsieris, P., Takikawa, S., Ishikawa, T., Chaly, T., Robeson, W., Margouleff, D., Przedborski, S., and Fahn, S. (1994) The metabolic topography of parkinsonism, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **14**, 783-801, doi: 10.1038/jcbfm.1994.99.
72. Borghammer, P. (2012) Perfusion and metabolism imaging studies in Parkinson's disease, *Dan. Med. J.*, **59**, B4466.
73. Firbank, M. J., Yarnall, A. J., Lawson, R. A., Duncan, G. W., Khoo, T. K., Petrides, G. S., O'Brien, J. T., Barker, R. A., Maxwell, R. J., Brooks, D. J., and Burn, D. J. (2017) Cerebral glucose metabolism and cognition in newly diagnosed Parkinson's disease: ICICLE-PD study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **88**, 310-316, doi: 10.1136/jnnp-2016-313918.
74. Van Laere, K., Santens, P., Bosman, T., De Reuck, J., Mortelmans, L., and Dierck, R. (2004) Statistical parametric mapping of 99mTc-ECD SPECT in idiopathic Parkinson's disease and multiple system atrophy with predominant parkinsonian features: correlation with clinical parameters, *J. Nucl. Med.*, **24**, 933-942.
75. Nobili, F., Morbelli, S., Arnaldi, D., Ferrara, M., Campus, C., Brugnolo, F., Mazzei, D., Mehrdad, N., Sambucetti, G., and Rodriguez, G. (2011) Radionuclide brain imaging correlates of cognitive impairment in Parkinson's disease, *J. Neurol. Sci.*, **310**, 31-35, doi: 10.1016/j.jns.2011.06.053.
76. Khomenko, Yu. G., Susin, D. S., Kataeva, G. V., Irishina, Yu. A., and Zavolokov, I. G. (2017) Features of cerebral glucose metabolism in patients with cognitive impairment in Parkinson's disease [in Russian], *J. Neurol. Psychiatry*, **5**, 46-51, doi: 10.17116/jnevro20171175146-51.
77. Rocher, A. B., Chapon, F., Blaizot, X., Baron, J.-C., and Chavoix, C. (2003) Resting-state brain glucose utilization as measured by PET is directly related to regional synaptophysin levels: a study in baboons, *NeuroImage*, **20**, 1894-1898.
78. Van Aalst, J., Ceccarini, J., Sunaert, S., Dupont, P., Koole, M., and Van Laere, K. (2021) *In vivo* synaptic density relates to glucose metabolism at rest in healthy subjects, but is strongly modulated by regional differences, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **41**, 1978-1987, doi: 10.1177/0271678X20981502.
79. Milyukhina, I. V., Khomenko, Yu. G., Gracheva, E. V., Kataeva, G. V., and Gromova, E. A. (2020) Cerebral glucose metabolism and cognitive impairment in trembling and akinetic rigid forms of Parkinson's disease [in Russian], *Neurol. Neuropsych. Psychosom.*, **12**, 42-48, doi: 10.14412/2074-2711-2020-6-42-48.
80. Yao, C., Niu, L., Fu, Y., Zhu, X., Yang, J., Zhao, P., Sun, X., Ma, Y., Li, S., and Li, J. (2022) Cognition, motor symptoms, and glycolipid metabolism in Parkinson's disease with depressive symptoms, *J. Neural Transm. (Vienna)*, **129**, 563-573, doi: 10.1007/s00702-021-02437-6.
81. Athauda, D., and Foltynie, T. (2016) Challenges in detecting disease modification in Parkinson's disease clinical trials, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **32**, 1-11, doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.07.019.
82. Yang, L., Wang, H., Liu, L., and Xie, A. (2018) The role of insulin/IGF-1/PI3K/Akt/GSK3 β signaling in Parkinson's disease dementia, *Front. Neurosci.*, **12**, 73, doi: 10.3389/fnins.2018.00073.
83. Spinelli, M., Fusco, S., and Grassi, C. (2019) Brain insulin resistance and hippocampal plasticity: mechanisms and biomarkers of cognitive decline, *Front. Neurosci.*, **13**, 788, doi: 10.3389/fnins.2019.00788.
84. Hölscher, C. (2019) Insulin signaling impairment in the brain as a risk factor in Alzheimer's disease, *Front. Aging Neurosci.*, **11**, 88, doi: 10.3389/fnagi.2019.00088.
85. Melzer, T. R., Watts, R., Macaskill, M. R., Pitcher, T. L., Livingston, L., Keenan, R. J., Dalrymple-Alford, J. C., and Anderson, T. J. (2012) Grey matter atrophy in cognitively impaired Parkinson's disease, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **83**, 188-194, doi: 10.1136/jnnp-2011-300828.
86. Pereira, J. B., Aarsland, D., Ginestet, C. E., Lebedev, A. V., Wahlund, L.-O., Simmons, A., Volpe, G., and Westman, E. (2015) Aberrant cerebral network topology and mild cognitive impairment in early Parkinson's disease, *Hum. Brain Mapp.*, **36**, 2980-2995, doi: 10.1002/hbm.22822.
87. Cummings, J. (1993) Frontal subcortical circuits and human behavior, *Arch. Neurol.*, **50**, 873-880, doi: 10.1001/archneur.1993.00540080076020.
88. Stav, A. L., Johansen, K. K., Auning, E., Kalheim, L. F., Selnes, P., Bjørnerud, A., Hessen, E., Aarsland, D., and Fladby, T. (2016) Hippocampal subfield atrophy in relation to cerebrospinal fluid biomarkers and cognition in early Parkinson's disease: a cross-sectional study, *N.P.J. Parkinson's Dis.*, **2**, 15030, doi: 10.1038/npjparkd.2015.30.
89. Stav, A. L., Aarsland, D., Johansen, K. K., Hessen, E., Auning, E., and Fladby, T. (2015) Amyloid- β and α -synuclein cerebrospinal fluid biomarkers and cognition in early Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **21**, 758-764, doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.04.027.
90. Parnetti, L., Castrioto, A., Chiasserini, D., Persichetti, E., Tambasco, N., El-Agnaf, O., and Calabresi, P. (2013) Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease, *Nat. Rev. Neurol.*, **9**, 131-140, doi: 10.1038/nrneurol.2013.10.
91. Alves, G., Bronnick, K., Aarsland, D., Blennow, K., Zetterberg, H., Ballard, C., Kurz, M. W., Andreasson, U., Tysnes, O.-B., Larsen, J. P., and Mulugeta, E. (2010) CSF amyloid- β and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's Disease: the Norwegian ParkWest study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **81**, 1080-1086, doi: 10.1136/jnnp.2009.199950.

92. Rocha, N. P., Teixeira, A. L., Scalzo, P. L., Barbosa, I. G., de Sousa, M. S., Morato, I. B., Vieira, E. L., Christo, P. P., Palotás, A., and Reis, H. J. (2014) Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors are associated with cognitive performance in Parkinson's disease, *Mov. Disord.*, **29**, 527-531, doi: 10.1002/mds.25752.
93. Fan, Z., Aman, Y., Ahmed, I., Chetelat, G., Landeau, B., Chaudhuri, K. R., Brooks, D. J., and Edison, P. (2015) Influence of microglial activation on neuronal function in Alzheimer's and Parkinson's disease dementia, *Alzheimers Dement.*, **11**, 608-621.e7, doi: 10.1016/j.jalz.2014.06.016.
94. Lindqvist, D., Hall, S., Surova, Y., Nielsen, H. M., Janelidze, S., Brundin, L., and Hansson, O. (2013) Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease – associations with depression, fatigue, and cognitive impairment, *Brain Behav. Immun.*, **33**, 183-189, doi: 10.1016/j.bbi.2013.07.007.
95. Aviles-Olmos, I., Limousin, P., Lees, A., and Foltynie, T. (2013) Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection, *Brain*, **136**, 374-384, doi: 10.1093/brain/aws009.
96. Komleva, Y., Chernykh, A., Lopatina, O., Gorina, Y., Lokteva, I., Salmina, A., and Gollasch, M. (2021) Inflamm-aging and brain insulin resistance: new insights and role of life-style strategies on cognitive and social determinants in aging and neurodegeneration, *Front. Neurosci.*, **14**, 618395, doi: 10.3389/fnins.2020.618395.
97. Petrou, M., Davatzikos, C., Hsieh, M., Foerster, B. R., Albin, R. L., Kotagal, V., Müller, M. L., Koeppe, R. A., Herman, W. H., Frey, K. A., and Bohnen, N. I. (2016) Diabetes, gray matter loss, and cognition in the setting of Parkinson disease, *Acad. Radiol.*, **23**, 577-581, doi: 10.1016/j.acra.2015.07.014.
98. Leverenz, J. B., Watson, G. S., Shofer, J., and Zabetian, C. P. (2011) Cerebrospinal fluid biomarkers and cognitive performance in non-demented patients with Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **17**, 61-64, doi: 10.1016/j.parkreldis.2010.10.003.
99. Lim, N. S., Swanson, C. R., Chong, H.-R., Unger, T. L., Xie, S. X., Weintraub, D., Marek, K., Stern, M. B., Siderowf, A., Trojanowski, J. Q., and Chen-Plotkin, A. S. (2016) Plasma EGF and cognitive decline in Parkinson's disease and Alzheimer's disease, *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **3**, 346-355, doi: 10.1002/acn3.299.
100. Pramanik, S. K., Sanphui, P., Das, A. K., Banerji, B., and Biswas, S. C. (2023) Small-molecule Cdc25A inhibitors protect neuronal cells from death evoked by NGF deprivation and 6-hydroxydopamine, *CS Chem. Neurosci.*, **14**, 1226-1237, doi: 10.1021/acschemneuro.2c00474.
101. Shimoke, K., and Chiba, H. (2001) Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutic application for Parkinson's disease, *J. Neurosci. Res.*, **63**, 402-409, doi: 10.1002/1097-4547(20010301)63:5<402::AID-JNR1035>3.0.CO;2-F.
102. Lorigados Pedre, L., Pavón Fuentes, N., Alvarez González, L., McRae, A., Serrano Sánchez, T., Blanco Lescano, L., and Macías González, R. (2002) Nerve growth factor levels in Parkinson's disease and experimental parkinsonian rats, *Brain Res.*, **952**, 122-127, doi: 10.1016/s0006-8993(02)03222-5.
103. Altar, C. A., Boylan, C. B., Jackson, C., Hershenov, S., Miller, J., Wiegand, S. J., Lindsay, R. M., and Hyman, C. (1992) Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11347-11351, doi: 10.1073/pnas.89.23.11347.
104. Sauer, H., Fischer, W., Nikkha, G., Wiegand, S. J., Brundin, P., Lindsay, R. M., and Björklund, A. (1993) Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts, *Brain Res.*, **626**, 37-44, doi: 10.1016/0006-8993(93)90560-A.
105. Hernández-Vara, J., Sáez-Francàs, N., Lorenzo-Bosquet, C., Corominas-Roso, M., Cuberas-Borràs, G., Pozo, S. L.-D., Carter, S., Armengol-Bellapart, M., and Castell-Conesa, J. (2020) BDNF levels and nigrostriatal degeneration in "drug naïve" Parkinson's disease patients. An "in vivo" study using I-123-FP-CIT SPECT, *Park. Relat. Disord.*, **78**, 31-35, doi: 10.1016/j.parkreldis.2020.06.037.
106. Huang, Y., Huang, C., and Yun, W. (2019) Peripheral BDNF/TrkB protein expression is decreased in Parkinson's disease but not in essential tremor, *J. Clin. Neurosci.*, **63**, 176-181, doi: 10.1016/j.jocn.2019.01.017.
107. Tessitore, A., Cirillo, M., and De Micco, R. (2019) Functional connectivity signatures of Parkinson's disease, *J. Parkinsons Dis.*, **9**, 637-652, doi: 10.3233/JPD-191592.
108. Peraza, L. R., Nesbitt, D., Lawson, R. A., Duncan, G. W., Yarnall, A. J., Khoo, T. K., Kaiser, M., Firbank, M. J., O'Brien, J. T., Barker, R. A., Brooks, D. J., Burn, D. J., and Taylor, J. P. (2017) Intra- and inter-network functional alterations in Parkinson's disease with mild cognitive impairment, *Hum Brain Mapp.*, **38**, 1702-1715, doi: 10.1002/hbm.23499.
109. Zhou, F., Tan, C., Song, C., Wang, M., Yuan, J., Liu, Y., Cai, S., Liu, Q., Shen, Q., Tang, Y., Li, X., and Liao, H. (2023) Abnormal intra- and inter-network functional connectivity of brain networks in early-onset Parkinson's disease and late-onset Parkinson's disease, *Front. Aging Neurosci.*, **15**, 1132723, doi: 10.3389/fnagi.2023.1132723.
110. Williams-Gray, C. H., Evan, J. R., Goris, A., Foltynie, T., Ban, M., Robbins, T. W., Foltynie, T., Ban, M., Robbins, T. W., Brayne, C., Kolachana, B. S., Weinberger, D. R., Sawcer, S. J., and Blennow, K.

- (2009) The distinct cognitive syndromes of Parkinson's disease: 5 year follow-up of the CamPaIGN cohort, *Brain*, **132**, 2958-2969.
111. Kehagia, A. A., Barker, R. A., and Robbins, T. W. (2013) Cognitive impairment in Parkinson's disease: the dual syndrome hypothesis, *Neurodegener. Dis.*, **11**, 79-92, doi: 10.1159/000341998.
 112. Devignes, Q., Bordier, C., Viard, R., Defebvre, L., Kuchcinski, G., Leentjens, A. F. G., Lopes, R., and Dujardin, K. (2022) Resting-state functional connectivity in frontostriatal and posterior cortical subtypes in Parkinson's disease-mild cognitive impairment, *Mov. Disord.*, **37**, 502-512, doi: 10.1002/mds.28888.
 113. Wiesman, A. I., Heinrichs-Graham, E., McDermott, T. J., Santamaria, P. M., Gendelman, H. E., and Wilson, T. W. (2016) Quiet connections: Reduced fronto-temporal connectivity in nondemented Parkinson's Disease during working memory encoding, *Hum. Brain Mapp.*, **37**, 3224-3235, doi: 10.1002/hbm.23237.
 114. Müller-Oehring, E. M., Sullivan, E. V., Pfefferbaum, A., Huang, N. C., Poston, K. L., Bronte-Stewart, H. M., and Schulte, T. (2015) Task-rest modulation of basal ganglia connectivity in mild to moderate Parkinson's disease, *Brain Imaging Behav.*, **9**, 619-638, doi: 10.1007/s11682-014-9317-9.
 115. Wolters, A. F., van de Weijer, S. C. F., Leentjens, A. F. G., Duits, A. A., Jacobs, H. I. L., and Kuijf, M. L. (2019) Resting-state fMRI in Parkinson's disease patients with cognitive impairment: A meta-analysis Parkinsonism, *Relat. Disord.*, **62**, 16-27, doi: 10.1016/j.parkreldis.2018.12.016.
 116. Oswal, A., Brown, P., and Litvak, V. (2013) Synchronized neural oscillations and the pathophysiology of Parkinson's disease, *Curr. Opin. Neurol.*, **26**, 662-670, doi: 10.1097/WCO.0000000000000034
 117. Rosenblum, Y., Shiner, T., Bregman, N., Fahoum, F., Giladi, N., Maidan, I., and Mirelman, A. (2022) Event-related oscillations differentiate between cognitive, motor and visual impairments, *J. Neurol.*, **269**, 3529-3540, doi: 10.1007/s00415-021-10953-4.
 118. Peláez Suárez, A. A., Berrillo Batista, S., Pedrosa Ibáñez, I., Casabona Fernández, E., Fuentes Campos, M., and Chacón, L. M. (2021) EEG-derived functional connectivity patterns associated with mild cognitive impairment in Parkinson's disease, *Behav. Sci.*, **11**, 40, doi: 10.3390/bs11030040.
 119. Mano, T., Kinugawa, K., Ozaki, M., Kataoka, H., and Sugie, K. (2022) Neural synchronization analysis of electroencephalography coherence in patients with Parkinson's disease-related mild cognitive impairment, *Clin. Park. Relat. Disord.*, **6**, 100140, doi: 10.1016/j.prdoa.2022.100140.
 120. Freichel, C., Neumann, M., Ballard, T., Müller, V., Woolley, M., Ozmen, L., Borroni, E., Kretschmar, H. A., Haass, C., Spooren, W., and Kahle, P. J. (2007) Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice, *Neurobiol. Aging*, **28**, 1421-1435, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.06.013.
 121. LeDoux, J. E. (2000) Emotion circuits in the brain, *Annu. Rev. Neurosci.*, **23**, 155-184, doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155.
 122. Schneider, J. S., and Kovelowski, C. J. 2nd (1990) Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys, *Brain Res.*, **519**, 122-128, doi: 10.1016/0006-8993(90)90069-n.
 123. Brown, R. G., and Marsden, C. D. (1990) Cognitive function in Parkinson's disease: from description to theory, *Trends Neurosci.*, **13**, 21-29, doi: 10.1016/0166-2236(90)90058-I.
 124. Schneider, J., Arvanitakis, Z., Yu, L., Boyle, P., Leurgans, S., and Bennett, D. (2012) Cognitive impairment, decline and fluctuations in older community-dwelling subjects with Lewy bodies, *Brain*, **135**, 3005-3014, doi: 10.1093/brain/awt234.
 125. Schneider, J. S., Marshall, C. A., Keibel, L., Snyder, N. W., Hill, M. P., Brotchie, J. M., Johnston, T. H., Waterhouse, B. D., and Kortagere, S. (2021) A novel dopamine D3R agonist SK609 with norepinephrine transporter inhibition promotes improvement in cognitive task performance in rodent and non-human primate models of Parkinson's disease, *Exper. Neurol.*, **335**, 1135, doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113514.
 126. Klein, C., Rasinska, J., Empl, L., Sparenberg, M., Poshtibana, A., Haina, E. G., Iggenaa, D., Rivalanb, M., Winterb, Y., and Steinera, B. (2016) Physical exercise counteracts MPTP-induced changes in neural precursor cell proliferation in the hippocampus and restores spatial learning but not memory performance in the water maze, *Behav. Brain Res.*, **307**, 227-238, doi: 10.1016/j.bbr.2016.02.040.
 127. Das, N. R., Gangwal, R. P., Damre, M. V., Sangamwar, A. T. and Sharma, S. S. (2014) A PPAR- β/δ agonist is neuroprotective and decreases cognitive impairment in a rodent model of Parkinson's disease, *Curr. Neurovasc. Res.*, **11**, 114-124, doi: 10.2174/1567202611666140318114037.
 128. Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R. E., and Przedborski, S. (1995) Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration*, **4**, 257-269, doi: 10.1016/1055-8330(95)90015-2.
 129. Höglinger, G. U., Arias-Carrión, O., Ipach, B., and Oertel, W. H. (2014) Origin of the dopaminergic innervations of adult neurogenic areas, *J. Comp. Neurol.*, **522**, 2336-2348, doi: 10.1002/cne.23537.
 130. Prediger, R. D., Batista, L. C., Medeiros, R., Pandolfo, P., Florio, J. C., and Takahashi, R. N. (2006) The risk is in the air: intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, **202**, 391-403, doi: 10.1016/j.expneurol.2006.07.001.

131. Castro, A. A., Ghisoni, K., Latini, A., Quevedo, J., Tasca, C. I., and Prediger, R. D., (2012) Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease, *Behav. Brain Res.*, **229**, 208–215, doi: 10.1016/j.bbr.2012.01.016.
132. Moreira, E. L., Rial, D., Aguiar Jr, A. S., Figueiredo, C. P., Siqueira, J. M., DalBó, S., Horst, H., deOliveira, J., Mancini, G., dos Santos, T. S., Villarinho, J. G., Pinheiro, F. V., Marino-Neto, J., Ferreira, J., DeBem, A. F., Latini, A., Pizzolatti, M. G., Ribeiro-do-Valle, R. M., and Prediger, R. D., (2010) Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease, *J. Neural Transm.*, **117**, 1337–1351, doi: 10.1007/s00702-010-0464-x.
133. Williams-Gray, C. H., Foltynie, T., Lewis, S. J., and Barker, R. A. (2006) Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options, *CNS Drugs*, **20**, 477–505, doi: 10.2165/00023210-200620060-00004.
134. Roy, M. A., Doiron, M., Talon-Croteau, J., Dupré, N., and Simard, M. (2018) Effects of antiparkinson medication on cognition in Parkinson's disease: a systematic review, *Can. J. Neurol. Sci.*, **45**, 375–404, doi: 10.1017/cjn.2018.21.
135. Meng, Y. H., Wang, P. P., Song, Y. X., and Wang, J. H. (2019) Cholinesterase inhibitors and memantine for Parkinson's disease dementia and Lewy body dementia: a meta-analysis, *Exp. Ther. Med.*, **17**, 1611–1624.
136. Zhang, Q., Aldridge, G. M., Narayanan, N. S., Anderson, S. W., and Uc, E. Y. (2020) Approach to cognitive impairment in Parkinson's disease, *Neurotherapeutics*, **17**, 1495–1510, doi: 10.1007/s13311-020-00963-x.
137. Litvinenko, I. V., Odinak, M. M., Mogil'naia, V. I., and Perstenev, S. V. (2008) Memantine (akatinol) therapy of cognitive impairment in Parkinson's disease complicated by dementia, *Zhurn. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova*, **108**, 37–42.
138. Frouni, I., Kwan, C., Belliveau, S., and Huot, P. (2022) Cognition and serotonin in Parkinson's disease, *Prog Brain Res.*, **269**, 373–403, doi: 10.1016/bs.pbr.2022.01.013.
139. Mantovani, E., Zucchella, C., Argyriou, A. A., and Tamburin, S. (2023) Treatment for cognitive and neuropsychiatric non-motor symptoms in Parkinson's disease: current evidence and future perspectives, *Expert. Rev. Neurother.*, **23**, 25–43, doi: 10.1080/14737175.2023.2173576.
140. Weintraub, D., Aarsland, D., Biundo, R., Dobkin, R., Goldman, J., and Lewis, S. (2022) Management of psychiatric and cognitive complications in Parkinson's disease, *BMJ*, **24**, e068718, doi: 10.1136/bmj-2021-068718.
141. Dong, J., Cui, Y., Li, S., and Le, W. (2016) Current pharmaceutical treatments and alternative therapies of Parkinson's disease, *Curr. Neuropharmacol.*, **14**, 339–355, doi: 10.2174/1570159x14666151120123025.

PATHOLOGICAL CORRELATES OF COGNITIVE DECLINE IN PARKINSON'S DISEASE: FROM MOLECULES TO NEURAL NETWORKS

Review

N. I. Novikov, E. S. Brazhnik, and V. F. Kichigina*

*Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: vkitchigina@gmail.com*

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder resulting from the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the appearance of protein aggregates in neuronal cell bodies composed predominantly of alpha-synuclein, known as Lewy bodies. PD is now recognized as a multi-system disorder characterized by severe motor impairment and various non-motor symptoms. Cognitive decline is one of the most common and worrisome non-motor symptoms. Moderate cognitive impairment (CI), diagnosed already in the early stages of PD, usually leads to deep dementia. The main types of CI observed in PD include executive dysfunction, attention, and memory dysfunction, visuospatial decline, and verbal deficits. According to the literature, the following mechanisms play a significant role in the development of cognitive dysfunctions in PD: (1) changes in the conformational structure of synaptic proteins; (2) disruption of synaptic transmission; (3) neuroinflammation (pathological activation of neuroglia); (4) mitochondrial dysfunction and oxidative stress; (5) metabolic conditions; (6) functional remodeling of the neural networks. The listed molecular and synaptic changes in the brain can lead to the death of dopamine-synthesizing cells of the substantia nigra and dysfunction of other mediator systems, as well as partial

cellular atrophy in the neocortex and subcortical nuclei. As a result, the functioning of neural networks involved in the transmission of information related to the regulation of motor activity and cognitive functions is disrupted. Elucidation of the causes of changes occurring in PD and the search for methods to eliminate them will help create new approaches in the treatment of this disease. The aim of the review is to analyze the pathological processes in the brain that underlie the onset of cognitive impairment in PD. The review analyzes the data obtained both from studies on patients with PD and animal (rodents and primates) models of this disease used for the evaluation of the mechanisms underlying etiology and the development of PD in humans.

Keywords: Parkinson's disease, dopamine, cognitive impairment, biomarkers, α -synuclein, transmitter pathology, glucose hypometabolism, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, positron emission and magnetic resonance imaging, structural changes, animal models

ФУНКЦИЯ КОНСЕРВАТИВНЫХ «НЕФУНКЦИОНАЛЬНЫХ» ОСТАТКОВ В АПОМИОГЛОБИНЕ – ОБЕСПЕЧИТЬ И СОХРАНИТЬ ПРАВИЛЬНУЮ ТОПОЛОГИЮ БЕЛКА

Мини-обзор

© 2023 В.Е. Бычкова¹, Д.А. Долгих², В.А. Балобанов^{1*}

¹ Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: balobanov@phys.protres.ru

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.07.2023

После доработки 18.07.2023

Принята к публикации 31.08.2023

В предлагаемой работе на основании анализа работ трёх лабораторий получен ответ на вопрос О.Б. Птицына: какова роль консервативных нефункциональных остатков в апомиоглобине. Выявлена решающая роль консервативных нефункциональных остатков в апомиоглобине в образовании нативной топологии в состоянии расплавленной глобулы этого белка. Это позволяет предположить, что нефункциональные консервативные остатки в этом белке необходимы для фиксации и сохранения правильной топологии основных элементов его вторичной структуры в промежуточном состоянии. Правильная топология является нативным элементом в этом состоянии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апомиоглобин, консервативные остатки, стабильность белка, сворачивание белка, нативная топология.

DOI: 10.31857/S0320972523110192, **EDN:** MNCECS

Посвящается памяти О.Б. Птицына

ВВЕДЕНИЕ

Предлагаемая вашему вниманию работа является небольшим обзором литературных данных с целью получения однозначного ответа на вопрос, заданный почти 30 лет назад.

В 90-х гг. прошлого столетия широко обсуждалось сворачивание белков, особенно белков с промежуточными состояниями [1, 2]. Был предложен ряд моделей для механизма сворачивания белка, включая неспецифический коллапс [3], иерархическую модель [1, 2, 4], модель диффузии-столкновения [5] и механизм нуклеации-роста, вовлекающий образование переходного состояния [6, 7]. Последний механизм включает две модели переходного состояния – неспецифического, требующего

только некоторого [8] или даже довольно большого [9] числа нативо-подобных контактов, и специфического, зависящего от чётко определённого ядра сворачивания [6, 10]. В 1996 г. был предложен метод определения такого ядра сворачивания, использующий эволюционно консервативные остатки и предполагающий их участие в образовании ядра сворачивания [11].

В том же 1996 г. О.Б. Птицын обнаружил, что в ряде глобинов наблюдаются консервативные остатки, не участвующие в связывании гема, т.е. нефункциональные. Этот факт был позднее подтверждён для 728 глобиновых последовательностей [12]. Важной особенностью данных остатков было их расположение внутри гидрофобного ядра белковой глобулы. Такое расположение разом отмечает варианты

Принятые сокращения: А, G и Н – основные альфа-спирали апомиоглобина; ароMb – апомиоглобин; MG – состояние расплавленной глобулы; SW ароMb – апомиоглобин кашалота.

* Адресат для корреспонденции.

консервативности остатков, связанные с меж-белковыми взаимодействиями и посттрансляционными модификациями. Таким образом, выявленные остатки, казалось бы, не участвуют ни в каких функциях белка. Как итог, явная консервативность и неясная важность для белка сформировали вопрос о роли этих аминокислотных остатков. Для ответа на этот вопрос потребовалось много лет работы трёх крупных лабораторий: лаборатории физики белка, организованной О.Б. Птицыным, лаборатории П. Райта в Сан-Диего (США) и лаборатории Х. Родера (Филадельфия, США). Теперь, опираясь на исследования этих лабораторий, мы можем провести анализ и однозначно ответить на вопрос о роли консервативных нефункциональных аминокислотных остатков апомиоглобина (ароMb).

К 1996 г. в лаборатории П. Райта (Сан-Диего)* был сконструирован ген апомиоглобина кашалота (SW ароMb), самого стабильного из миоглобинов [13], для получения белка в прокариотических экспрессионных системах. Таким образом, появилась возможность манипуляций с его аминокислотной последовательностью и экспериментальной проверки того, на что влияет замена консервативных нефункциональных остатков — на скорость сворачивания белка, на его стабильность или на что-то другое. Было предположено, что эти остатки важны для быстрого и правильного сворачивания белка [12]. Используя совместный с П. Райтом грант, одним из нас (Д.Д.) были сконструированы плазмиды мутантных ароMb, включавшие замены всех консервативных остатков на Ala, а также некоторых из них на Trp и Met. В дополнение к ним были сконструированы плазмиды и для нескольких замен неконсервативных остатков, которые могли быть важны для перехода из состояния расплавленной глобулы (MG) в нативное (N) состояние или для кинетического сворачивания и разворачивания полученных мутантных белков. Интенсивное исследование в нативных условиях при pH 6,2 показало, что замена консервативных остатков на Ala сильно сказывается на стабильности структуры SW ароMb относительно разворачивания, особенно на его стабильности в промежуточном состоянии, и заметно слабее — на кинетике его сворачивания [14]. Следует отметить, что измерения кинетики в то время ограничивались миллисекундным интервалом (мёртвое время прибора — доли миллисекунды). В зависимо-

сти от условий эксперимента при равновесном разворачивании SW ароMb наблюдались один [15, 16] или два [17] интермедиата. За последующие годы техника эксперимента была существенно усовершенствована, позволяя измерять всё более быструю кинетику сворачивания белков [18–20].

С использованием микросекундной кинетики было предпринято исследование равновесного и кинетического сворачивания/разворачивания SW ароMb дикого типа [20] и MG мутантных белков с заменами как консервативных, так и неконсервативных остатков в лаборатории Х. Родера** [21]. В результате этих работ было показано, что сворачивание SW ароMb при pH 4,2 проходит через один или два промежуточных состояния в зависимости от растворителя. При этом замена консервативных остатков слабо сказывается в переходе $U \rightarrow$ интермедиат L (U — развёрнутое состояние), но начинает сильно влиять на стабильность конечного структурного состояния MG при pH 4,2.

РОЛЬ НЕФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОНСЕРВАТИВНЫХ ОСТАТКОВ

Таким образом, изучение равновесного и кинетического сворачивания/разворачивания SW ароMb при pH 4,2 [21] показало, что замена консервативных остатков сильнее всего сказывается на стабильности состояния расплавленной глобулы (ароMb MG) при pH 4,2, а также на стабильности нативного состояния этого белка, как это было показано ранее [14]. Замена консервативных остатков не оказала существенного влияния на скорость сворачивания SW ароMb ни при нейтральном pH, ни при pH 4,2 в состоянии MG. Особенно важно, что состояние L отделено от состояния MG конформационным переходом. Оба этих состояния имеют сходную вторичную структуру, но в состоянии MG элементы этой структуры взаимно ориентированы и образуют нативоподобную топологию. Такой результат указал на важность консервативных остатков для стабилизации состояния MG и взаимной ориентации элементов вторичной структуры в нём.

Дополнительный анализ экспериментальных данных в работе Mizukami et al. [21] чётко показал, что роль консервативных остатков резко возрастает при переходе из интермедиата L в состояние MG при pH 4,2. В работах

* P. Wright, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037, USA.

** H. Roder, Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave, Philadelphia, PA 19111.

Nishimura et al. и Aoto et al. [22, 23] показано, что в этом же переходе происходит образование связей между консервативными остатками. Это позволяет удерживать положение А-спирали в комплексе с G- и H-спиралями. Для SW ароMb было показано наличие контактов между А-, G- и H-спиралями в состоянии MG. В лаборатории П. Райта методом ЯМР было обнаружено, что в процессе сворачивания ароMb в промежуточном состоянии сначала возникает ненативный контакт между консервативными остатками на спирали H (Leu135) и спирали G (Leu115), а при формировании нативного состояния — уже между правильными остатками Leu135 и Ile111 [22, 23]. С другой стороны, в работе итальянских исследователей было показано, что замена Trp14 в спирали А на Met в миоглобине (Mb) из *Aplysia limacina* ведёт к одновременной замене Met130 в спирали H (аналога остатка 131 в SW ароMb) на Trp [24], т.е. сохраняется тот же контакт между спиралями А и H. Следует отметить, что Trp130 в этом белке образует четыре из шести консервативных нефункциональных связей с другими остатками [24].

Консерватизм аминокислотных остатков в последовательности говорит об их биологической значимости. Для определения этой значимости необходимо выяснить, насколько важна стабильность состояния MG в клетке и в каких процессах белок может переходить в такое состояние. Образование MG при pH 4,2 ставит вопрос о том, где же в клетке можно наблюдать сходные условия. Напомним путь биосинтеза ароMb в клетке. Он синтезируется на рибосомах вблизи мембраны эндоплазматического ретикула (ER), pH около которой составляет 5–6, и связывается с ней. Затем полипептидная цепь ароMb перемещается (движется) вдоль мембраны ER и достигает места соединения мембраны ER и внешней митохондриальной мембраны, поверхность которой уже заряжена отрицательно. Таким образом, pH ~4 может наблюдаться около внешней мембраны митохондрии, а это — условия образования MG! Образовавшаяся структура ароMb, связанная с мембраной, способна связывать гем, синтезируемый только в митохондриях.

Однако после связывания гема образовавшийся холо-Mb уже не имеет сродства к мембране, выходит в цитоплазму и никогда не возвращается во внешнюю мембрану митохондрии. Таким образом, pH ~4 необходим как для связывания апобелка с внешней мембраной митохондрии, так и для связывания гема. Ранее нами было показано, что ароMb в его нативном состоянии и в состоянии MG спо-

собен связываться с отрицательно заряженной поверхностью мембран [25]. Таким образом, условие pH ~4, казавшееся сначала трудновыполнимым, становится реальностью при анализе условий биосинтеза ароMb в клетке.

Теперь следует вспомнить, в чём главное отличие нативного состояния белка от состояния MG. Для нативной формы белка характерна плотная упаковка боковых групп и нативная топология, т.е. нативное расположение основных элементов вторичной структуры. Для состояния MG характерно отсутствие плотной упаковки боковых групп, но в нём сохраняется нативная топология — нативное расположение основных элементов вторичной структуры. У SW ароMb в состоянии MG отсутствует плотная упаковка боковых групп, но сохраняется нативная топология (взаимное расположение) основных А-, G- и H-спиралей. Возникает вопрос: что позволяет сохранять нативное взаимное расположение спиралей в этом состоянии при отсутствии плотной упаковки боковых групп? Разумно было бы предположить, что спирали должны быть каким-то образом скреплены. В этом случае наличие консервативных остатков, попарно расположенных на А-, G- и H-спиралях и взаимодействующих между собой, как раз и было бы той скрепкой, которая позволила бы удерживать их правильное расположение в состоянии MG.

Как было показано нами [26], SW ароMb обладает высокой аффинностью к мембране. Его нативная и развёрнутая в мочевины формы в присутствии мембран связываются с ними, приобретая состояние, которое по спектральным и флуоресцентным свойствам сходно с ароMb в состоянии MG. Поэтому изучение структуры белков, связанных с мембранами, представляет особый интерес, особенно в случае SW ароMb, когда есть возможность изучить влияние замен нефункциональных консервативных остатков на изменение структуры белка в мембране, вызванное этими заменами. Таким образом, любые данные о структуре ароMb, связанного с мембраной, будут интересны с точки зрения неизвестной структуры MG ароMb и тех изменений, которые вносят замены нефункциональных консервативных остатков. Экспериментально доказать правильную топологию ароMb и его мутантных форм с заменами нефункциональных консервативных остатков в состоянии типа MG, по-видимому, можно, изучив структуру белка, связанного с мембраной, с использованием новейших методов ЯМР.

Таким образом, основываясь на результатах работ Mizukami et al., Nishimura et al.,

Aoto et al. и Musto et al. [21, 22–24], на примере ароМб можно впервые сделать чёткое предположение: «Нефункциональные консервативные остатки в белках необходимы для фиксации и сохранения правильной топологии основных элементов вторичной структуры белка в промежуточном состоянии типа MG. Правильная топология является нативным элементом в этом состоянии». Для ароМб это означает сохранение AGH-комплекса, возможно, дополненного близлежащими неконсервативными остатками В- и Е-спиралей. Насколько нам известно, в работе Mizukami et al. [21] впервые показано, что наблюдается переход между интермедиатом с топологией и интермедиатом с просто подобной вторичной структурой. В этой же работе показано в первый раз, что нативная топология может быть «расплавлена» изменением рН, так как образование нативной топологии наблюдается в переходе рН 2 – рН 4,2.

Сходная ситуация наблюдается и для цитохрома с [27], для которого обнаружено четыре консервативных остатка, расположенных по два на N- и С-спиралях, что позволяет удерживать их в комплексе на поверхности митохондрии.

По-видимому, для фиксации правильной топологии в белках природа использует не только связи между нефункциональными консервативными остатками. Возможно, ту же роль выполняют консервативные изгибы петель, что наблюдается для клеточного белка, связывающего ретиноловую кислоту [28–30], или же это обеспечивает правильное образование S-S-связей, что наблюдается в семействе лактальбумин/лизоцимов [31], где консервативные остатки располагаются близко к S-S-связям.

Возможно ли проецировать выявленные нами закономерности на сворачивание других белков? Да! Принципы самоорганизации одинаковы для всех белков – пусть пока не до конца нами поняты и детально описаны, но одинаковы! Как мы утверждаем, наличие консервативных остатков в гидрофобном ядре белка и отсутствие явной их функциональной значимости являются достаточно чёткими критериями для биоинформатического поиска остатков, важных в процессе сворачивания. При этом, как нами показано в данной статье, одна из возможных ролей таких остатков – формирование правильной топологии полипептидной цепи на промежуточных этапах сворачивания. Значимость промежуточных состояний белков для жизни клетки позволяет таким остаткам законсервироваться в последовательности.

Вклад авторов. В.Е. Бычковой и Д.А. Долгих проведён дополнительный анализ экспериментальных данных; В.Е. Бычкова, Д.А. Долгих и В.А. Балобанов участвовали в написании статьи.

Благодарности. Авторы выражают свою глубокую благодарность П.Е. Райту за его помощь и поддержку, а также структурные данные, Х. Родеру за полученные важные результаты и их обсуждение, Е.В. Серебровой за помощь в подготовке статьи, а также всем исследователям, принимавшим участие в изучении апомиоглобина.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim, P. S., and Baldwin, R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **59**, 631–660, doi: 10.1146/annurev.bi.59.070190.003215.
2. Ptitsyn, O. B. (1991) How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *FEBS Lett.*, **285**, 176–181, doi: 10.1016/0014-5793(91)80799-9.
3. Dill, K. A., Fiebig, K. M., and Chan, H. S. (1993) Cooperativity in protein folding kinetics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1942–1946, doi: 10.1073/pnas.90.5.1942.
4. Ptitsyn, O. B. (1973) Stages in the mechanism of self-organisation of protein molecules, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **210**, 1213–1215.
5. Karplus, M., and Weaver, D. L. (1994) Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data, *Protein Sci.*, **3**, 650–668, doi: 10.1002/pro.5560030413.
6. Abkevich, V. I., Gutin, A. M., and Shakhnovich, E. I. (1994) Specific nucleus as the transition state for protein folding: evidence from the lattice model, *Biochemistry*, **33**, 10026–10036, doi: 10.1021/bi00199a029.
7. Guo, Z., and Thirumalai, D. (1995) Kinetics of protein folding: nucleation mechanism, time scales, and pathways, *Biopolymers*, **36**, 83–102, doi: 10.1002/bip.360360108.

8. Wolynes, P. G., Onuchic, J. N., and Thirumalai, D. (1995) Navigating the folding routes, *Science*, **267**, 1619-1620, doi: 10.1126/science.7886447.
9. Finkelstein, A. V., and Badretdinov, A. Y. (1997) Rate of protein folding near the point of thermodynamic equilibrium between the coil and the most stable chain fold, *Fold. Des.*, **2**, 115-121, doi: 10.1016/s1359-0278(97)00016-3.
10. Fersht, A. R. (1995) Optimization of rates of protein folding: The nucleation-condensation mechanism and its implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10869-10873, doi: 10.1073/pnas.92.24.10869.
11. Shakhnovich, E. I., Abkevich, V., and Ptitsyn, O. B. (1996) Conserved residues and the mechanism of protein folding, *Nature*, **379**, 96-98, doi: 10.1038/379096a0.
12. Ptitsyn, O. B., and Ting, K. L. (1999) Non-functional conserved residues in globins and their possible role as a folding nucleus, *J. Mol. Biol.*, **291**, 671-682, doi: 10.1006/jmbi.1999.2920.
13. Jennings, P., and Wright, P. E. (1993) Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of myoglobin, *Science*, **262**, 892-896, doi: 10.1126/science.8235610.
14. Samatova, E. N., Melnik, B. S., Balobanov, V. A., Katina, N. S., Dolgikh, D. A., Semisotnov, G. V., Finkelstein, A. V., and Bychkova, V. E. (2010) Folding intermediate and folding nucleus for I-N and U-I-N transitions in apomyoglobin: Contributions by conserved and non-conserved residues, *Biophys. J.*, **98**, 1694-1702, doi: 10.1016/j.bpj.2009.12.4326.
15. Elieser, D., Jennings, P. A., Wright, P. E., Doniach, S., Hodgson, K. O., and Tsuruta, H. (1995) The radius of gyration of an apomyoglobin folding intermediate, *Science*, **270**, 487-488, doi: 10.1126/science.270.5235.487.
16. Hughson, F. M., Wright, P. E., and Baldwin, R. L. (1990) Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate, *Science*, **249**, 1544-1548, doi: 10.1126/science.2218495.
17. Jamin, M., and Baldwin, R. L. (1998) Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin, *J. Mol. Biol.*, **276**, 491-504, doi: 10.1006/jmbi.1997.1543.
18. Shastri, M. C. R., and Roder, H. (2004) Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 385-392, doi: 10.1038/nsb0598-385.
19. Roder, H., Maki, K., and Cheng, H. (2006) Early events in protein folding explored by rapid mixing methods, *Chem. Rev.*, **106**, 1836-1861, doi: 10.1021/cr040430y.
20. Xu, M., Beresneva, O., Rosario, R., and Roder, H. (2012) Microsecond folding dynamics of apomyoglobin at acidic pH, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 7014-7025, doi: 10.1021/jp3012365.
21. Mizukami, T., Xu, M., Fazlieva, R., Bychkova, V. E., and Roder, H. (2018) Complex folding landscape of apomyoglobin at acidic pH revealed by ultrafast kinetic analysis of core mutants, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 11228-11239, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b06895.
22. Nishimura, C., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2006) Identification of native and non-native structure in kinetic folding intermediates of apomyoglobin, *J. Mol. Biol.*, **355**, 139-156, doi: 10.1016/j.jmb.2005.10.047.
23. Aoto, P. C., Nishimura, C., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2014) Probing the non-native H helix translocation in apomyoglobin folding intermediates, *Biochemistry*, **53**, 3767-3780, doi: 10.1021/bi0500478m.
24. Musto, R., Bigotti, M. G., Travaglini-Allocatelli, C., Brunori, M., and Cutruzzola, F. (2004) Folding of *Aplysia limacina* apomyoglobin involves an intermediate in common with other evolutionarily distant globins, *Biochemistry*, **43**, 230-236, doi: 10.1021/bi035319l.
25. Балобанов В. А., Ильина Н. Б., Катина Н. С., Кашпаров И. А., Долгих Д. А., Бычкова В. Е. (2010) Кинетика взаимодействия между апомиоглобином и фосфолипидными мембранами, *Мол. Биол. (Москва)*, **44**, 708-711.
26. Bychkova, V. E., Basova, L. V., and Balobanov, V. A. (2014) How membrane surface affects protein structure, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1483-1514, doi: 10.1134/S0006297914130045.
27. Ptitsyn, O. B. (1998) Protein folding and protein evolution: common folding nucleus in different subfamily of c-type cytochromes? *J. Mol. Biol.*, **278**, 655-666, doi: 10.1006/jmbi.1997.1620.
28. Rotondi, K. S., and Gierasch, L. M. (2003) Local sequence information in cellular retinoic acid-binding protein I: specific residue roles in beta-turns, *Biopolymers*, **71**, 638-651, doi: 10.1002/bip.10592.
29. Rotondi, K. S., and Gierasch, L. M. (2003) Role of local sequence in the folding of cellular retinoic acid-binding protein I: structural propensities of reverse turns, *Biochemistry*, **42**, 7976-7985, doi: 10.1021/bi034304k.
30. Gunasekaran, K., Haqler, A. T., and Gierasch, L. M. (2004) Sequence and structural analysis of cellular retinoic acid-binding proteins reveal a network of conserved hydrophobic interactions, *Proteins*, **54**, 179-194, doi: 10.1002/prot.10520.
31. Ting, K.-L. H., and Jernigan, R. L. (2002) Identifying a folding nucleus for the lysozyme/alpha-lactalbumin family from sequence conservation clusters, *J. Mol. Evol.*, **54**, 425-436, doi: 10.1007/s00239-001-0033-x.

THE FUNCTION OF THE CONSERVED “NON-FUNCTIONAL” RESIDUES IN APOMYOGLOBIN IS TO PROVIDE AND PRESERVE THE CORRECT PROTEIN TOPOLOGY

Mini-Review

V. E. Bychkova¹, D. A. Dolgikh², and V. A. Balobanov^{1*}

¹ *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: balobanov@phys.protres.ru*

² *Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117871 Moscow, Russia*

In this paper the answer to O. B. Ptitsyn's question “What is the role of conserved non-functional residues in apomyoglobin” is presented, which is based on the research results of three laboratories. The role of conserved non-functional apomyoglobin residues in formation of native topology in the molten globule state of this protein is revealed. This fact allows suggesting that the conserved non-functional residues in this protein are indispensable for fixation and maintaining main elements of the correct topology of its secondary structure in the intermediate state. The correct topology is a native element in the intermediate state of the protein.

Keywords: apomyoglobin, conservative residues, protein stability, protein folding, native topology

РАЗЛИЧИЯ В СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТАХ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ПРИ НАКОПЛЕНИИ В НИХ АЦИЛГИДРОПЕРОКСИ-ПРОИЗВОДНЫХ В НАРУЖНОМ ФОСФОЛИПИДНОМ МОНОСЛОЕ ИЛИ ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ АПОПРОТЕИНА В-100 ПРИРОДНЫМ ДИКАРБОНИЛОМ

© 2023 В.З. Ланкин*, А.К. Тихазе, Г.Г. Коновалова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии
имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России,
121552 Москва, Россия; электронная почта: lankin0309@mail.ru

Поступила в редакцию 04.08.2023

После доработки 20.09.2023

Принята к публикации 20.09.2023

Наночастицы липид-транспортирующей системы организма — липопротеиды низкой плотности (ЛНП) плазмы крови легко подвергаются свободнорадикальному окислению с образованием их основных модифицированных форм — собственно окисленные ЛНП (содержащие гидроперокси-ацилы в фосфолипидах наружного слоя частиц) и дикарбонил-модифицированные ЛНП (апопротеин В-100 которых подвергся химической модификации по реакции Майара). На основании исследования кинетики свободнорадикального окисления ЛНП установлено, что существующее в литературе обозначение «окисленные липопротеиды» некорректно, поскольку не раскрывает природы окислительной модификации ЛНП. Показано, что «атерогенными» ЛНП (частицы которых активно захватываются культивируемыми макрофагами) являются не истинно окисленные ЛНП (в которых липогидроперокси-производные фосфолипидов были образованы при ферментативном окислении С-15 липоксигеназой ретикулоцитов кролика), а дикарбонил-модифицированные ЛНП. Обсуждается важная роль дикарбонил-модифицированных ЛНП в молекулярных механизмах атерогенеза и дисфункции эндотелия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: окисленные липопротеиды низкой плотности (ЛНП), дикарбонил-модифицированные ЛНП, свободнорадикальное окисление, «атерогенные» ЛНП, окислительный стресс, карбонильный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523110209, EDN: MNINOG

ВВЕДЕНИЕ

В литературе достаточно давно активно обсуждается важная роль окисленных липопротеидов в атерогенезе [1–9] и в диабетогенезе [7, 8]. Тем не менее для выяснения роли окисленных липопротеидов в важнейших патофизиологических процессах, таких как атеросклероз и сахарный диабет, следует определить, что собой представляют так называемые «окисленные липопротеиды». Это необходимо не

только для уточнения терминологии, но главным образом для установления связи между строением «окисленных липопротеидов» и их ролью в молекулярных механизмах атерогенеза и дисфункции эндотелия. Следует отметить, что термин «окисленные липопротеиды», прежде всего, применим к липопротеидам низкой плотности (ЛНП) [1–4, 8]. Наночастицы ЛНП осуществляют транспорт липидов, синтезируемых в печени, в периферические ткани. Нами установлено, что частицы именно ЛНП

Принятые сокращения: апоВ-100 — апопротеин В-100; ЛНП — липопротеиды низкой плотности; МДА — малоновый диальдегид; ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты; LOX-1 — лектин-подобный рецептор-1 для окисленных ЛНП; С-15 LOX — С-15 липоксигеназа ретикулоцитов кролика; LOOH — липогидропероксиды; TBARS — продукты, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой.

* Адресат для корреспонденции.

наиболее подвержены свободнорадикальной липопероксидации [10]. Первоначальным субстратом окисления служат β -ацилы фосфолипидов наружного слоя частиц ЛНП [11], которые обычно представлены полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК). Более глубокое окисление, затрагивающее ненасыщенные липиды гидрофобного ядра ЛНП (триглицериды и эфиры холестерина), развивается позднее [12]. «Окисленным» ЛНП приписывается важная роль в первичном повреждении сосудов, поскольку, как полагают, эти частицы усиленно захватываются клетками стенки сосудов (макрофагами, плейоморфными гладкомышечными клетками и т.д.), которые превращаются в обогащенные липидами «пенистые клетки» [1–8, 9]. Скопления «пенистых клеток» образуют липидные кластеры (липидные пятна или зоны липоидоза), которые рассматриваются как первичные предатеросклеротические повреждения стенки сосудов [6–9]. Исходя из теории жидкофазного окисления углеводов [13], можно выделить две основные стадии свободнорадикального окисления ЛНП, связанные с образованием первичных и вторичных продуктов окисления. Введение полярных гидроперокси-групп ($-OOH$) в ПНЖК-ацилы фосфолипидов наружного слоя частиц ЛНП (образование первичных продуктов окисления — липогидропероксидов, LOOH) должно сопровождаться увеличением гидрофильности β -ацилов, вследствие чего они могут «выдвигаться» в водную фазу (рис. 1).

Это подтверждают наши эксперименты по окислению фосфолипидных липосом при катализе С-15 животной липоксигеназой [14]. Увеличение содержания ацилгидроперокси-производных в фосфолипидной мембране, как и следовало ожидать, приводит к значительно-

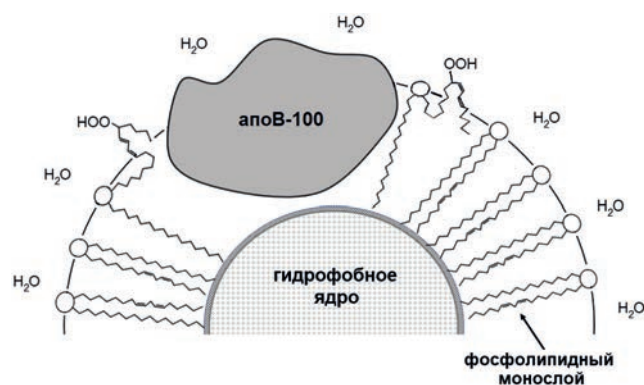


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая возможность физического изменения конформации апопротеина В-100 при образовании гидроперокси-производных ПНЖК-ацилов в фосфолипидном монослое частиц ЛНП

му увеличению ее микровязкости вследствие удаления из гидрофобного окружения полярных LOOH-содержащих β -ацилов, которые образуются при окислении ПНЖК (рис. 1) [14]. Увеличение микровязкости при этом объяснимо увеличением содержания в фосфолипидах ригидных насыщенных и мононенасыщенных ацилов (рис. 1). Следует отметить, что при NADPH-инициируемом окислении микросом печени крысы нами было обнаружено разнонаправленное изменение активности ряда мембраносвязанных ферментов [6–8], что, несомненно, является отражением изменения конформации мембранных белков в процессе свободнорадикального окисления. Аналогичный процесс в наружном фосфолипидном слое частиц ЛНП может приводить к физической модификации единственного белка этих частиц — апопротеина В-100 (апоВ-100), который встроен в фосфолипидный монослой. Очевидно, что изменение конформации апоВ-100 может влиять на его рецепторные свойства при взаимодействии со scavenger-рецептором клеток стенки сосудов и, таким образом, определять роль LOOH-содержащих ЛНП в атерогенезе.

Свободнорадикальное окисление ЛНП — многостадийный процесс, при котором накопление первичных продуктов окисления (рис. 2, реакция 1) — LOOH — неизбежно сопровождается образованием низкомолекулярных водорастворимых вторичных продуктов окисления липидов альдегидной природы (рис. 2, реакция 2), таких как 4-гидроксинон-аль и малоновый диальдегид (МДА) [6–8].

Известно, что МДА и другие дикарбонилы могут модифицировать белки по реакции Майяра (Maillard reaction) вследствие взаимодействия альдегидной группы дикарбониллов с концевыми аминогруппами белков (рис. 2, реакция 3), что приводит к образованию аддуктов с белками (поперечных сшивок типа

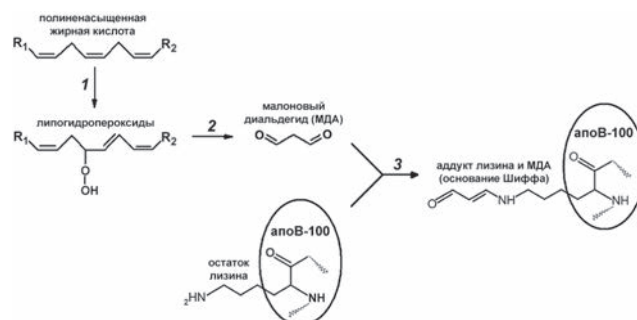


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая образование первичных и вторичных продуктов свободнорадикальной липопероксидации ацилов ПНЖК в частицах ЛНП

шиффовых оснований) [9, 15]. Представляется вероятным, что именно такая химическая модификация апоВ-100 изменяет рецепторные свойства частиц ЛНП, делая их более атерогенными.

Таким образом, основной целью настоящей работы было исследование патофизиологических особенностей действия *окисленных частиц ЛНП* (содержащих первичные продукты окисления — гидроперокси-производные ПНЖК-ацилов фосфолипидного монослоя) и *МДА-модифицированных ЛНП* (частиц ЛНП, химически модифицированных вторичным продуктом липопероксидации МДА). Учитывая предполагаемую роль окислительно модифицированных ЛНП в атерогенезе, в работе представлены сравнительные данные экспериментального исследования «атерогенности» (по захвату частиц ЛНП культивируемыми макрофагами) ферментативно окисленных и МДА-модифицированных ЛНП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изолирование ЛНП при помощи препаративного ультрацентрифугирования. ЛНП выделяли из плазмы трех здоровых доноров, которую приобретали в ФГБУ «НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева». Кровь была взята натощак в присутствии 1 мг/мл ЭДТА в качестве антикоагулянта и антиоксиданта. ЛНП выделяли при помощи дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте плотности NaBr [16] с использованием ротора Ti50 на препаративной ультрацентрифуге Optima XPN-80 («Beckman Coulter», США). Солевую суспензию ЛНП концентрировали при помощи Sephadex G-100 Superfine («GE Healthcare», США) и диализовали против 2000 объемов 10 mM K,Na-фосфатного буфера (pH 7,4) в течение 18 ч при 4 °C. Концентрацию белка в препаратах ЛНП определяли по методу Лоури, содержание апоВ-100 определяли на химическом анализаторе Architect C8000 («Abbot», США) при использовании реагентов той же фирмы.

Выделение и очистка С-15 липоксигеназы ретикулоцитов кролика, ферментативное окисление ЛНП и получение МДА-модифицированных ЛНП. Экспериментальная анемия кроликов с последующим ретикулоцитозом была вызвана ежедневным (в течение 4 дней) подкожным введением гемолитика фенилгидразина (6,25 мг/кг). С-15 липоксигеназа (С-15 LOX) была выделена из лизата обогащенной ретикулоцитами клеточной массы путем выса-

ливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (55%), как описано ранее [17], а затем последовательно очищена до получения гомогенного белка (по данным SDS-электрофореза) с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Sephadex A50 в линейном градиенте NaCl и препаративного изоэлектрического фокусирования [17]. Препарат С-15 LOX из ретикулоцитов кролика был очищен до гомогенного состояния в Институте биохимии Университета им. А. Гумбольдта (Берлин, Германия). Порции ЛНП (0,5 мг белка/мл) окисляли при катализе С-15 LOX при 37 °C в среде, содержащей 154 mM NaCl и 20 mM Tris-HCl (pH 7,4). Поскольку С-15 LOX подвергается самоинактивации продуктом реакции (LOOH) [17], фермент добавляли трижды, контролируя окисление ЛНП по накоплению конъюгированных диенов (LOOH) при 233 нм на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu («Shimadzu», Япония). Для расчета концентрации LOOH использовали коэффициент молярной экстинкции $25\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

МДА-модифицированные ЛНП были получены путем обработки свежевыделенных ЛНП приготовленным *ex tempore* МДА, который был получен из 1,1,3,3-тетраэтоксипропана путем кислотного гидролиза [18]. Для этого ЛНП (100 мкг апоВ-100) инкубировали с 1 мкмоль МДА в темноте при 37 °C (pH 6,5) в течение 3 ч [18, 19]. Избыток МДА удаляли диализом против 2000 объемов PBS (pH 7,4) в течение 18 ч при 4 °C.

Исследование специфичности тест-набора «Oxidized LDL ELISA». В нашем исследовании мы использовали тест-набор «Oxidized LDL ELISA» фирмы «Mercodia», который ранее успешно использовали в клинических исследованиях [20]. Тест-набор «Mercodia», как известно, содержит моноклональные антитела mAb-4E6 к МДА-модифицированным ЛНП [20]. Образцы ЛНП, полученные от здоровых добровольцев, подвергали химической модификации различными дикарбонилами — МДА (полученным, как описано выше), а также глиоксалем и метилглиоксалем [21] (все реагенты фирмы «Sigma-Aldrich», США), после чего проводили количественное определение модифицированных ЛНП в диапазоне концентраций 0–80 нг апоВ-100 в соответствии с инструкцией «Mercodia». Измерение поглощения проводили при 450 нм и температуре 25 °C с помощью планшетного спектрофотометра BioTek EL808 («BioTek Instruments», США). Содержание модифицированных ЛНП в образцах рассчитывали по калибратору и выражали в единицах на литр. Эффективность

модификации аминокислотных остатков белков (включая апоВ-100) дикарбонилами при использованном нами методе проведения реакции Майара, по литературным данным, составляет не менее 80–90% [18, 22].

Исследование свободнорадикального Cu^{2+} -инициированного окисления ЛНП и кинетики накопления первичных и вторичных продуктов. После диализа пробы ЛНП разбавляли до 50 мкг белка/мл раствором, содержащим 154 мМ NaCl в 50 мМ K,Na-фосфатном буфере (pH 7,4), и окисление частиц инициировали при 37 °C введением в среду инкубации 30 мкМ CuSO_4 , после чего через фиксированные интервалы времени измеряли накопление LOOH при 233 нм (ΔD_{233}) на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu [10, 23, 24]. Одновременно в параллельных пробах определяли содержание TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) в нашей модификации, уровень которых при окислении ЛНП *in vitro* отражает преимущественно концентрацию МДА [25]. ЛНП в образцах (1 мл) денатурировали добавлением равного объема 10%-ной трихлоруксусной кислоты, и через 15 мин осадок седиментировали при 2000 g в течение 30 мин в центрифуге Sigma 3-16RL (Япония). К 1 объему супернатанта в стеклянных контейнерах добавляли 2 объема 0,5%-ного водного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты («Sigma-Aldrich»), содержащей 0,5% бутилированного гидрокситолуола (2,6-дитретбутил-4-метилфенол)ВНТ («Sigma-Aldrich») в качестве антиоксиданта для предотвращения дальнейших окислительных процессов. Контейнеры герметизировали заворачивающимися пластиковыми крышками и нагревали в кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры измеряли поглощение окрашенного триметинового комплекса при 532 нм против образцов, содержащих неокисленные ЛНП (ΔD_{532}). Исследование кинетики медь-зависимого свободнорадикального окисления липопротеидов по образованию LOOH и TBARS *in vitro* проводили, используя частицы, изолированные из плазмы крови трех доноров (липопротеиды, выделенные из плазмы крови каждого донора, использовали в независимых экспериментах).

Исследование «атерогенности» окисленных и МДА-модифицированных ЛНП по тесту поглощения их культивируемыми макрофагами. ЛНП окисляли ферментативно при 37 °C путем трехкратного добавления по 1 ед./мл гомогенного препарата С-15 LOX в среду, содержащую 0,5 мг/мл белка ЛНП, 154 мМ NaCl и 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4). Трехкратное добав-

ление свежих порций фермента обеспечивало эффективное окисление ЛНП, поскольку С-15 LOX подвергается инактивации накапливающимися в ходе ферментативной реакции LOOH [17]. Накопление LOOH оценивали по увеличению концентрации диеновых конъюгатов при 233 нм (ΔD_{233}) [10] на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu.

Макрофаги были получены из крови здоровых людей в стерильных условиях. Моноцитарно-лимфоцитарную фракцию выделяли в градиенте 9% фиколла/50% хипака, разведенных в соотношении 1 : 2,4 («GE Healthcare») [26]. Клетки подсчитывали в гематометре («Weber Scientific», США) и помещали в пластиковые стерильные планшеты для тканевых культур («Nucolon», Дания) из расчета 5×10^5 клеток на лунку, после чего культивировали в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Flow», Великобритания), 2 мМ L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона (все реактивы – «GIBCO», США), в CO_2 -инкубаторе INNOVA («New Brunswick Scientific», США) в атмосфере 95% воздуха и 5% CO_2 при 37 °C в течение 14 дней со сменой инкубационной среды каждые 48 ч. После этого культуральную среду заменяли на свежую среду 199, содержащую 10% липопротеин-дефицитной сыворотки крови человека (получали методом ультрацентрифугирования при $d > 1,215$ г/мл [27]), 2 мМ L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона, а затем добавляли исследуемые ЛНП. Через 7 ч инкубации в CO_2 -инкубаторе при 37 °C удаляли среду, содержащую ЛНП, и липиды из макрофагов трижды экстрагировали смесью гексан-изопропанол (3/2, v/v) [28]. Экстракт выпаривали под вакуумом и измеряли концентрацию общего холестерина с помощью тест-набора фирмы «Boehringer-Mannheim GmbH» (Германия) на химическом анализаторе Multiscan MCC («Labsystems Oy», Финляндия) при 492 нм.

Статистический анализ результатов исследования. Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью пакетов программного обеспечения STATISTICA 10 («Statsoft», США), MedCalc version 12.7.0.0 («MedCalc Software», Бельгия) и Microsoft Excel 2010, версия 14.0.7263.5000, представляя данные как среднее $\pm$ ошибка среднего. Поскольку анализ данных показал, что распределение признаков во всех случаях отличается от нормального, для статистического анализа применяли непараметрические методы ста-

тики. Анализ различий количественных показателей при межгрупповых сравнениях выполняли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 представлены результаты исследования специфичности тест-набора «Oxidized LDL ELISA» при определении различных дикарбонил-модифицированных ЛНП.

Поскольку было установлено, что данные определения нативных (неокисленных) ЛНП, глиоксаль-модифицированных ЛНП и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП при всех исследованных концентрациях апоВ-100 достоверно не отличаются, полученные результаты были использованы для построения суммарной кривой (рис. 3, кривая 1). Данные определения МДА-модифицированных ЛНП представлены на рис. 3, кривая 2. При концентрации 80 нг/мл апоВ-100 уровень выявленных МДА-модифицированных ЛНП составлял 74,2%, а суммарный уровень нативных и других дикарбонил-модифицированных ЛНП составлял 25,8% (рис. 3, кривые 1 и 2). Таким образом, при помощи тест-набора фирмы «Mercodia» определяются преимущественно МДА-модифицированные ЛНП, что не удивительно, поскольку этот тест-набор содержит моноклональные антитела mAb-4E6 к МДА-

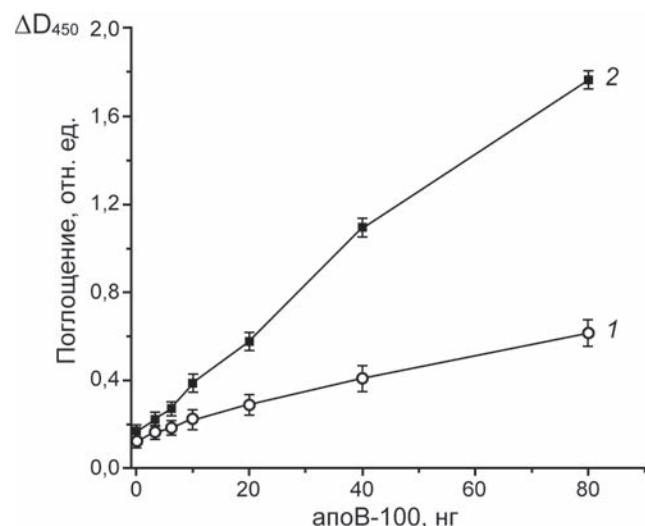


Рис. 3. Специфичность определения различных дикарбонил-модифицированных ЛНП с использованием тест-набора «Oxidized LDL ELISA»: кривая 1 — суммарные данные определения неокисленных (нативных) ЛНП, глиоксаль-модифицированных ЛНП и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП; кривая 2 — данные определения МДА-модифицированных ЛНП

модифицированным ЛНП [20]. Реакция, выявляемая с нативными ЛНП, несомненно, отражает присутствие в исследуемых препаратах ЛНП некоторого количества образованных *in vivo* МДА-модифицированных ЛНП. Тот факт, что глиоксаль-модифицированные ЛНП и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП дают такую же реакцию, как и нативные ЛНП, свидетельствует о том, что модификации ЛНП, вызываемые этими дикарбонилами, не влияют на определение МДА-модифицированных ЛНП тест-набором фирмы «Mercodia». Следовательно, дикарбонил-модифицированные ЛНП, отличные от МДА-модифицированных ЛНП, не являются антигенами для моноклональных антител mAb-4E6. Таким образом, тест-набор «Oxidized LDL ELISA» («Mercodia») может быть использован для определения МДА-модифицированных ЛНП *in vitro* и *in vivo*, поскольку модификации ЛНП другими дикарбонилами не мешают определению МДА-модифицированных ЛНП. Исходя из этого, мы неоднократно использовали тест-наборы фирмы «Mercodia» в наших клинических исследованиях для определения уровня МДА-модифицированных ЛНП в крови пациентов [29, 30].

Полученные данные позволили использовать тест-набор фирмы «Mercodia» для определения содержания МДА-модифицированных ЛНП в модельных экспериментах по Cu^{2+} -инициируемому свободнорадикальному окислению ЛНП. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 4.

В соответствии со схемой свободнорадикального окисления ЛНП (рис. 2) после

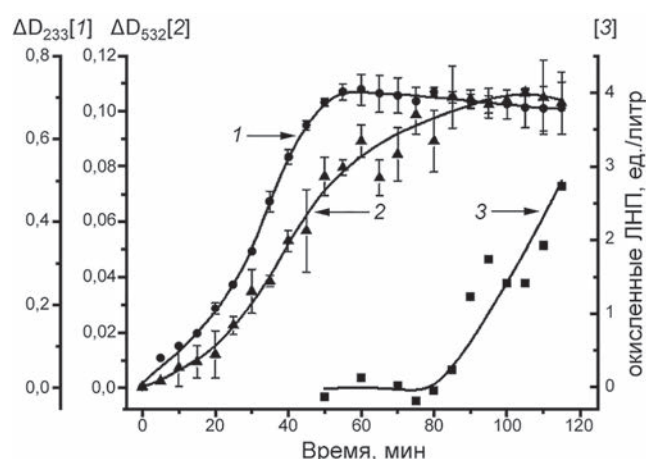


Рис. 4. Кинетика накопления первичных продуктов Cu^{2+} -инициированного свободнорадикального окисления ЛНП — липогидропероксидов, ΔD_{233} (кривая 1); вторичных продуктов окисления — МДА, ΔD_{532} (кривая 2) и определенных с помощью тест-набора фирмы «Mercodia», в соответствии с нашими данными (см. в тексте статьи), МДА-модифицированных ЛНП (кривая 3)

инициации окисления ионами Cu^{2+} начинают накапливаться первичные продукты (рис. 2, реакция 1) — LOOH-содержащие ЛНП (рис. 4, кривая 1), а затем, с некоторым опозданием (период индукции), — вторичные продукты (рис. 2, реакция 2), определяемые по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (TBARS), которые в модельной системе, в отличие от условий *in vivo*, представлены практически исключительно МДА (рис. 4, кривая 2) [25]. Для образования МДА-модифицированных ЛНП (рис. 2, реакция 3) в условиях эксперимента требуется более значительное время, что отражает кривая 3 на рис. 4. Таким образом, при Cu^{2+} -инициированном свободнорадикальном окислении ЛНП уже через 1 ч инкубации в системе должны присутствовать как LOOH-содержащие ЛНП (истинно окисленные ЛНП), так и МДА-модифицированные ЛНП в непредсказуемой пропорции (вследствие различий в липидном составе ЛНП и варьирования условий окисления). Рис. 4 наглядно демонстрирует различия в кинетике образования окисленных (LOOH-ЛНП) и МДА-модифицированных ЛНП, причем эти данные показывают, что определение «окисленные ЛНП» неприменимо к частицам ЛНП, подвергнутых многочасовому окислению в модельной системе. Очевидно, что в этих условиях можно получить не так называемые «окисленные ЛНП», а смесь истинно окисленных (LOOH-содержащих) ЛНП и МДА-модифицированных ЛНП (рис. 4). Тем не менее в подавляющем большинстве различных экспериментов используют именно такие «окисленные ЛНП», полученные при Cu^{2+} -инициированном свободнорадикальном окислении или спонтанном окислении частиц ЛНП в течение 3–24 ч [8, 9, 31–34], что не позволяет корректно интерпретировать получаемые результаты. В связи с этим нам представлялось крайне важным установить различия в патофизиологическом действии LOOH-содержащих ЛНП и МДА-модифицированных ЛНП.

Очевидно, что все способы инициации свободнорадикального окисления ЛНП (с использованием металлов переменной валентности, ферментных генераторов супероксидного радикала, пероксида водорода и органических гидропероксидов, азоинициаторов и т.д. [8]) приводят к одновременному образованию не только LOOH-содержащих ЛНП, но и МДА-модифицированных ЛНП (рис. 4). Мы использовали единственно возможный способ накопления исключительно LOOH в ЛНП (без примеси МДА-модифицированных ЛНП) при помощи ферментативного

окисления ЛНП, катализируемого С-15 LOX. Эта липоксигеназа животных (в отличие от растительной С-15 липоксигеназы соевых бобов) способна окислять не только свободные ПНЖК, но и полиеновые ацилы фосфолипидов биомембран и наружного фосфолипидного слоя частиц ЛНП [35]. В проведенных нами экспериментах использовали три вида ЛНП — нативные (неокисленные), LOOH-содержащие ЛНП (ферментативно окисленные при катализе С-15 LOX) и МДА-модифицированные ЛНП. Следует отметить, что нативные ЛНП содержали следовое количество LOOH (не более 0,2 нмоль на мг белка ЛНП), тогда как уровень LOOH в ферментативно окисленных ЛНП возрос почти до 48 нмоль на мг белка ЛНП. При этом уровень LOOH в МДА-модифицированных ЛНП практически не отличался от такового в неокисленных ЛНП. Все полученные модификации ЛНП инкубировали с культивируемыми макрофагами человека в течение 7 ч, после чего определяли захват частиц ЛНП клетками по накоплению холестерина. Результаты исследования представлены на рис. 5.

Как видно из представленных данных, эффективность захвата макрофагами ферментативно окисленных ЛНП (рис. 5, столбик 2) практически не отличалась от захвата макрофагами неокисленных (нативных) ЛНП (рис. 5, столбик 1). В то же время эффективность захвата макрофагами МДА-модифицированных ЛНП (рис. 5, столбик 3) возрастала более чем в 4 раза по сравнению с нативными

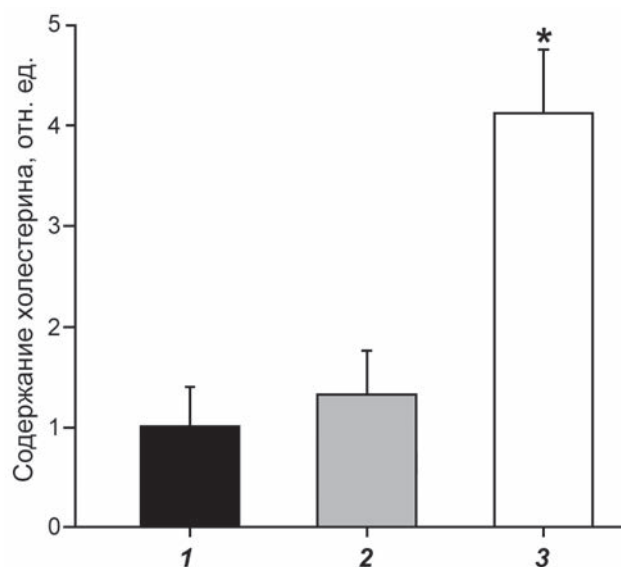


Рис. 5. Захват модифицированных частиц ЛНП культивируемыми макрофагами: 1 — нативные (неокисленные) ЛНП; 2 — LOOH-содержащие ЛНП (окисленные животной С-15 липоксигеназой); 3 — МДА-модифицированные ЛНП (* $p < 0,05$)

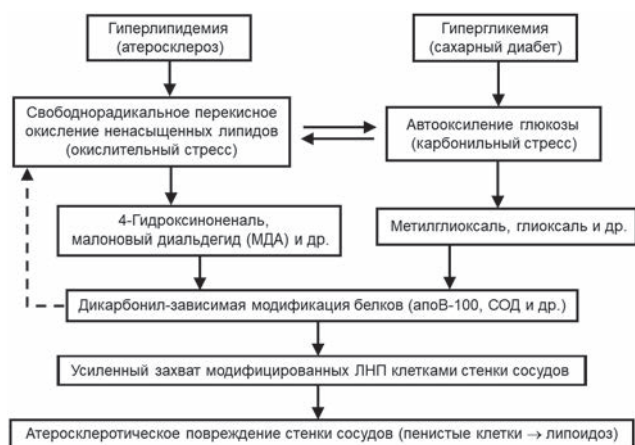


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая роль дикарбонил-модифицированных ЛНП в молекулярных механизмах повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете (пояснения в тексте)

ЛНП (рис. 5, столбик 1). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что макрофаги преимущественно захватывают не окисленные (LOON-содержащие ЛНП), а МДА-модифицированные ЛНП (рис. 5). Можно полагать, что модификация ЛНП и другими природными дикарбонилами также будет способствовать захвату ЛНП макрофагами. Так, глиоксаль-модифицированные ЛНП весьма эффективно захватываются культивируемыми макрофагами [36, 37]. Исследование захвата ЛНП культивируемыми макрофагами позволяет выявить «атерогенные» фракции ЛНП, поскольку имитирует в модельных условиях процесс образования обогащенных липидами «пенистых клеток» на ранних стадиях атерогенеза (формирование липоидозных повреждений стенки сосудов) [6–8].

Исходя из того, что и дикарбонилы, накапливающиеся при окислительном стрессе (такие как МДА), и структурные аналоги МДА, образующиеся при карбонильном стрессе (такие как глиоксаль и метилглиоксаль), вызывают атерогенную модификацию ЛНП, нами были сформулированы представления о едином молекулярном механизме повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете [7, 8, 24]. Основные положения этой гипотезы представлены на рис. 6.

Приведенная схема (рис. 6) показывает, что образование как вторичных альдегидных продуктов липопероксидации при окислительном стрессе в процессе атерогенеза, так и генерирование низкомолекулярных дикарбонил-продуктов при ферментативном окислении триозофосфатов и автоокислении глюкозы при карбонильном стрессе в конечном итоге приводит к химической модификации различных

белков в кровяном русле, включая апопротеин В-100 частиц ЛНП и молекулы антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза и др. [7, 38, 39]. Вследствие этого природные дикарбонилы являются мощными ингибиторами активности антиоксидантных ферментов, включая СОД, глутатионпероксидазу и пероксиредоксины [39–41]. В связи с этим неудивительно, что у больных атеросклерозом и сахарным диабетом отмечается значительное снижение активности антиоксидантных ферментов в клетках крови [6–8, 40]. Очевидно, что подавление активности антиоксидантных ферментов при накоплении дикарбонил-продуктов способствует усилению окислительного стресса (рис. 6, пунктирная линия). Окислительная модификация ЛНП индуцирует образование обогащенных липидами «пенистых клеток» [42], что способствует возникновению липидных кластеров (зон липоидозов) в стенке сосудов, которые считаются первичными предатеросклеротическими поражениями [1–3, 6–8] (рис. 6). Показательно, что электронегативная фракция ЛНП, содержание LOON в которой, как правило, не увеличено (sic!), также является эффективным индуктором образования «пенистых клеток» [43, 44]. Создается впечатление, что электронегативная фракция ЛНП может быть идентична дикарбонил-модифицированным ЛНП (рис. 5, столбик 3). Как бы то ни было, частицы ЛНП, образованные *in vivo* и не содержащие значительных количеств LOON [43, 44] (не являющиеся истинно окисленными, исходя из предлагаемой нами терминологии), проявляют «атерогенность», сопоставимую с МДА-модифицированными ЛНП (сравни рис. 5 и данные работ Yu et al. [43] и Estruch et al. [44]). К вышесказанному важно добавить, что признанием ведущей роли дикарбонил-модифицированных ЛНП в атерогенезе [6–8] можно логично объяснить существующую тесную связь атеросклероза с сахарным диабетом. Действительно, такие широко известные факты, как увеличение риска возникновения атеросклероза и быстрое прогрессирование атеросклероза при наличии диабета, легко объяснимы существованием единого молекулярного механизма повреждения стенки сосудов дикарбонил-модифицированными ЛНП, накапливающимися при окислительном или карбонильном стрессе (см. выше).

Лектин-подобный рецептор-1 для окисленных ЛНП (LOX-1) способствует развитию эндотелиальной дисфункции, вызывая проатерогенную сигнализацию и формирование

атероматозных бляшек путем поглощения эндотелием окисленных и электроотрицательных ЛНП [45–48]. Это приводит к инициации, прогрессированию и дестабилизации атеросклеротических бляшек, что в конечном итоге провоцирует развитие инфаркта миокарда и некоторых форм инсульта [45–48]. Scavenger-рецептор LOX-1 является одним из наиболее важных рецепторов для окисленных ЛНП, активация которого вызывает увеличение активности NADPH-оксидазы и генерирования активных форм кислорода (АФК), что активирует сигнальные пути, приводящие к экспрессии провоспалительных цитокинов и прогрессированию атеросклероза [49]. Ранее было показано, что «окисленные» ЛНП вызывают интенсивное генерирование супероксидного анион-радикала в культуре эндотелиоцитов [31], что, несомненно, вызвано последовательной индукцией LOX-1 и NADPH-оксидазы. Согласно полученным нами предварительным данным, не «окисленные», а дикарбонил-модифицированные ЛНП вызывают экспрессию LOX-1 и NADPH-оксидазы в культивируемых эндотелиоцитах пупочной вены человека [50], причем МДА-модифицированные ЛНП обладают намного большим эффектом, чем глиоксаль- и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП [50]. Таким образом, нами получено еще одно убедительное доказательство того, что биологические эффекты при свободнорадикальном окислении ЛНП вызваны не накоплением LOOH, а образованием дикарбонил-модифицированных ЛНП. Следует отметить, что предлагаемый нами подход позволяет установить отличия в действии отдельных дикарбонилов [21, 37], что представляется немаловажным для выяснения молекулярных механизмов атерогенеза и дисфункции эндотелия. Кроме того, полученные нами данные ориентируют исследователей на разработку принципиально новых лекарственных средств для фармакотерапии атеросклеротических повреждений стенки сосудов, направленных на детоксикацию и утилизацию накапливающихся при окислительном и карбонильном стрессе природных дикарбонилов. В частности, перспективным представляется синтез и проверка фармакологической активности соединений, способных быть эффективными scavenger'ами дикарбонилов, таких как соединения из класса производных гидропина [51, 52]. Следовательно, употребление термина «окисленные ЛНП» является некорректным, причем при использовании в экспериментах частиц ЛНП, подвергнутых свободнорадикальному окислению, необходимо

указывать, с какими именно — LOOH-содержащими ЛНП, МДА-модифицированными ЛНП или их смесью не установленного состава — проводили данное исследование. Без сообщения этих сведений интерпретация результатов представляется затруднительной; более того, как следует из приведенных в нашей работе данных о мощных эффектах дикарбонил-модифицированных ЛНП, большая часть результатов, полученных с применением так называемых «окисленных ЛНП», может быть объяснена присутствием в используемых препаратах ЛНП частиц с карбонильной модификацией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липопротеиды низкой плотности плазмы крови представляют собой надмолекулярные липид-белковые комплексы (наночастицы) липид-транспортной системы организма. Они легко подвергаются свободнорадикальному окислению с образованием модифицированных форм, из которых важнейшими являются: истинно окисленные ЛНП (содержащие гидроперокси-ацилы в фосфолипидах наружного слоя частиц) и дикарбонил-модифицированные ЛНП (апопротеин В-100 которых подвергся химической модификации по реакции Майара). Изучение кинетики Cu^{2+} -инициированного свободнорадикального окисления ЛНП свидетельствует о том, что существующее в литературе обозначение «окисленные ЛНП» некорректно, поскольку не раскрывает природы окислительной модификации ЛНП. Показано, что «атерогенными» ЛНП (частицы которых активно захватываются макрофагами) являются не собственно окисленные ЛНП (содержащие LOOH-производные фосфолипидов), а ЛНП с химически модифицированным апоВ-100, образующиеся при взаимодействии концевых NH_2 -групп белка с альдегидными группами (реакция Майара) природных дикарбонилов (МДА-модифицированные ЛНП и др.). Высказана гипотеза о важной роли дикарбонил-модифицированных ЛНП в молекулярных механизмах атерогенеза и дисфункции эндотелия, на основании которой предлагаются новые подходы к разработке фармакотерапии атеросклероза и сахарного диабета.

Вклад авторов. Ланкин В.З. — руководство работой, написание статьи, обсуждение результатов; Тихазе А.К. — написание и редактирование статьи; Коновалова Г.Г. — проведение экспериментов, техническая подготовка статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00013).

Благодарности. Авторы признательны К.Б. Шумаеву за помощь в изготовлении рисунков.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Steinbrecher, U. P., Parthasarathy, S., Leake, D. S., Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1984) Modification of low density lipoprotein by cells involves lipid peroxidation and degradation low density lipoprotein phospholipids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3883-3887, doi: 10.1073/pnas.81.12.3883.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol. Modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity, *New Engl. J. Med.*, **320**, 915-924, doi: 10.1056/NEJM198904063201407.
- Kita, T., Ishii, K., Yokode, M., Kume, N., Nagano, Y., Arai, H., and Kawai, C. (1990) The role of oxidized low density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis, *Eur. Heart J.*, **11**, 122-127, doi: 10.1093/eurheartj/11.suppl_e.122.
- Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis, *J. Clin. Invest.*, **88**, 1785-1792, doi: 10.1172/JCI115499.
- Yla-Herttuala, S. (1994) Role of lipid and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis, *Drugs Today*, **30**, 507-514.
- Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2003) Atherosclerosis as a free radical pathology and antioxidative therapy of this disease, in: *Free radicals, NO and Inflammation*, IOS Press, Amsterdam, **344**, pp. 218-231.
- Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, doi: 10.2174/1874609809666160926142640.
- Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2022) Dicarbonyl-dependent modification of LDL as a key factor of endothelial dysfunction and atherosclerotic vascular wall damage, *Antioxidants*, **11**, 1565, doi: 10.3390/antiox11081565.
- Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2023) Malondialdehyde as an important key factor of molecular mechanisms of vascular wall damage under heart diseases development, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 128, doi: 10.3390/ijms24010128.
- Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Kosach, V. Ya. (2022) Comparative susceptibility to oxidation of different classes of blood plasma lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1335-1341, doi: 10.1134/S0006297922110128.
- Milne, G. L., Seal, J. R., Havrilla, C. M., Wijtmans, M., and Porter, N. A. (2005) Identification and analysis of products formed from phospholipids in the free radical oxidation of human low density lipoproteins, *J. Lipid Res.*, **46**, 307-319, doi: 10.1194/jlr.M400311-JLR200.
- Noguchi, N., Numano, R., Kaneda, H., and Niki, E. (1998) Oxidation of lipids in low density lipoprotein particles, *Free Radic. Res.*, **29**, 43-52, doi: 10.1080/10715769800300061.
- Эмануэль Н. М., Денисов Е. Т., Майзус З. К. (1965) *Ценные реакции окисления углеводов в жидкой фазе*, Наука, Москва, с. 375.
- Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Osis, Yu. G. (2002) Modeling the cascade of enzymatic reactions in liposomes including successive free radical peroxidation, reduction, and hydrolysis of phospholipid polyenoic acyls for studying the effect of these processes on the structuraldynamic parameters of the membranes, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 566-574, doi: 10.1023/a:1015502429453.
- Estévez, M., Padilla, P., Carvalho, L., Martín, L., Carrapiso, A., and Delgado, J. (2019) Malondialdehyde interferes with the formation and detection of primary carbonyls in oxidized proteins, *Redox Biol.*, **26**, 101277, doi: 10.1016/j.redox.2019.101277.
- Tertov, V. V., Kaplun, V. V., Dvoryantsev, S. N., and Orekhov, A. N. (1995) Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low density lipoprotein oxidation *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 608-613, doi: 10.1006/bbrc.1995.2329.
- Schewe, T., Wiesner, R., and Rapoport, S. M. (1981) Lipoxygenase from rabbit reticulocytes, *Methods Enzymol.*, **71**, 430-441, doi: 10.1016/0076-6879(81)71054-1.
- Requena, J. R., Fu, M. X., Ahmed, M. U., Jenkins, A. J., Lyons, T. J., Baynes, J. W., and Thorpe, S. R. (1997) Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein, *Biochem. J.*, **322**, 317-325, doi: 10.1042/bj3220317.
- Fogelman, A. M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J. S., and Edwards, P. A. (1980) Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2214-2218, doi: 10.1073/pnas.77.4.2214.

20. Sigurdardottir, V., Fagerberg, B., and Hulthe, J. (2002) Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58 year old men (AIR Study), *J. Int. Med.*, **252**, 440-447, doi: 10.1046/j.1365-2796.2002.01054.x.
21. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Domogatsky, S. P., Tikhaze, A. K., Klots, I. N., and Ezhov, M. V. (2023) Clearance and utilization of dicarbonyl-modified LDL in monkeys and humans, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10471, doi: 10.3390/ijms241310471.
22. Schalkwijk, C. G., Vermeer, M. A., Stehouwer, C. D., te Koppele, J., Princen, H. M., and van Hinsbergh, V. W. (1998) Effect of methylglyoxal on the physicochemical and biological properties of low-density lipoprotein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1394**, 187-198, doi: 10.1016/s0005-2760(98)00112-x.
23. Patel, R. P., and Darley-Usmar, V. (1999) Molecular mechanisms of the copper dependent oxidation of low-density lipoprotein, *Free Radic. Res.*, **30**, 1-9, doi: 10.1080/10715769900300011.
24. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Tikhaze, A. K., Shumaev, K. B., Kumskova, E. M., and Viigimaa, M. (2014) The initiation of the free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injuries in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.*, **395**, 241-252, doi: 10.1007/s11010-014-2131-2.
25. Caldiroli, A., Auxilia, A. M., Capuzzi, E., Clerici, M., and Buoli, M. (2020) Malondialdehyde and bipolar disorder: A short comprehensive review of available literature, *J. Affect Disord.*, **274**, 31-37, doi: 10.1016/j.jad.2020.05.001.
26. Bilenko, M. V., Khil'chenko, A. V., Konovalova, G. G., and Lankin, V. Z. (2003) Effect of antioxidant probucol on cell-mediated LDL oxidation *in vitro* and *in vivo*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **136**, 126-128, doi: 10.1023/a:1026398319379.
27. Tertov, V. V., Sobenin, I. A., Gabbasov, Z. A., Popov, E. G., Jaakkola, O., Solakivi, T., Nikkari, T., Smirnov, V. N., and Orekhov, A. N. (1992) Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization, *Lab. Invest.*, **67**, 665-675.
28. Hara, A., and Radin, N. S. (1978) Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, *Anal. Biochem.*, **90**, 420-426, doi: 10.1016/0003-2697(78)90046-5.
29. Lankin, V., Viigimaa, M., Tikhaze, A., Kumskova, E., Konovalova, G., Abina, J., Zemtsovskaya, G., Kotkina, T., Yanushevskaya, E., and Vlasik, T. (2011) Cholesterol-rich low density lipoproteins are also more oxidized, *Mol. Cell. Biochem.*, **355**, 187-191, doi: 10.1007/s11010-011-0853-y.
30. Viigimaa, M., Abina, J., Zemtsovskaya, G., Tikhaze, A., Konovalova, G., Kumskova, E., and Lankin, V. (2010) Malondialdehyde – modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis, *Blood Press*, **19**, 164-168, doi: 10.3109/08037051.2010.484158.
31. Galle, J., Schneider, R., Heinloth, A., Wanner, C., Galle, P. R., Conzelmann, E., Dimmeler, S., and Heermeier, K. (1999) Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress, *Kidney Int.*, **55**, 1450-1461, doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00351.x.
32. Zhao, R., Ma, X., Xie, X., and Shen, G. X. (2009) Involvement of NADPH oxidase in oxidized LDL-induced upregulation of heat shock factor-1 and plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, E104-E111, doi: 10.1152/ajpendo.91023.2008.
33. Furman, C., Martin-Nizard, F., Fruchart, J. C., Duriez, P., and Teissier, E. (1999) Differential toxicities of air (mO-LDL) or copper-oxidized LDLs (Cu-LDL) toward endothelial cells, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **13**, 316-323, doi: 10.1002/(sici)1099-0461(1999)13:6<316::aid-jbt5>3.0.co;2-o.
34. Sangle, G. V., Zhao, R., and Shen, G. X. (2008) Transmembrane signaling pathway mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**, E1243-E1254, doi: 10.1152/ajpendo.90415.2008.
35. Lankin, V. Z., Antonovsky, V. L., and Tikhaze, A. K. (2004) Regulation of free radical lipoperoxidation and organic peroxides metabolism during normal station and pathologies, in *Peroxides at the Beginning of the Third Millennium: Synthesis, Properties, Application*, Nova Science Publishers, Inc., NY, pp. 85-111.
36. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kapel'ko, V. I., Shepel'kova, G. S., Shumaev, K. B., Panasenko, O. M., Konovalova, G. G., and Belenkov, Y. N. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1081-1090, doi: 10.1134/S0006297907100069.
37. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Konovalova, G. G., Kumskova, E. M., and Shumaev, K. B. (2010) Aldehyde-dependent modification of low density lipoproteins, in *Handbook of Lipoprotein Research*, Nova Science Publishers, Inc., NY, pp. 85-107.
38. Lankin, V. Z., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Kurganov, B. I. (2017) Influence of dicarbonyls on kinetic characteristics of glutathione peroxidase, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **475**, 287-290, doi: 10.1134/S1607672917040123.
39. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., Lankin, V. Z., and Novoselov, V. I. (2021) Role of glutathione peroxidases and peroxiredoxins in free radical-induced pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1418-1433, doi: 10.1134/S0006297921110067.
40. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Tikhaze, A. K., Shumaev, K. B., Belova (Kumskova), E. M., Grech-

- nikova, M. A., and Viigimaa, M. (2016) Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in the blood of diabetic patients, *J. Diabetes*, **8**, 398-404, doi: 10.1111/1753-0407.12309.
41. Lankin, V. Z., Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Tikhaze, A. K., and Novoselov, V. I. (2019) Natural dicarbonyls inhibit peroxidase activity of peroxiredoxins, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **485**, 132-134, doi: 10.1134/S1607672919020157.
 42. Yu, X. H., Fu, Y. C., Zhang, D. W., Yin, K., and Tang, C. K. (2013) Foam cells in atherosclerosis, *Clin. Chim. Acta*, **424**, 245-252, doi: 10.1016/j.cca.2013.06.006.
 43. Estruch, M., Sanchez-Quesada, J. L., Ordóñez Llanos, J., and Benítez, S. (2013) Electronegative LDL: a circulating modified LDL with a role in inflammation, *Mediat. Inflamm.*, **2013**, 181324, doi: 10.1155/2013/181324.
 44. Puig, N., Montolio, L., Camps-Renom, P., Navarra, L., Jiménez-Altayó, F., Jiménez- Xarrié, E., Sánchez-Quesada, J. L., and Benítez, S. (2020) Electronegative LDL promotes inflammation and triglyceride accumulation in macrophages, *Cells*, **9**, 583, doi: 10.3390/cells9030583.
 45. Pirillo, A., Norata, G. D., and Catapano, A. L. (2013) LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis, *Mediat. Inflamm.*, **2013**, 152786, doi: 10.1155/2013/152786.
 46. Lubrano, V., and Balzan, S. (2014) LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage, *Free Radic. Res.*, **48**, 841-848, doi: 10.3109/10715762.2014.929122.
 47. Kattoor, A. J., Kanuri, S. H., and Mehta, J. L. (2019) Role of Ox-LDL and LOX-1 in atherogenesis, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 1693-1700, doi: 10.2174/0929867325666180508100950.
 48. Akhmedov, A., Sawamura, T., Chen, C. H., Kraler, S., Vdovenko, D., and Lüscher, T. F. (2021) Lectin – like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a crucial driver of atherosclerotic cardiovascular disease, *Eur. Heart J.*, **42**, 1797-1807, doi: 10.1093/eurheartj/ehaa770.
 49. Duprat, F., Robles, C., Castillo, M. P., Rivas, Y., Mondaca, M., Jara, N., Roa, F., Bertinat, R., Toledo, J., Paz, C., and González-Chavarría, I. (2023) LOX-1 activation by oxLDL induces AR and AR-V7 expression via NF-κB and STAT3 signaling pathways reducing enzalutamide cytotoxic effects, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 5082, doi: 10.3390/ijms24065082.
 50. Ланкин В. З., Шарапов М. Г., Гончаров Р. Г., Антонова О. А., Коновалова Г. Г., Тихазе А. К., Косач В. Я. (2023) Молекулярные механизмы повреждения стенки сосудов и дисфункции эндотелия. Обоснование новых подходов к антиоксидантной терапии. Тезисы конф. «Кардиология на марше», *Кардиологический вестник (спец. выпуск)*, 16-17.
 51. Galvani, S., Coatrieux, C., Elbaz, M., Grazide, M. H., Thiers, J. C., Parini, A., Uchida, K., Kamar, N., Rostaing, L., Baltas, M., Salvayre, R., and Nègre-Salvayre, A. (2008) Carbonyl scavenger and anti-atherogenic effects of hydrazine derivatives, *Free. Radic. Biol. Med.*, **45**, 1457-1467, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.026.
 52. Belkheiri, N., Bouguerne, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., Bernis, C., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A., and Baltas, M. (2010) Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 3019-3026, doi: 10.1016/j.ejmech.2010.03.031.

DIFFERENCES IN STRUCTURAL CHANGES AND PATHOPHYSIOLOGIC EFFECTS OF LOW-DENSITY LIPOPROTEINS UPON ACCUMULATION OF ACYLHYDROPEROXY DERIVATIVES IN THEIR OUTER PHOSPHOLIPID MONOLAYER OR UPON CHEMICAL MODIFICATION OF APOPROTEIN B-100 BY NATURAL DICARBONYL

V. Z. Lankin*, A. K. Tikhaze, and G. G. Konovalova

*National Medical Research Center of Cardiology
named after Academician E. I. Chazov, Ministry of Health of Russia,
121552 Moscow, Russia; e-mail: lankin0309@mail.ru*

Nanoparticles of the lipid-transporting system of the organism - low-density lipoproteins (LDL) of blood plasma are easily subjected to free radical peroxidation with formation of their main modified forms – oxidized LDL itself (containing hydroperoxy-acyls in phospholipids of the outer layer of particles) and dicarbonyl-modified LDL (apoprotein B-100 of which was chemically modified by the Maillard reaction). Based on the study of free radical oxidation kinetics of LDL, it was found that the existing in the literature

designation “oxidized lipoproteins” is incorrect because it does not reveal the nature of oxidative modification of LDL. It is shown that “atherogenic” LDL (particles of which are actively captured by cultured macrophages) are not the oxidized LDL (in which LOOH-derivatives of phospholipids are formed by enzymatic oxidation of of C-15 lipoxigenase of rabbit reticulocytes), but dicarbonyl-modified LDL. The important role of dicarbonyl-modified LDL in the molecular mechanisms of atherogenesis and endothelial dysfunction is discussed.

Keywords: oxidized low-density lipoproteins (LDL), dicarbonyl-modified LDL, free radical oxidation, “atherogenic” LDL, oxidative stress, carbonyl stress

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ПРОГЕСТЕРОНА И СЕЛЕКТИВНЫХ ЛИГАНДОВ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА В КЛЕТКАХ HepG2 ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 Т.А. Щелкунова^{1*}, И.С. Левина², И.А. Морозов³, П.М. Рубцов³,
А.И. Гончаров¹, Ю.В. Кузнецов², И.В. Заварзин², О.В. Смирнова¹

¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: schelkunova-t@mail.ru*

² *Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 117913 Москва, Россия*

³ *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117913 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 02.12.2022

После доработки 13.09.2023

Принята к публикации 22.09.2023

Прогестерон оказывает множественные эффекты в разных тканях через ядерные рецепторы (nPR) и через мембранные рецепторы семейства адипонектиновых и прогестиновых рецепторов (mPR). Через разные типы рецепторов действие прогестерона на клетки может значительно различаться. При этом он влияет на процессы пролиферации и апоптоза в нормальных и опухолевых тканях двойственно: стимулируя пролиферацию и канцерогенез в одних тканях, подавляя их и стимулируя гибель клеток — в других. В данной работе мы показали наличие высокого уровня мРНК и белка mPR β в опухолевых клетках HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека. Экспрессия других мембранных и классических ядерных рецепторов не была обнаружена. Можно предположить, что mPR β выполняет важную функцию в клетках HepG2. Главной целью работы явилось изучение функции этого белка и механизмов его действия в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека. Ранее нами были выявлены селективные лиганды mPR — соединения LS-01 и LS-02, не взаимодействующие с ядерными рецепторами. Их применение позволяет дифференцировать эффекты прогестинов, опосредуемые разными типами рецепторов. В работе изучалось действие прогестерона, LS-01 и LS-02 на пролиферацию и гибель клеток HepG2, а также активирующее фосфорилирование двух киназ, p38 MAPK и JNK, под действием трех стероидов. Показано, что все три прогестина через 72 ч инкубации с клетками подавляли их жизнеспособность и стимулировали появление фосфатидилсерина на наружной поверхности мембран, выявляемое по связыванию с аннексином V, но они не влияли на фрагментацию ДНК ядер клеток. Прогестерон достоверно снижал экспрессию генов маркеров пролиферации и стимулировал экспрессию гена белка p21, но на экспрессию генов некоторых проапоптотических факторов действовал подавляюще. Все три стероида активировали JNK в этих клетках, но на активность p38 MAPK действия не оказывали. Эффекты прогестерона и селективных лигандов mPR в клетках HepG2 были одинаковыми в отношении подавления пролиферации и стимуляции апоптотических изменений в наружных мембранах, следовательно, они осуществлялись через взаимодействие с mPR β . Участником сигнального каскада, активируемого в этих клетках изучаемыми стероидами, является JNK.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: прогестерон, селективные лиганды мембранных рецепторов прогестерона, пролиферация, апоптоз, ядерный рецептор прогестерона, мембранный β -рецептор прогестерона, клеточная линия HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека.

DOI: 10.31857/S0320972523110210, EDN: MNJPKA

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее изученной функцией прогестерона является его действие на репродуктивные

процессы в женском организме. Значительно менее исследованы его эффекты на ткани и органы репродуктивной сферы. Однако показано влияние прогестерона и его синтети-

Принятые сокращения: ВхРС3 — линия клеток аденокарциномы поджелудочной железы человека; HepG2 — линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека; nPR и mPR — ядерные и мембранные рецепторы прогестерона; PI — йодид пропидия.

* Адресат для корреспонденции.

ческих аналогов на процессы пролиферации, гибели клеток и канцерогенез в целом ряде изученных тканей [1]. Такое влияние прогестинов часто бывает разнонаправленным: стимулирующим или ингибирующим в зависимости от состава рецепторов прогестерона и фенотипа конкретной клетки [2–4]. Действие прогестерона обусловлено активацией его ядерных рецепторов (nPR) и мембранных рецепторов семейства адипонектиновых и прогестиновых рецепторов пяти субтипов (mPRs). Из последних наиболее широко представлены в тканях субтипы mPR α , mPR β и mPR γ . Участие ядерных рецепторов в процессах репродукции у особей женского пола, в поведенческих реакциях, а также в функционировании некоторых тканей и органов нерепродуктивной сферы и опухолевых клетках изучается с конца 60-х гг. прошлого века [5]. Мембранные рецепторы изучаются последние 20 лет [6–8]. Много работ посвящено исследованию различий в лигандной специфичности связывания nPR и mPRs с целью поиска для последних селективных агонистов и антагонистов [9–12], поскольку часто оба типа рецепторов обнаруживаются одновременно в одних и тех же клетках. Функция mPRs в разных тканях, а также их роль в процессе канцерогенеза остаются под вопросом. Мы изучили экспрессию генов разных типов рецепторов прогестерона более чем в 16 опухолевых культурах и выявили клеточную линию VxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека с максимальной экспрессией mPR α и mPR γ , низкой экспрессией mPR β и отсутствием nPR [13]. В клетках VxPC3 мы изучили связывание прогестерона и его производных, синтезированных в ИОХ имени Н.В. Зелинского, и обнаружили 2 соединения, взаимодействующие с mPRs, но не имеющие сродства к nPR [14, 15]. Эффекты этих новых селективных лигандов мембранных рецепторов прогестерона — LS-01 (19-гидроксипрегн-4-ен-20-он) и LS-02 (19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-он) — были изучены в опухолевых клетках VxPC3 [16]. В них обнаружилось цитотоксическое действие изучаемых соединений, причем эффекты LS-02 значительно отличались от действия прогестерона и LS-01. В данной работе мы нашли еще одну культуру клеток, в которой также не обнаруживались nPR, но наблюдалась высокая экспрессия гена *PAQR8* мембранного β -рецептора прогестерона. Это культура клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Уровень мРНК белка mPR β в клетках HepG2 значительно превосходил уровень мРНК этого белка в других изученных нами 16 опухолевых

линиях клеток человека [13]. Можно предположить, что данный рецептор принимает важное участие в регуляции функций этих клеток. Функции субтипа β мембранных рецепторов и сигнальные пути, активируемые через него прогестероном, изучены мало в сравнении с субтипом mPR α . В нейрональных клетках PC12 его функция связана с ростом аксонов, а сигнальный путь включает фосфорилирование ERK [17], в миометрии активация этого рецептора, наряду с mPR α , приводит к фосфорилированию легких цепей миозина и усилению сократительной активности, при этом показана активация p38 MAPK, но не ERK1/2 [18], экспрессия mPR β в клетках рака эндометрия связана с благоприятным прогнозом в течение заболевания [19]. Главной целью данной работы было выяснение функции mPR β в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и изучение сигнальных каскадов, активируемых при его взаимодействии с прогестинами. Для подтверждения участия mPR β в исследуемых эффектах мы использовали выявленные нами селективные лиганды mPRs. В работе исследовалось действие прогестерона, LS-01 и LS-02 на пролиферацию и гибель опухолевых клеток HepG2, а также на активирующее фосфорилирование двух киназ — возможных посредников действия этих стероидов. Изучалось влияние трех стероидов на жизнеспособность клеток с помощью ХТТ-теста, на процесс апоптоза и некроза путем изучения фрагментации ядерной ДНК, экспонирования на наружной мембране клеток фосфатидилсерина, проницаемости к йодиду пропидия. Также исследовалось действие прогестерона и селективных лигандов его мембранных рецепторов на экспрессию генов белков, связанных с процессами пролиферации и апоптоза, и возможность участия p38 MAPK и JNK в сигнальных путях, активируемых рецептором при взаимодействии с гормонами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: среда DMEM с феноловым красным, раствор Версена, 100 $\times$ L-глутамин, 0,05%-ный раствор трипсина-ЭДТА в сбалансированном солевом растворе Хэнка («ПанЭко», Россия); фетальная бычья сыворотка (FBS) и фетальная бычья сыворотка, обработанная декстран-покрытым углем (DFBS) («HyClone», США); 100 $\times$ смесь антибиотиков (пенициллин, стрептомицин) и антимикотиков, среда DMEM без фенолового

красного («Gibco», США); прогестерон («Sigma-Aldrich Corporation», США); реагенты для иммуноблоттинга и электрофореза («Thermo Scientific», США и «GE Healthcare», Великобритания); антитела козы к IgG (H + L) кролика и антитела козы к IgG (H + L) мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена HRP («Wuhan Elabscience Biotechnology», Китай); 19-гидроксипрегн-4-ен-20-он (LS-01) и 19-гидроксигидрокси-5β-прегн-3-ен-20-он (LS-02) были синтезированы в ИОХ имени Н.Д. Зелинского [14, 15].

Культивирование клеток и обработка гормонами. Клетки HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека («ATCC», США) культивировали в среде DMEM с феноловым красным, содержащей 10% FBS, 0,365 г/литр глутамина и раствор смеси антибиотика и антимикотика, в стандартных условиях при 37 °C в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. После третьего пассажа клетки рассеивали в среду DMEM без фенолового красного, содержащую 10% DFBS и раствор антибиотиков. После трех пассажей в среде без стероидов клетки рассаживали в планшеты или чашки Петри, растили до 50–70% конфлюэнтности и обрабатывали гормонами или растворителем — этанолом (не больше 0,2% v/v) в течение 24–72 ч. Затем культуральную среду удаляли, клетки использовались для анализов. В разных анализах использовались концентрации стероидов от 10 нМ до 20 мкМ. Высокие концентрации позволяют лучше выявить эффект, поскольку сродство прогестерона к mPRs в 5–30 раз ниже, чем его сродство к pPR [13, 14]. По-видимому, активация mPRs происходит при беременности и вблизи мест синтеза прогестерона, где локально наблюдаются концентрации этого гормона в 10–100 раз выше, чем в кровеносном русле [20]. В экспериментальных условиях подобные концентрации наблюдались в сыворотке животных при дополнительном введении стероида, но выживаемость, активность и прибавка веса у таких животных сохранялись неизменными в сравнении с контрольными животными [21].

ХТТ-тест. Клетки HepG2 рассеивали в 96-луночный планшет («Corning», США) по $(5-6) \times 10^3$ клеток на лунку. На следующий день проводили замену среды на среду с прогестероном или одним из селективных лигандов в разных концентрациях. После окончания инкубации проводили ХТТ-тест с помощью набора Cell Proliferation Kit («Biological Industries», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Измерение поглощения в лунках проводили через час и через 2 ч при 450 и 620 нм на планшетном спектро-

фотометре Multiscan EX («Thermo electron corporation», США).

TUNEL-анализ. Клетки HepG2 рассеивали в 6-луночные планшеты («Corning») по $(5-7) \times 10^5$ клеток на лунку. На следующий день среду в лунках заменяли на среду с прогестероном, LS-01 или LS-02 в разных концентрациях. После инкубации клетки снимали раствором трипсина, промывали, фиксировали в 1%-ном (w/v) растворе параформальдегида в течение 15 мин на льду, промывали физиологическим раствором на фосфатном буфере (PBS) и заливали 70%-ным этанолом, после чего оставляли на ночь при –20 °C. На следующий день проводили анализ TUNEL с помощью набора APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, with Alexa Fluor® 488 Anti-BrdU («Invitrogen», A23210) в соответствии с инструкцией производителя. Клетки промывали, инкубировали в течение ночи при комнатной температуре в растворе, содержащем BrdUTP, терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу, реакционный буфер. После инкубации клетки отмывали промывочным буфером и обрабатывали час в темноте антителами Alexa Fluor™ 488 dye-labeled anti-BrdU, разведенными в 20 раз. Затем в пробирки добавляли буфер с йодистым пропидием и РНКазой А, через 30 мин измерялось количество клеток, провзаимодействовавших с мечеными антителами, на LSR Fortessa («BD Biosciences», США) методом проточной цитометрии.

Окраска конъюгатом аннексина V. Клетки рассеивали на 24-луночный планшет по 7×10^4 клеток на лунку. На следующий день клетки обрабатывали гормонами. После инкубации клетки снимали раствором трипсина, промывали холодным PBS и определяли апоптотические и некротические клетки с использованием набора Annexin V-FITC conjugate («Invitrogen», A13199). Апоптотическую и некротическую гибель клеток анализировали с помощью двойного окрашивания с аннексином V и йодидом пропидия (PI). Аннексин V связывается с апоптотическими клетками с экспонированным фосфатидилсеринем, в то время как PI метит клетки с повреждением мембраны. Окрашивание производили согласно рекомендациям производителя, как было описано ранее [16]. Процент апоптотических и некротических клеток определяли проточной цитофлуориметрией на каналах «FITC» и «PerCP-cy5-5 A» на приборе LSR Fortessa.

Определение экспрессии генов. После обработки клеток HepG2 гормонами из лунок удаляли культуральную среду, из клеток выделяли общую РНК, используя TRIzol («Invitrogen»).

Синтез кДНК проводили с помощью набора ImProm-II™ Reverse Transcription System («Promega»), согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 («Roche», Германия) с использованием реагентов, включающих интеркалирующий краситель SYBR Green I («Синтол», Россия). Используемые для ПЦР специфические праймеры приведены в таблице в Приложении. Праймеры подбирались с учетом экзон-интронной структуры генов так, чтобы не образовывалось ампликонов на геномной ДНК в выбранных условиях ПЦР. В случае, когда ген имел только один экзон, препарат РНК перед синтезом кДНК обрабатывали RQ1 RNase-Free DNase («Promega»). Были использованы следующие условия амплификации: инкубация при 95 °С – 5 мин; далее 40 циклов: 95 °С – 10 с, 58 °С – 15 с, 72 °С – 20 с; плавление 72–95 °С. Каждый образец анализировали в трех повторах. Уровень экспрессии мРНК изучаемых генов нормировался на уровень мРНК референсного гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*), а затем – на контрольный образец для относительного количественного определения с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ [16].

Иммуноблоттинг. Для определения рецепторов клетки HepG2 лизировали с помощью реагента CellLytic™ M («Sigma-Aldrich Corporation») с добавлением ингибитора MS-SAFE Protease and Phosphatase inhibitor («Sigma-Aldrich Corporation»). Белки прогревали в буфере с SDS и разделяли в 13,5%-ном ПААГ, переносили на мембраны («GE Healthcare Life Sciences», США и «Amersham», Германия), которые обрабатывали 60 мин раствором PBS-T (PBS и 0,1% (v/v) Tween 20), содержащим 5% блокирующего агента (ECL Advance Blocking Agent, «GE Healthcare Life Sciences»). Затем мембраны инкубировали с антителами к mPR α (ab75508), к mPR β (ab123693) и к mPR γ (ab79517) («Abcam», США), разведенными соответственно в 500, 100 и 500 раз. Инкубацию проводили в течение ночи, затем мембраны промывали и обрабатывали (60 мин) вторичными антителами козы к IgG (H + L) кролика в разведении 10 000, после чего промывали PBS-T. Хемилюминесценцию измеряли на приборе ChemiDoc MP system («Bio-Rad», США) с использованием реагента ECL SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate («Thermo Scientific»). Для повторного использования мембраны обрабатывали в соответствии с протоколом «Western blot membrane stripping for restaining protocol» («Abcam») и инкубировали с антителами

Anti-GAPDH antibody G9545 («Sigma-Aldrich Corporation») с повторением описанной выше процедуры.

Для определения активирующего фосфорилирования киназ под действием гормонов клетки подвергали воздействию прогестерона и селективных лигандов mPRs в концентрации 20 мкМ в течение 40 мин. Далее их лизировали в реагенте, описанном ранее. Белки перед нанесением на 13,5%-ный ПААГ прогревали при 50 °С 15 мин, разделяли электрофорезом и переносили на мембраны. После обработки блокирующим раствором, содержащим 5% блокирующего агента на TBST (физиологический раствор на основе Tris-буфера, содержащий 0,1% (v/v) Tween 20), мембраны инкубировали с первичными антителами либо к активированным изоформам JNK (monoclonal anti-JNK, activated (diphosphorylated JNK), J4750), либо ко всем изоформам JNK (Anti-JNK antibody, SAB4200176), либо к фосфо-p38 MAPK [Phospho-p38 MAPK (Thr180, Tyr182), S.417.1, («Invitrogen»), либо к p38 MAPK (Anti-p38 MAPK antibody SAB4500490)] при 4 °С в течение ночи. Затем мембраны промывали TBST, инкубировали (60 мин) со вторичными антителами козы к IgG (H + L) кролика или мыши в разведении 10 000, опять промывали TBST и измеряли хемилюминесценцию на приборе ChemiDoc MP system.

Статистическая обработка результатов. Статистический обсчет данных проводился в программе GraphPad Prism 6.01 («GraphPad Software», США). Результаты измерений на гистограммах даны как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Оценку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с поправкой на множественные сравнения Даннетта. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия рецепторов прогестерона в клетках HepG2 гепатоцеллюлярной карциномы человека. В клетках HepG2 была изучена экспрессия генов *PGR* ядерных рецепторов прогестерона и *PAQR 7*, *PAQR 8* и *PAQR 5* трех мембранных рецепторов: mPR α , mPR β , mPR γ . Результаты экспериментов представлены на рис. 1, а. Средние значения уровня мРНК *PAQR 7* (mPR α) составляли 23% от уровня мРНК референсного гена *GAPDH*, мРНК *PAQR 8* (mPR β) – 579%, мРНК *PAQR 5* (mPR γ) – 17%, мРНК *PGR* (nPR) практически не выявлялась. Таким образом, в клетках HepG2 преимущественно экспресси-

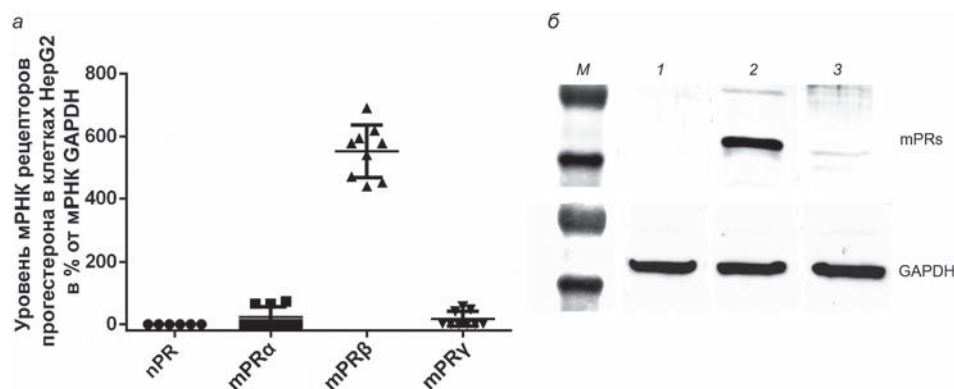


Рис. 1. Изучение экспрессии генов и содержания белков, рецепторов прогестерона, в HepG2-клетках. *a* – Содержание мРНК *PGR* (nPR) и мРНК *PAQR 7*, *PAQR 8* и *PAQR 5* (mPRα, mPRβ, mPRγ) в клетках HepG2 в процентах от мРНК *GAPDH*. *б* – Иммуноблоттинг лизатов клеток HepG2 после инкубации: 1 – с первичными антителами (АТ) к mPRα, 2 – с первичными АТ к mPRβ, 3 – с первичными АТ к mPRγ и АТ к референсному белку (*GAPDH*). mPRs – 40 кДа; *GAPDH* – 36 кДа; *M* – маркеры 50 кДа и 34 кДа

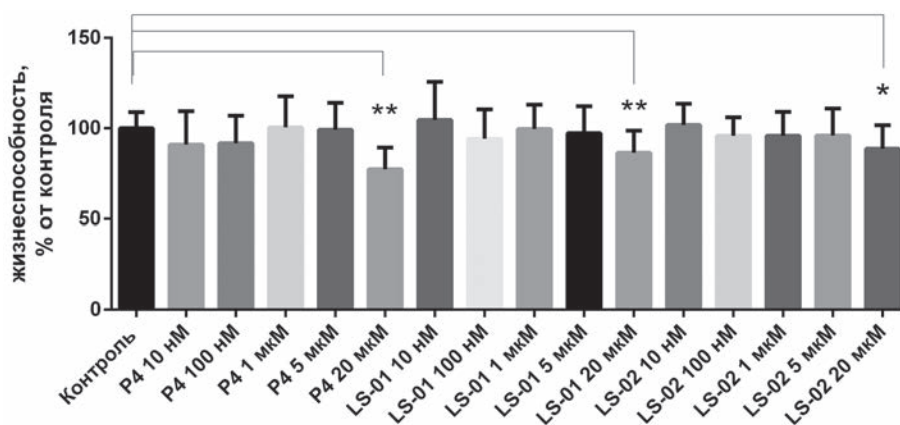


Рис. 2. Действие разных концентраций прогестерона (P4) и селективных лигандов LS-01 и LS-02 на жизнеспособность клеток HepG2, определенную с помощью теста ХТТ. Результаты измерений представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Отмечено достоверное отличие от контрольных значений: * $p = 0,0011$; ** $p < 0,0001$

руется субтип mPRβ. Результаты иммуноблоттинга, приведенные на рис. 1, б, подтверждают этот вывод.

Действие прогестерона и селективных лигандов mPRs на жизнеспособность клеток HepG2 в ХТТ-тесте. Клетки HepG2 были обработаны прогестероном и селективными лигандами в течение 24, 48 и 72 ч. В экспериментах с инкубацией 24 и 48 ч достоверного эффекта гормонов выявлено не было (данные не представлены). На рис. 2 продемонстрированы результаты статистической обработки ХТТ-теста шести независимых экспериментов: прогестерон (P4) снижал жизнеспособность клеток HepG2 на 23% ($p < 0,0001$), LS-01 – на 14% ($p < 0,0001$), LS-02 – на 12% ($p = 0,0011$) при концентрациях 20 мкМ через 72 ч инкубации с гормонами.

Действие прогестерона и селективных лигандов mPRs на фрагментацию ДНК клеток HepG2 в TUNEL-тесте. В работе изучалось действие трех стероидов на фрагментацию ДНК.

На рис. 3 представлена гистограмма статистического обобщения результатов экспериментов исследования клеток с фрагментацией ДНК методом TUNEL-анализа. Можно видеть, что через 72 ч инкубации достоверных эффектов гормонов в сравнении с контролем не обнаружено (по результатам 7 независимых экспериментов).

Эффект прогестерона и селективных лигандов LS-01 и LS-02 на связывание клетками HepG2 аннексина V и проницаемость к йодиду пропидия. Через 72 ч инкубации прогестерон достоверно вызывал повышение связывания аннексина V клетками HepG2, но при этом снижал количество клеток, проницаемых для PI (рис. 4 и 5). Селективные лиганды обладали таким же, но менее выраженным действием (рис. 5 и 6). В сравнении с контролем количество всех клеток, которые связывали аннексин V, в присутствии 5 мкМ прогестерона увеличивалось в 2 раза ($p = 0,044$), в присутствии 20 мкМ – в 4,5 раза ($p < 0,0001$).

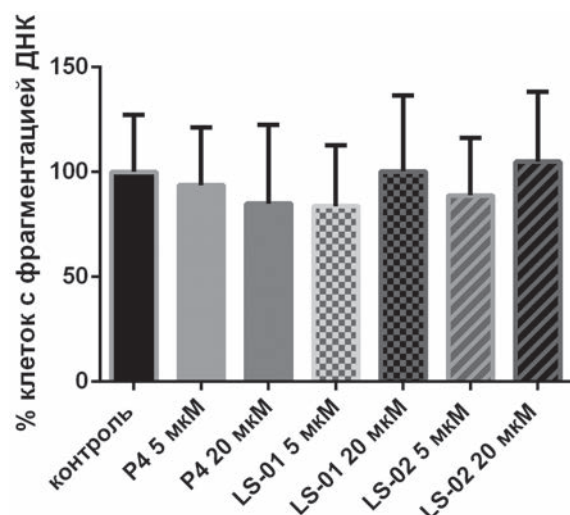


Рис. 3. Действие прогестерона (P4) и селективных лигандов LS-01 и LS-02 на фрагментацию ДНК клеток HepG2, определенную с помощью TUNEL-теста. Результаты измерений представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение

LS-01 в концентрации 5 мкМ повышал количество таких клеток в 1,3 раза, в концентрации 20 мкМ — в 2,2 раза ($p = 0,0136$). LS-02 в концентрации 5 мкМ повышал количество таких клеток в 1,2 раза, в концентрации 20 мкМ — в 2,2 раза ($p < 0,0001$) (рис. 5, а). Среди всех

клеток, связывающих аннексин V, под действием прогестерона увеличивалось количество тех из них, которые были непроницаемы для PI (рис. 5, б), при 5 мкМ — в 2,7 раза и при 20 мкМ — в 15 раз ($p < 0,0001$); а тех, которые одновременно связывали аннексин V и были проницаемы для PI (рис. 5, в), при 5 мкМ — в 1,9 раза ($p = 0,0005$) и при 20 мкМ — в 3,2 раза ($p < 0,0001$). Под действием LS-01 среди всех клеток, связывающих аннексин V, увеличивалось количество тех из них, которые были непроницаемы для PI (рис. 5, б), при 5 мкМ — в 1,9 раза и при 20 мкМ — в 3,5 раза ($p = 0,0302$); а тех, которые одновременно связывали аннексин V и были проницаемы для PI (рис. 5, в), при 5 мкМ — в 1,3 раза и при 20 мкМ — в 2 раза ($p = 0,0002$). Наконец, под действием LS-02 среди всех клеток, связывающих аннексин V, увеличивалось количество тех из них, которые были непроницаемы для PI, при 5 мкМ — в 1,4 раза и при 20 мкМ — в 3,1 раза ($p = 0,0839$); а тех, которые одновременно связывали аннексин V и были проницаемы для PI, при 5 мкМ — в 1,2 раза и при 20 мкМ — в 2,1 раза ($p < 0,0001$) (рис. 5, б и в). Наоборот, количество всех клеток, проницаемых для PI, снижалось под действием 20 мкМ прогестерона на 22% ($p = 0,0004$), под действием LS-01

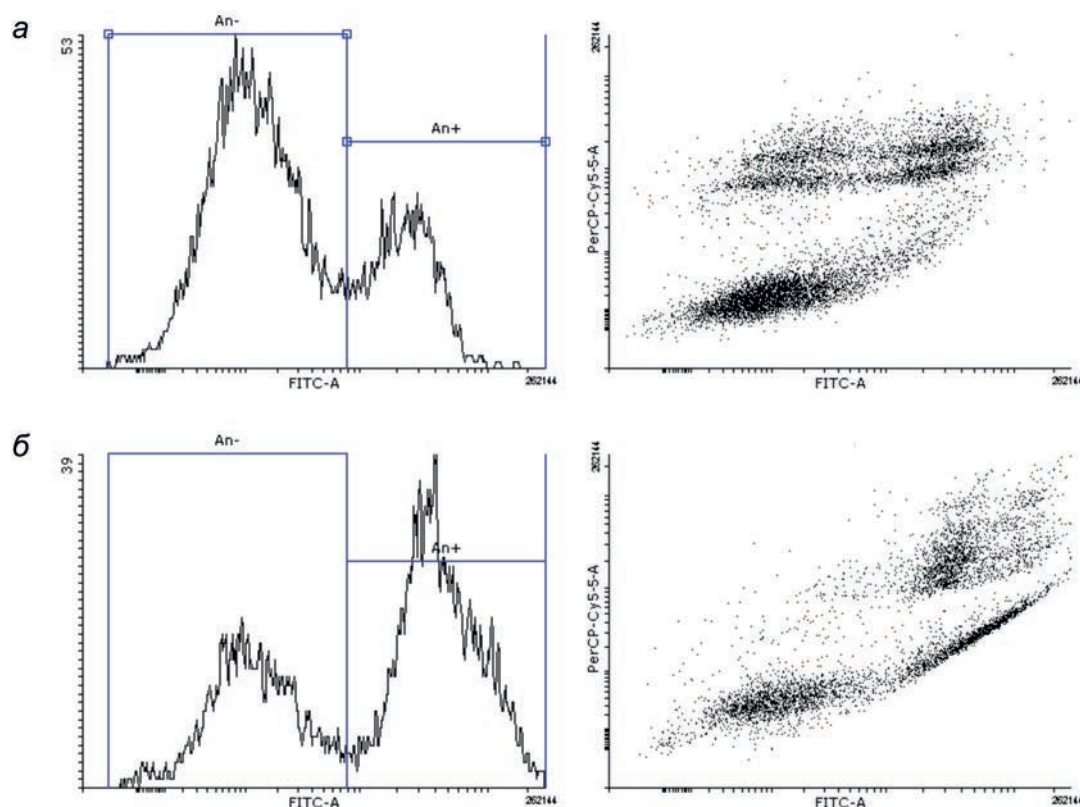


Рис. 4. Графики и точечные диаграммы распределения клеток HepG2 в эксперименте по связыванию меченого аннексина V и окраске их PI в контроле (а) и после инкубации с 20 мкМ прогестерона в течение 72 ч (б). An— — пик клеток, не взаимодействующих с аннексином V; An+ — пик клеток, связывающих аннексин V

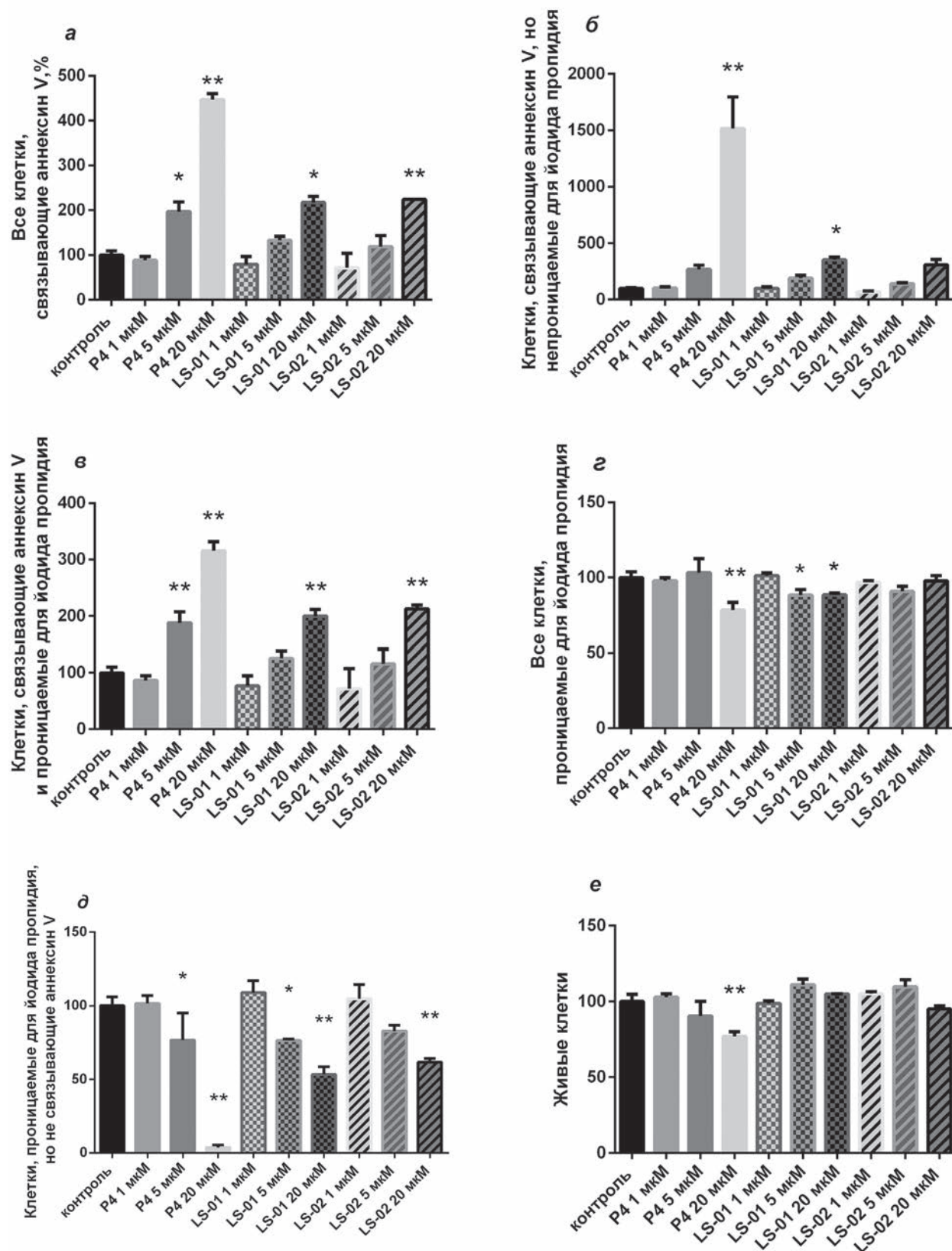


Рис. 5. Действие прогестерона (P4) и селективных лигандов LS-01 и LS-02 в разных концентрациях на все клетки, связывающие аннексин V (а); на клетки, связывающие аннексин V, но непроницаемые для PI (б); на клетки, одновременно связывающие аннексин V и проницаемые для PI (в); на все клетки, проницаемые для PI (г); на клетки, которые не связывают аннексин V, но проницаемы для PI (д); на живые, незатронутые апоптозом и некрозом клетки (е). Результаты даны в процентах от количества соответствующих клеток в контроле и представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Отмечено достоверное отличие от контрольных значений: * $0,014 \leq p \leq 0,044$; ** $p \leq 0,0005$

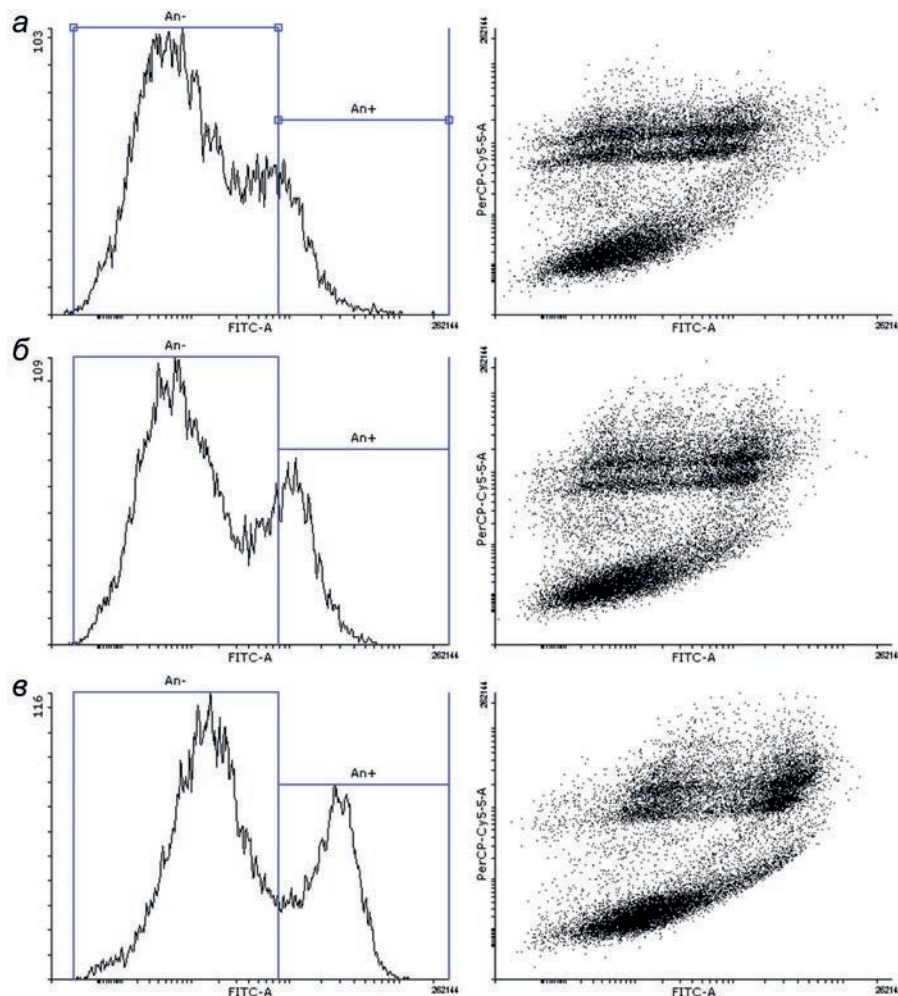


Рис. 6. Графики и точечные диаграммы распределения клеток HepG2 в эксперименте по связыванию меченого аннексина V и окраске их PI в контроле (а), после инкубации с 5 мкМ (б) и с 20 мкМ (в) LS-01 в течение 72 ч. An– — пик клеток, не взаимодействующих с аннексином V; An+ — пик клеток, связывающих аннексин V

в концентрации 5 мкМ — на 12% ($p = 0,0358$), в концентрации 20 мкМ — на 12% ($p = 0,0403$) (рис. 5, з). Такое снижение происходило за счет клеток, которые не связывали аннексин V, но были проницаемы для PI. Под действием 5 мкМ прогестерона количество таких клеток снижалось на 23% ($p = 0,0226$), под действием 20 мкМ прогестерона — на 96% ($p < 0,0001$), под действием 5 мкМ LS-01 — на 24% ($p = 0,0215$), 20 мкМ LS-01 — на 47% ($p = 0,0001$), а под действием 5 мкМ LS-02 — на 17%, 20 мкМ LS-02 — на 38% ($p = 0,0005$) (рис. 5, д). В результате количество живых, незатронутых апоптозом и некрозом клеток достоверно снижалось только под действием 20 мкМ прогестерона на 23% ($p = 0,0003$) (рис. 5, е).

Определение изменения экспрессии генов в клетках HepG2 под действием прогестерона, LS-01 и LS-02. На экспрессию генов выбранных маркеров пролиферации и факторов апоптоза достоверное влияние оказывает проге-

стерон (рис. 7). Исключением является ген, кодирующий PCNA, экспрессия которого достоверно ингибируется только LS-01 в концентрации 20 мкМ — на 18% от значений в контроле ($p = 0,0463$). Прогестерон в двух изученных концентрациях (5 и 20 мкМ) снижает уровень мРНК белка Ki67 на 67% ($p < 0,0001$) и 96% ($p < 0,0001$) соответственно, повышает мРНК белка p21 на 52% ($p = 0,0002$) и 88% ($p < 0,0001$) соответственно; в концентрации 20 мкМ прогестерон снижает уровень мРНК белка циклин D1 — на 64% ($p < 0,0001$). На экспрессию факторов апоптоза прогестерон оказывает преимущественно ингибирующее действие, за исключением гена белка HRK (Harakiri), экспрессия которого повышается в 7 раз ($p < 0,0001$) в присутствии 20 мкМ этого стероида. В этой концентрации прогестерон подавляет экспрессию проапоптотических факторов: каспазы 9 — на 33% ($p = 0,0164$), BAX — на 62% ($p < 0,0001$), BAD — на 31% ($p = 0,0001$). Снижение экс-

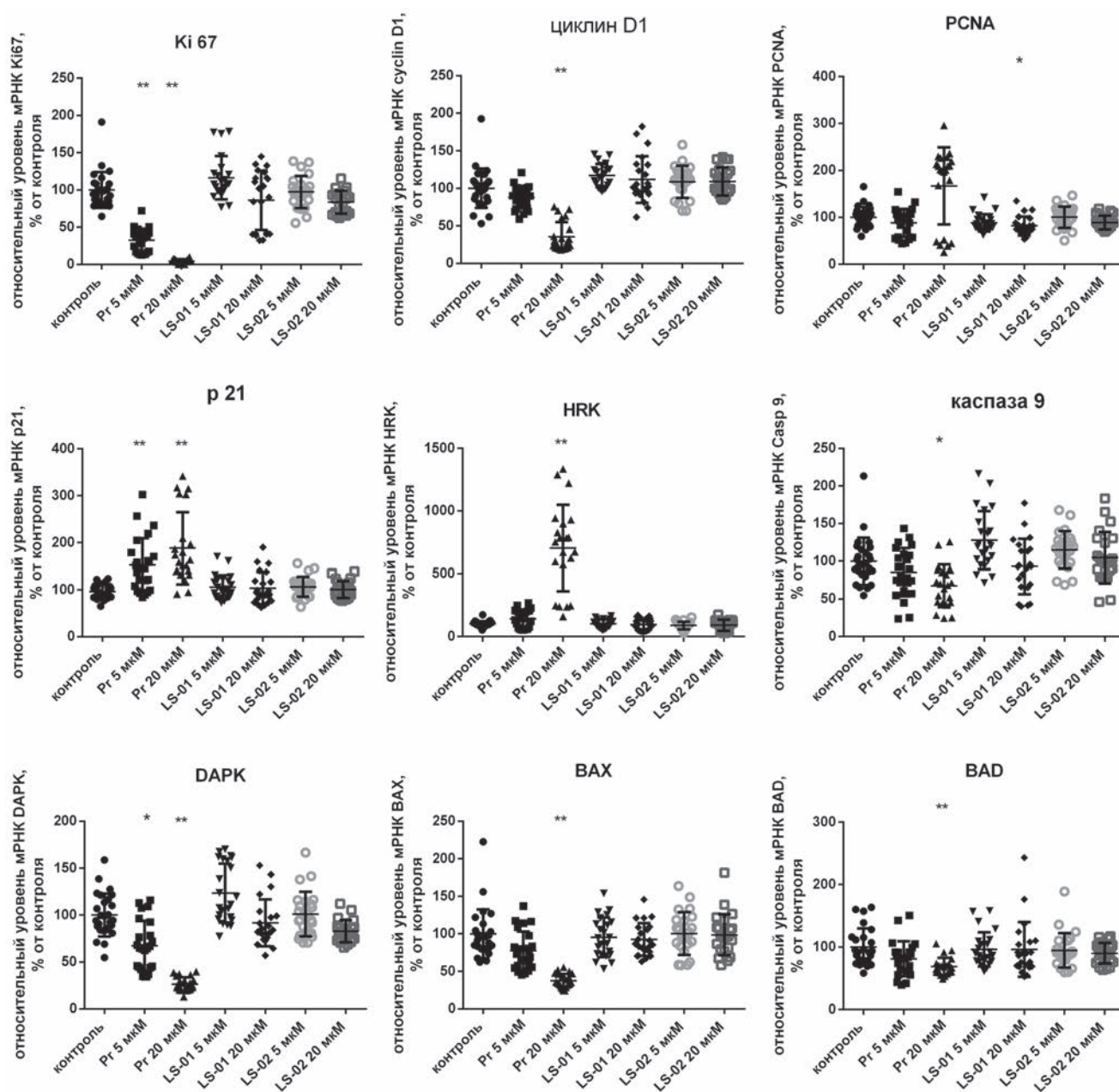


Рис. 7. Регуляция прогестероном (P4) и соединениями LS-01и LS-02 уровня экспрессии генов факторов, связанных с пролиферацией и апоптозом, в клетках НерG2. Определение содержания мРНК проводилось методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени, приведено значение среднего $\pm$ среднего отклонения. Отмечено достоверное отличие от контрольных значений: * $0,013 \leq p \leq 0,046$; ** $p \leq 0,0002$

прессии гена проапоптотического фактора DAPK происходит уже при 5 мкМ — на 33% ($p = 0,0013$), при 20 мкМ — на 73% ($p < 0,0001$). Селективные лиганды на экспрессию генов факторов апоптоза не оказывали достоверного действия. В работе изучалась также экспрессия гена фактора Bcl2A1. Все три исследуемых стероида не оказывали влияния на уровень мРНК этого антиапоптотического белка (данные не показаны).

Действие прогестерона и селективных лигандов mPRs на активирующее фосфорилиро-

вание p38 MAPK и JNK. На рис. 8 представлены репрезентативные данные одного из трех экспериментов по изучению активирующего фосфорилирования двух киназ под действием 20 мкМ прогестерона, LS-01 и LS-02. По результатам денситометрии соотношение фосфо-p38/p38 MAPK в контроле (рис. 8, дорожка 1) и под действием всех трех стероидов (рис. 8, дорожки 2–4) практически не менялось. Соотношение фосфо-JNK/JNK повышалось для первой изоформы в 1,9 раза под действием прогестерона (2), в 1,5 раза —

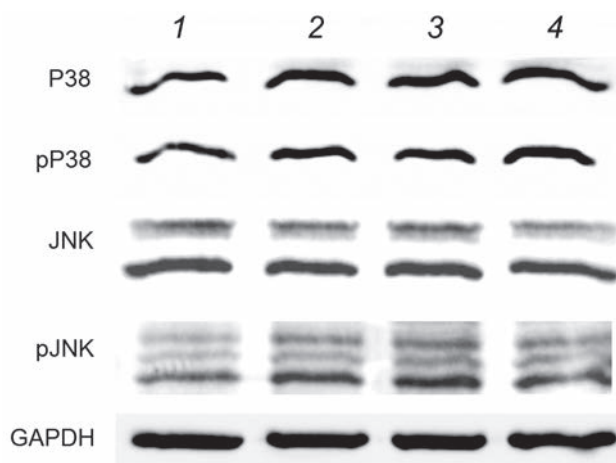


Рис. 8. Эффект прогестерона, LS-01 и LS-02 на активирующее фосфорилирование p38 MAPK и JNK в клетках HepG2. Дорожки: 1 – контроль, 2 – действие 20 мкМ прогестерона, 3 – действие 20 мкМ LS-01, 4 – действие 20 мкМ LS-02

под действием LS-01 (3) и в 1,7 раза – под действием LS-02; для второй и третьей изоформ суммарно – в 2 раза (2), в 1,7 раза (3) и в 2,2 раза (4) соответственно. Таким образом, все изучаемые соединения в клетках HepG2 активировали все изоформы JNK, но не влияли на активность p38 MAPK.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Действие прогестерона и его производных в значительной мере определяется составом рецепторов прогестерона, а также фенотипом данной конкретной клетки. В настоящей работе было изучено действие прогестерона и селективных лигандов mPRs (LS-01 и LS-02) в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Это действие осуществляется преимущественно через субтип mPR β , поскольку уровень мРНК mPR β составлял 579% от мРНК референсного гена, в то время как для других мембранных рецепторов он не превышал 23%, а уровень мРНК nPR был равен нулю (рис. 1, а). Следует отметить, что такого высокого уровня экспрессии гена *PAQR8* мы не обнаружили ни в одной из 16 исследованных ранее клеточных культур, максимальными были значения 154% – в клетках LN229 и 112% – в клетках U87MG, в других линиях уровень мРНК составлял 10–50% от мРНК референсного гена [13]. Методом иммуноблоттинга также были выявлены белки этого рецептора, в то время как белки mPR α и mPR γ практически не были обнаружены (рис. 1, б).

Сродство LS-01 и LS-02 к мембранным рецепторам изучалось с использованием клеток

VxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека с преимущественной экспрессией mPR α и mPR γ (270% и 283% от уровня мРНК референсного гена соответственно) и отсутствием nPRs. Оно было ниже, чем сродство прогестерона к этим рецепторам [14]. Как было показано в этой работе, в линии HepG2 содержание mPR α и mPR γ очень мало, мРНК nPRs не была обнаружена. Сродство селективных лигандов к mPR β не определялось. Важно было выяснить, могут ли наши селективные лиганды регулировать функции клеток через mPR β . Клетки HepG2 оказались наиболее подходящими для этой цели. Было обнаружено, что взаимодействие LS-01 и LS-02 с этим субтипом mPRs происходит, судя по эффектам этих соединений на активацию JNK, стимуляцию связывания клетками меченого аннексина V и на торможение некротических изменений, вызывающих проницаемость мембран. Поскольку прогестерон действует сильнее, чем селективные лиганды, можно предположить, что и к субтипу mPR β сродство прогестерона выше, чем сродство его производных. Действие изучаемых стероидов в клетках HepG2 было антипролиферативным и проапоптотическим. Изучаемые соединения подавляли жизнеспособность клеток (рис. 2), стимулировали апоптотические изменения в их мембранах (рис. 4–6). Действие всех трех стероидов приводило к активации всех изоформ JNK, при этом активирующего фосфорилирования p38 MAPK обнаружено не было (рис. 8).

Интересно было сравнить действие изучаемых стероидов в клетках HepG2 с преимущественной экспрессией mPR β с их эффектами в клетках VxPC3, где наблюдалась преимущественная экспрессия mPR α и mPR γ . В обоих типах клеток мРНК nPR не была обнаружена. В результате исследования мы показали, что эффекты изучаемых соединений разнятся в клеточных линиях HepG2 и VxPC3, но имеют общую направленность [16]. В клетках HepG2 достоверное снижение жизнеспособности наблюдалось при максимальных используемых концентрациях всех трех стероидов, тогда как жизнеспособность клеток VxPC3 подавлялась достоверно только под действием прогестерона и LS-01, а LS-02 не влиял на жизнеспособность клеток VxPC3 в ХТТ-тесте. Наличие одного субтипа mPR приводит к более универсальному действию изучаемых прогестиннов. В линии HepG2 нет такого разнообразного действия трех стероидов, которое наблюдалось в VxPC3-клетках. Там эффекты LS-02 существенно отличались от эффектов прогестерона и соединения LS-01, видимо, из-за очень

высокой экспрессии сразу двух субтипов mPRs, к которым три изучаемых стероида могут иметь разное сродство.

Значительно отличалось действие прогестерона и селективных лигандов mPRs в клеточных линиях HepG2 и VxPC3 и на фрагментацию ДНК ядер. В линии VxPC3 прогестерон и LS-01 достоверно и значительно (в 3–3,5 раза) увеличивали количество клеток с фрагментацией ДНК ядер, а LS-02 — в 2,2 раза. Главным посредником в этом действии оказалась p38 MAPK. В клетках HepG2 мы не обнаружили ни достоверного изменения этого параметра, ни активации p38 MAPK под действием изучаемых соединений.

Действие прогестерона и селективных лигандов было, наоборот, более выраженным в клетках HepG2 на ранние стадии апоптоза, выявляемые по связыванию меченого аннексина V. В клетках VxPC3 через 72 ч после инкубации с гормонами не было достоверных изменений в количестве апоптотических клеток и клеток с признаками некроза в сравнении с контролем. Наоборот, в линии HepG2 все 3 стероида, а особенно мощно прогестерон, увеличивали количество клеток с фосфатидилсерином на наружной мембране, связывающим аннексин V. Но при этом все 3 стероида, а особенно сильно прогестерон, снижали количество некротических клеток, мембраны которых проницаемы для йодида пропидия. Клетки линии HepG2 растут кластерами, не формируя монослой, в отличие от клеток линии VxPC3. При отсутствии гормонов в течение 72 ч в среде с бесстероидной сывороткой (DFBS) среди клеток HepG2 появлялась значительная популяция с признаками некротической гибели (т.е. клетки, мембраны которых проницаемы для PI). Возможно, это происходило за счет кластерного роста клеток, снижения доступности питательных веществ и/или кислорода для нижних слоев. В присутствии изучаемых стероидов рост клеток существенно замедлялся, особенно в присутствии прогестерона. Через 72 ч инкубации с гормонами клеток в лунках было значительно меньше, чем в контроле. Поэтому нижние слои страдали меньше от недостатка питательных веществ или гипоксии, некроз был выражен слабее. При этом стероиды вызывали в клетках процесс апоптотической гибели, ранние стадии которой выявлялись через 72 ч по связыванию с меченым аннексином V.

Для изучения экспрессии генов под действием прогестерона и селективных лигандов были выбраны маркеры пролиферации и факторы апоптоза, регуляцию которых мы обна-

ружили в клетках VxPC3 на уровне транскрипции. В линии HepG2 прогестерон подавлял экспрессию гена маркера пролиферации белка Ki67, циклина D1, повышал экспрессию ингибитора 1A циклин-зависимой киназы — p21. Аналогично он действовал и в клетках VxPC3. Однако эффектов LS-01 и LS-02 не было обнаружено. Возможно, активация mPR β под действием лигандов, взаимодействующих с меньшим сродством, оказалась недостаточной для проявления этого действия. Эффекты прогестерона на экспрессию генов факторов, связанных с апоптотическим процессом в клетках, оказались неожиданными. В клетках HepG2 этот гормон повышал экспрессию гена проапоптотического белка HRK (Harakiri) — белка, взаимодействующего с Bcl2, но снижал экспрессию генов других проапоптотических факторов — BAX, BAD, каспазы 9 и DAPK — протеинкиназы 1, ассоциированной со смертью (Death-associated protein kinase 1), притом что суммарный эффект на процесс апоптоза был стимулирующим. Можно предположить, что на экспрессию некоторых генов прогестерон в высоких концентрациях может действовать, активируя ядерные рецепторы глюкокортикоидов. Глюкокортикоиды действуют на гепатоциты человека и крысы, ингибируя процесс апоптоза и способствуя их выживаемости [22, 23]. Прогестерон через глюкокортикоидные рецепторы может влиять на экспрессию генов, чувствительных к этим гормонам. Селективные лиганды не взаимодействуют с ядерными рецепторами стероидных гормонов, поскольку у них отсутствует 3-кето/3-гидроксигруппа в структуре А-кольца, принципиально важная для такого взаимодействия [9, 24, 25]. Результирующее действие селективных лигандов и самого прогестерона в клетках HepG2 на жизнеспособность и апоптоз, выявляемый по появлению фосфатидилсерины на наружной мембране клеток, противоположно действию глюкокортикоидов на гепатоциты. Можно предположить, что в данном случае главное действие этих соединений направлено не на изменение транскрипции генов, а на посттранскрипционную активирующую модификацию самих белков — факторов апоптоза, которая описана в литературе [26–29]. По-видимому, это действие на посттранскрипционном уровне перекрывает побочный эффект активации прогестероном других стероидных рецепторов.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 с высоким уровнем mPR β прогестерон и селективные лиганды, активируя сигнальный

каскад с участием JNK, действуют подавляюще на процесс пролиферации клеток, стимулируют экспонирование фосфатидилсерина на наружной мембране клеток HepG2, что является ранней стадией апоптотических изменений. При этом замедляются процессы некротических изменений в изучаемых клетках, возможно, за счет подавления пролиферации и снижения давления на нижние слои верхних клеток в формируемых ими кластерах. На более поздние стадии апоптоза влияния LS-01, LS-02 и прогестерона выявлено не было в изученном промежутке времени. Поскольку перечисленные эффекты были вызваны не только прогестероном, но и селективными лигандами mPRs, действие это обусловлено активацией mPR β . В изучаемых HepG2-клетках все стероиды действовали однотипно, в отличие от клеток VxPC3, что также подтверждает их взаимодействие только с одним типом рецепторов. Действие прогестина на клетки HepG2, по-видимому, является специфическим именно для данного фенотипа, поскольку в первичной культуре клеток миометрия, например, действие гормона через mPR α и mPR β сопровождалось активацией p38 MAPK и приводило к фосфорилированию легких цепей миозина и сократительной активности миометрия [18].

Таким образом, мы показали, что mPR β в клетках гепатоцеллюлярной карциномы при взаимодействии с лигандами активируют сигнальный каскад, в котором принимает участие JNK, что приводит к снижению пролиферативной активности и стимуляции апоптотических процессов в этих клетках. Соедине-

ния LS-01 и LS-02 регулируют функции этих клеток, но для усиления этого действия необходимы дальнейшие поиски эффективного лиганда, обладающего сродством к данным рецепторам, сопоставимым со сродством прогестерона, но при этом не взаимодействующего с ядерными рецепторами прогестерона и других стероидов.

Вклад авторов. Щелкунова Т.А. — концепция и руководство работой; Щелкунова Т.А., Морозов И.А., Гончаров А.И. — проведение экспериментов; Левина И.С., Кузнецов Ю.В., Заварзин И.В. — химический синтез соединений LS-01 и LS-02; Щелкунова Т.А., Левина И.С., Морозов И.А., Рубцов П.М., Смирнова О.В. — обсуждение результатов исследования; Щелкунова Т.А. — написание текста; Щелкунова Т.А., Левина И.С., Морозов И.А., Рубцов П.М., Смирнова О.В. — редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-015-00092-а) и Российского научного фонда (грант № 23-25-00071, <https://rscf.ru/project/23-25-00071/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Щелкунова Т. А., Морозов И. А. (2015) Молекулярные основы и тканевая специфичность действия прогестина, *Мол. Биол.*, **49**, 728-748, doi: 10.7868/S0026898415050158.
2. González-Orozco, J. C., Hansberg-Pastor, V., Valadez-Cosmes, P., Nicolas-Ortega, W., Bastida-Beristain, Y., Fuente-Granada, M., González-Arenas, A., and Camacho-Arroyo, I. (2018) Activation of membrane progesterone receptor- α increases proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **477**, 81-89, doi: 10.1016/j.mce.2018.06.004.
3. Xiao, J., Chen, X., Lu, X., Xie, M., He, B., He, S., You, S., and Chen, Q. (2020) Progesterone/Org inhibits lung adenocarcinoma cell growth via membrane progesterone receptor α , *Thorac. Cancer*, **11**, 2209-2223, doi: 10.1111/1759_7714.13528.
4. Diep, C. H., Daniel, A. R., Mauro, L. J., Knutson, T. P., and Lange, C. A. (2015) Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers, *J. Mol. Endocrinol.*, **54**, R31-R53, doi: 10.1530/jme-14-0252.
5. Gustafsson, J. A., (2016) Historical overview of nuclear receptors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **157**, 3-6, doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.03.004.
6. Zhu, Y., Bond, J., and Thomas, P. (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterone receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2237-2242, doi: 10.1073/pnas.0436133100.
7. Thomas, P., Pang, Y., Camilletti, M. A., and Castelnovo, L. F. (2022) Functions of membrane progesterone receptors (mPRs, PAQRs) in nonreproductive tissues, *Endocrinology*, **163**, bqac147, doi: 10.1210/endo/bqac147.

8. Thomas, P. (2022) Membrane progesterone receptors (mPRs, PAQRs): review of structural and signaling characteristics, *Cells*, **11**, 1785, doi: 10.3390/cells11111785.
9. Kelder, J., Pang, Y., Dong, J., Schaftenaar, G., and Thomas, P. (2022) Molecular modeling, mutational analysis and steroid specificity of the ligand binding pocket of mPR α (PAQR7): shared ligand binding with AdipoR1 and its structural basis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **219**, 106082, doi: 10.1016/j.jsbmb.2022.106082.
10. Jyoti, M. M. S., Rana, M. R., Ali, M. H., and Tokumoto, T. (2022) Establishment of a steroid binding assay for membrane progesterone receptor alpha (PAQR7) by using graphene quantum dots (GQDs), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **592**, 1-6, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.01.002.
11. Acharjee, M., Ali, M. H., Jyoti, M. M. S., Rezanujjaman, M., Hassan, M. M., Rana, M. R., Hossain, M. F., Kodani, S., and Tokumoto, T. (2022) The antagonistic activity of *Padina arborescens* extracts on mPR α , *Nat. Prod. Res.*, **37**, 1872-1876, doi: 10.1080/14786419.2022.2120873.
12. Levina, I. S., Kuznetsov, Y. V., Shchelkunova, T. A., and Zavarzin, I. V. (2021) Selective ligands of membrane progesterone receptors as a key to studying their biological functions *in vitro* and *in vivo*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **207**, 105827, doi: 10.1016/j.jsbmb.2021.105827.
13. Goncharov, A. I., Maslakova, A. A., Polikarpova, A. V., Bulanov, E. A., Guseva, A. A., Morozov, I. A., Rubtsov, P. M., Smirnova, O. V., and Shchelkunova, T. A. (2017) Progesterone inhibits proliferation and modulates expression of proliferation-Related genes in classical progesterone receptor-negative human BxPC3 pancreatic adenocarcinoma cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **165**, 293-304, doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.07.007.
14. Polikarpova, A. V., Maslakova, A. A., Levina, I. S., Kulikova, L. E., Kuznetsov, Y. V., Guseva, A. A., Shchelkunova, T. A., Zavarzin, I. V., and Smirnova, O. V. (2017) Selection of progesterone derivatives specific to membrane progesterone receptors, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 140-148, doi: 10.1134/S0006297917020055.
15. Левина И. С., Щелкунова Т. А., Поликарпова А. В., Кузнецов Ю. В., Заварзин И. В. (2021) Синтез 19-гидроксипрегн-4-ен-20-она и 19-гидрокси-5 β -прегн-3-ен-20-она, селективно связывающихся с мембранными рецепторами прогестерона, и оценка их иммуномодуляторных эффектов, *Изв. АН Сер. Хим.*, **11**, 2227-2232, doi: 10.1007/s11172-021-3337-6.
16. Гончаров А. И., Левина И. С., Шляпина В. Л., Морозов И. А., Рубцов П. М., Заварзин И. В., Смирнова О. В., Щелкунова Т. А. (2021) Цитотоксические эффекты селективных лигандов мембранных рецепторов прогестерона в клетках BxPC3 аденокарциномы поджелудочной железы человека, *Биохимия*, **86**, 1702-1718, doi: 10.31857/S0320972521110087.
17. Kasubuchi, M., Watanabe, K., Hirano, K., Inoue, D., Li, X., Terasawa, K., Konishi, M., Itoh, N., and Kimura, I. (2017) Membrane progesterone receptor beta (mPR β /Paqr8) promotes progesterone-dependent neurite outgrowth in PC12 neuronal cells via non-G protein-coupled receptor (GPCR) signaling, *Sci. Rep.*, **7**, 5168, doi: 10.1038/s41598-017-05423-9.
18. Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E. W., Randeva, H. S., and Thomas, P. (2006) Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term, *Mol. Endocrinol.*, **20**, 1519-1534, doi: 10.1210/me.2005-0243.
19. Sinreih, M., Knific, T., Thomas, P., Grazio, S. F., and Rižner, T. L. (2018) Membrane progesterone receptors β and γ have potential as prognostic biomarkers of endometrial cancer, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **178**, 303-311, doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.01.011.
20. Büscher, U., Chen, F. C., Kentenich, H., and Schmiady, H. (1999) Cytokines in the follicular fluid of stimulated and nonstimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? *Hum. Reprod.*, **14**, 162-166, doi: 10.1093/humrep/14.1.162.
21. Atif, F., Yousuf, S., and Stein, D. G. (2015) Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **146**, 62-73, doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.007.
22. Bailly-Maitre, B., Souse, G., Boulukos, K., Gugenheim, J., and Rahmani, R. (2001) Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction, *Cell Death Differ.*, **8**, 279-288, doi: 10.1038/sj.cdd.4400815.
23. Oh, H.-Y., Namkoong, S., Lee, S.-J., Por, E., Kim, C.-K., Billiar, T. R., Han, J. A., Ha, K. S., Chung, H. T., Kwon, Y. G., Lee, H., and Kim, Y. M. (2006) Dexamethasone protects primary cultured hepatocytes from death receptor-mediated apoptosis by up-regulation of cFLIP, *Cell Death Differ.*, **13**, 512-523, doi: 10.1038/sj.cdd.4401771.
24. Williams, S. P., and Sigler, P. B. (1998) Atomic structure of progesterone complexed with its receptor, *Nature*, **393**, 392-396, doi: 10.1038/30775.
25. Tanenbaum, D. M., Wang, Y., Williams, S. P., and Sigler, P. B. (1998) Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5998-6003, doi: 10.1073/pnas.95.11.5998.
26. Moldoveanu, T., and Czabotar, P. E. (2020) BAX, BAK, and BOK: a coming of age for the BCL-2 family effector proteins, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **12**, a036319, doi: 10.1101/cshperspect.a036319.

27. Kale, J., Osterlund, E. J., and Andrews, D. W. (2018) BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death, *Cell Death Differ.*, **25**, 65-80, doi: 10.1038/cdd.2017.186.
28. Morley, S. J., Coldwell, M. J., and Clemens, M. J. (2005) Initiation factor modifications in the preapoptotic phase, *Cell Death Differ.*, **12**, 571-584, doi: 10.1038/sj.cdd.4401591.
29. Roberts, J. Z., Crawford, N., and Longley, D. B. (2022) The role of ubiquitination in apoptosis and necroptosis, *Cell Death Differ.*, **29**, 272-284, doi: 10.1038/s41418-021-00922-9.

EFFECTS OF PROGESTERONE AND SELECTIVE LIGANDS OF MEMBRANE PROGESTERONE RECEPTORS IN HepG2 CELLS OF HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

T. A. Shchelkunova^{1*}, I. S. Levina², I. A. Morozov³, P. M. Rubtsov³, A. I. Goncharov¹, Yu. V. Kuznetsov², I. V. Zavarzin², and O. V. Smirnova¹

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: Shchelkunova-t@mail.ru

² Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

Progesterone exerts multiple effects in different tissues through nuclear receptors (nPRs) and through membrane receptors of the adiponectin and progestin receptor (mPRs) family. The effect of progesterone on cells through different types of receptors can vary significantly. At the same time, it affects the processes of proliferation and apoptosis in normal and tumor tissues in a dual way, stimulating proliferation and carcinogenesis in some tissues, suppressing them and stimulating cell death in others. In this study, we have shown the presence of a high level of mRNA and mPR β protein in HepG2 tumor cells of human hepatocellular carcinoma. Expression of other membrane and classical nuclear receptors was not detected. May be mPR β has an important function in HepG2 cells. The main goal of the work was to study the function of this protein and the mechanisms of its action in human hepatocellular carcinoma cells. Previously, we have identified selective mPRs ligands, compounds LS-01 and LS-02, which do not interact with nuclear receptors. Their employment allows differentiating the effects of progestins mediated by different types of receptors. The work studied the effects of progesterone, LS-01 and LS-02 on the proliferation and death of HepG2 cells, as well as the activating phosphorylation of two kinases, p38 MAPK and JNK, under the action of three steroids. It was shown that all three progestins after 72 hours of incubation with cells suppressed their viability and stimulated the appearance of phosphatidylserine on the outer surface of membranes, which was detected by binding to V-FITC annexin, but they did not affect DNA fragmentation of cell nuclei. Progesterone significantly reduced the expression of proliferation marker genes and stimulated the expression of the p21 protein gene, but had a suppressive effect on the expression of some proapoptotic factor genes. All three steroids activated JNK in these cells, but had no effect on p38 MAPK activity. The effects of progesterone and selective mPRs ligands in HepG2 cells were the same in terms of suppression of proliferation and stimulation of apoptotic changes in outer membranes, therefore, they were mediated through interaction with mPR β . JNK is a member of the signaling cascade activated in these cells by the studied steroids.

Keywords: progesterone, selective ligands of membrane progesterone receptors, proliferation, apoptosis, nuclear progesterone receptor, membrane progesterone receptor β , human HepG2 hepatocellular carcinoma cells

УДК 577

ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТА КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЛЁГКИХ ЧЕЛОВЕКА A549 С НОКАУТИРОВАННЫМ ГЕНОМ *PRIMPOL* НА ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС

© 2023 А.С. Громова^{1,2*}, Е.О. Болдино^{1,2*}, Д.В. Ким^{3,4}, Р.Н. Чупров-Неточин⁵,
С.В. Леонов^{5,6}, М.В. Пустовалова⁵, Д.О. Жарков^{3,4*}, А.В. Макарова^{1,2*}

¹ Институт молекулярной генетики, НИЦ Курчатовский институт,
123182 Москва, Россия; электронная почта: amakarova-img@yandex.ru

² Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: dzharkov@niboch.nsc.ru

⁴ Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

⁵ Московский физико-технический институт, школа биологической и медицинской физики,
141701 Долгопрудный, Россия

⁶ Институт биофизики клетки РАН, 142290 Пущино, Россия

Поступила в редакцию 09.12.2022

После доработки 08.08.2023

Принята к публикации 15.09.2023

ДНК-праймаза/ДНК-полимераза человека PrimPol синтезирует ДНК-праймеры *de novo* после остановки репликации в повреждённых участках ДНК, повышая толерантность клеток к повреждениям. Вклад PrimPol в ответ на конкретные типы ДНК-повреждений до конца неясен. В работе были получены клетки карциномы лёгкого A549 с нокаутом гена *PRIMPOL*, и охарактеризован их ответ на повреждения ДНК, вызванные перекисью водорода, метилметансульфонатом, цисплатином, блеомицином и ионизирующим излучением. Нокаут *PRIMPOL* снизил количество ДНК-реплицирующих клеток и клеток в G2-фазе клеточного цикла после обработки метилметансульфонатом, а также вызвал более выраженную, по сравнению с клетками дикого типа, задержку в S-фазе в ответ на воздействие цисплатина. Значимое повышение доли апоптотных клеток отмечалось у *PRIMPOL*^{-/-} клеток в ответ на ионизирующее излучение в дозе 10 Гр, тогда как доля подверженных некроптозу клеток значительно повышалась как в родительских, так и в нокаутных клетках при любой дозе облучения. В условиях окислительного стресса, стимулированного перекисью водорода, нокаут *PRIMPOL* повысил жизнеспособность клеток, измеренную методом метилтетразолиевого теста (MTT). Полученные данные указывают на участие *PRIMPOL* в модулировании стресс-адаптивных реакций на различные типы генотоксического стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: репликация, повреждения ДНК, толерантность к повреждениям, апоптоз, PrimPol, праймаза, нокаутные клеточные линии.

DOI: 10.31857/S0320972523110222, **EDN:** MMJMCO

ВВЕДЕНИЕ

ДНК в клетке постоянно подвергается повреждениям со стороны внутриклеточных метаболитов и таких внешних агентов, как лекарственные средства или техногенные загрязнители [1]. Системы репарации клетки успешно

исправляют повреждения ДНК, однако не всегда успевают удалить повреждения до начала репликации. При столкновении высокоточных репликативных ДНК-полимераз (ДНКП) с повреждённым нуклеотидом в лидирующей цепи может происходить остановка репликации. В таких случаях запускаются процессы, обеспечивающие толерантность клетки к повреждениям ДНК, главную роль в которых играет синтез ДНК на повреждённом участке при участии специализированных ДНКП – транслезионный синтез (от англ. translesion – через повреждение). В ходе транслезионного синтеза происходит переключение с высокоточных

Принятые сокращения: ДНКП – ДНК-полимераза; ММС – метилметансульфонат; МТТ – метилтетразолиевый тест; PBS – phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер; PI – йодид пропидия; PrimPol – primase-polymerase, праймаза-полимераза.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

репликативных ДНКП на специализированные ДНКП γ -семейства (Pol ι , Pol η , Pol κ , Rev1) и β -семейства (Pol ξ), которые эффективно включают нуклеотиды напротив повреждённых участков ДНК [2–4].

Восстановление движения репликативной вилки также может быть осуществлено за счёт инициации новой репликативной вилки в участке, расположенном далее по ходу от повреждённого участка ДНК, с последующим заполнением оставшейся бреши. На отстающей цепи данную функцию выполняет комплекс Pol α –праймаза, на лидирующей цепи – праймаза-полимераза PrimPol, впервые описанная в 2013 г. [5–7]. PrimPol относится к суперсемейству архейно-эукариотических праймаз, её ортологи обнаружены у многих эукариот [8]. PrimPol обнаружена не только в ядре, но и в митохондриях [5].

PrimPol синтезирует ДНК-праймеры *de novo*, осуществляя перезапуск репликации в ядре и митохондриях после повреждённых участков ДНК или вторичных структур – G-квадруплексов и R-петель [9–16]. Также PrimPol демонстрирует свойства транслезионной ДНКП, эффективно включая нуклеотиды напротив ряда небольших повреждений ДНК, в том числе 8-оксогуанина, O⁶-метилгуанина, 5-формилурацила и апурин-апириимидиновых сайтов *in vitro* [17–19]. *In vitro* PrimPol также достаточно эффективно включает комплементарные dCMP напротив внутрицепочечной цисплатиновой сшивки G⁺G [20].

Делеция гена *PRIMPOL* в клеточной линии мышиных эмбриональных фибробластов приводит к замедлению репликации ядерной и митохондриальной ДНК в физиологических условиях и вызывает чувствительность к ряду генотоксичных агентов: ультрафиолетовому излучению, метилметансульфонату, гидроксимочевине, бенз[*a*]пирену [10, 14, 15, 21–24]. Накапливаются данные о возможном участии PrimPol в репликации ДНК после обработки клеток цисплатином и другими химиотерапевтическими препаратами [9, 13, 20]. PrimPol защищает клетки от митохондриальной цитотоксичности, вызванной антиретровирусной терапией нуклеозидным ингибитором тенофовиром (побочным эффектом препарата является ингибирование митохондриальной ДНКП Pol γ и репликации мтДНК) [25]. Однако конкретные функции PrimPol в клетке и роль фермента в защите клеток от разных типов повреждений ДНК всё ещё остаются неясными. Не исследована роль PrimPol в ответе клеток на окислительный стресс. Получены противоречивые данные о роли PrimPol в репликации ДНК

в физиологических условиях и в ответе клеток на повреждения, индуцированные алкилирующими соединениями или УФ-излучением.

Целью работы является анализ влияния нокаута гена *PRIMPOL* на адаптивные реакции опухолевых клеток в ответ на генотоксический стресс, вызванный ДНК-повреждающими агентами разной природы. Была получена модельная линия клеток карциномы лёгкого A549 с нокаутированным геном *PRIMPOL*, и изучен ответ этих клеток на ионизирующее излучение и повреждающие ДНК соединения с разным механизмом действия: метилметансульфонат, перекись водорода, цисплатин и блеомицин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия. Клетки линии аденокарциномы лёгких человека A549 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы GlutaMAX[™] Supplement («Gibco», США) или аналоге (кат. номер C410п) от «ПанЭко» (Россия), 10%-ной (v/v) фетальной бычьей сыворотки («Gibco»), 100 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина («ПанЭко») при 37 °С и 5% CO₂.

Получение клеток A549, нокаутных по гену *PRIMPOL*. Нокаут гена *PRIMPOL* производили с помощью системы CRISPR/Cas9 и вектора pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458; плаزمида любезно предоставлена Ф. Чжаном; Addgene #48138; <https://n2t.net/addgene:48138>; RRID: Addgene_48138). Эффективность внесения инсерций и делеций в полученном моноклоне анализировали с помощью методов TIDE (Tracking of Indels by Decomposition) и RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) (рис. П1 Приложения). Экспрессию PrimPol в клетках проверяли методом белкового иммуноблоттинга. Получение нокаутной клеточной линии подробно описано в Приложении.

Обработка клеток повреждающими ДНК препаратами. Клетки высевали в количестве 5000 на лунку 96-луночного планшета для анализа с помощью МТТ (метилтетразолиевый тест), 1000 на лунку 384-луночного планшета для исследования пролиферации и 400 000 на лунку 6-луночного планшета при оценке распределения по фазам клеточного цикла. Цисплатин («Sigma-Aldrich», США) добавляли в диапазоне концентраций 0,5–20 мкМ и инкубировали в течение 48 ч. Метилметансульфонат (ММС) («Sigma-Aldrich») добавляли в диапазоне концентраций 0,1–1 мМ и инкубировали в течение 24 ч. Блеомицин («VeroPharm», Рос-

сия) добавляли в диапазоне концентраций 0,01–1 мг/мл (7–700 мкМ) и инкубировали в течение 48 ч. H_2O_2 («Самарамедпром», Россия) добавляли в диапазоне концентраций 0,2–30 мМ и инкубировали в течение 60 мин. Для анализа фаз клеточного цикла клетки обрабатывали 10 мМ H_2O_2 в течение 60 мин, 540 мкМ ММС в течение 24 ч, 200 мкг/мл (140 мкМ) блеомицина в течение 48 ч или 10 мкМ цисплатина в течение 48 ч.

Облучение клеток. Клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, облучали при комнатной температуре на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия) в дозах 2 и 10 Гр при мощности дозы 0,85 Гр/мин. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях при 37 °С и 5% CO_2 .

Оценка жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ, который основан на NAD(P)H-зависимом восстановлении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид и отражает суммарную метаболическую активность клеток. В лунки с клетками вносили раствор МТТ до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 2,5 ч при 37 °С и 5% CO_2 . Формирование нерастворимых кристаллов формазана контролировали визуально под микроскопом, после чего аккуратно удаляли среду и добавляли ДМСО для растворения кристаллов. Оптическую плотность оценивали при длине волны 540 нм против референсной 620 нм на планшетном ридере CLARIOstar («BMG Labtech», Германия). Жизнеспособность определяли по оптической плотности образца относительно контроля (необработанных клеток), выраженной в процентах. Значение для контрольных необработанных клеток принимали за 100%.

Определение доли ДНК-реплицирующих клеток (пролиферативная активность). В лунки с клетками вносили раствор 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) до конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали в течение 2,5 ч при 37 °С и 5% CO_2 . Затем клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и вносили фиксирующий раствор, содержащий 2% параформальдегида и 5 мкг/мл красителя Hoechst 33342 в PBS. Клетки инкубировали в течение ночи при 4 °С, промывали PBS и вносили раствор 1 мМ $CuSO_4$, 20 мМ Tris-HCl (pH 8,5), 2 мкМ красителя Alexa Fluor™ 488 azide, 0,5%-ный Triton X-100 и 50 мМ аскорбиновой кислоты для окрашивания EdU, включённого в ДНК. После окрашивания лунки промывали PBS и анализировали на установке ImageXpress Micro XL High-Content Screening

System. Пролиферативную активность считали по отношению флуоресцирующих клеток к общему числу клеток в образце, выраженному в процентах. Значение для контрольных необработанных клеток принимали за 100%.

Анализ клеточного цикла. Распределение популяции клеток по фазам клеточного цикла оценивали с помощью проточной цитометрии после окраски ДНК иодидом пропидия (PI). Клетки снимали с планшета, отмывали в ресуспендирующем буфере (PBS + 2% (v/v) фетальной бычьей сыворотки + 0,1% (v/v) БСА) и фиксировали 70%-ным (v/v) этанолом во льду в течение 2 ч. Далее клетки промывали холодным PBS, добавляли свежеприготовленный окрашивающий раствор (50 мкг/мл PI в PBS + 3,8 мМ цитрат натрия + 5 мкг/мл РНКаза А) и инкубировали в течение ночи при 4 °С. На следующий день клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur («BD Biosciences», США). Полученные данные обрабатывали в программе FlowJo 10.18.1.

Анализ апоптоза. Для анализа апоптотической гибели клеток использовали коммерческий набор «FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI, for Flow Cytometry» («Invitrogen», США). Окрашивание клеток проводили в соответствии с протоколом производителя. Через 24 ч после облучения клетки снимали с поверхности и промывали холодным PBS. 5 мкл аннексина V и 1 мкл PI (100 мкг/мл) добавляли в суспензию, содержащую 10^6 клеток. Клетки инкубировали 15 мин при комнатной температуре и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur («BD Biosciences»). Для каждого образца регистрировали в общей сложности 50 000 событий. Анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения BD CellQuest Pro 5.1.

Иммунофлуоресцентный анализ фокусов белков репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Чувствительность к радиации оценивали по количеству радиационно-индуцированных фокусов через 1, 4, 6 и 24 ч после облучения дозой 2 Гр. Клетки высаживали на покровные стёкла и после облучения фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем клетки пермеабилизировали 0,3%-ным Triton X-100 в PBS (pH 7,4), содержащем 2% БСА для блокирования неспецифического связывания антител. Слайды инкубировали с мышиными моноклональными антителами к белку $\gamma H2AX$ (разведение 1 : 200, Anti-phospho Histone H2A.X (Ser139) Antibody, «Merck Millipore», США) и кроличьими поликлональными антителами к белку RAD51

(разведение 1 : 200, «Merck Millipore») в течение 1 ч при 22 °С. После промывания клетки инкубировали при 22 °С в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 555 (разведение 1 : 1000, Goat Anti-Mouse IgG (H + L), «Merck Millipore») и с Alexa Fluor 488 (разведение 1 : 500, Goat Anti-Rabbit IgG (H + L), «Merck Millipore»). Для окраски ДНК и предотвращения фотовыцветания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold («Life Technologies», США). Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли при помощи люминесцентного микроскопа Eclipse NiU («Nikon», Япония), оснащённого видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool («Jenoptik AG», Германия), с использованием наборов светофильтров DAPI (возбуждение 340–380 нм, эмиссия 435–485 нм), B-2E/C (возбуждение 465–495 нм, эмиссия 515–555 нм) и Y-2E/C (возбуждение 540–580 нм, эмиссия 600–660 нм). Анализировали не менее 200 клеток на каждую временную точку. Для подсчёта количества фокусов γ H2AX и RAD51 использовали программу Focicounter (<http://focicounter.sourceforge.net/>).

Статистический анализ. Все эксперименты проводили в нескольких экспериментальных повторностях (выполнены в разные дни с использованием независимых пассажей клеток и разведений ДНК-повреждающих препаратов) и двух-трёх измерительных (дублирующие лунки на одном планшете). Для каждой из точек рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Расчёты проводили с помощью Microsoft Excel и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящей работе была получена и фенотипически охарактеризована клеточная линия карциномы лёгкого человека A549, нокаутная по гену *PRIMPOL*.

Ответ клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} на генотоксический стресс. В работе впервые изучено действие нокаута *PRIMPOL* в ответе клеток на окислительный стресс. Для исследования ответа нокаутных клеток на повреждения ДНК в условиях генотоксического стресса клетки обрабатывали алкилирующим агентом ММС или перекисью водорода. В отсутствие повреждающих агентов нокаут *PRIMPOL* существенно не влиял на распределение клеток в культуре

по фазам клеточного цикла (рис. 1). Нокаут *PRIMPOL* также не влиял на жизнеспособность клеток, измеренную методом МТТ, и долю ДНК-реплицирующих клеток. Однако были отмечены статистически значимые эффекты влияния нокаута *PRIMPOL* на жизнеспособность клеток после обработки перекисью водорода и долю ДНК-реплицирующих клеток после обработки ММС (рис. 2, а).

Перекись водорода вызывала небольшое (в 1,4 раза) сокращение фракции *PRIMPOL*^{-/-} клеток в фазе G2 ($p < 0,05$), а также тенденцию к повышению количества клеток в фазе G1 и падению количества клеток в фазе S клеточного цикла (рис. 1). Однако изменения в G1- и S-фазах не достигли статистической достоверности. Наблюдалось связанное с дозой снижение количества ДНК-реплицирующих клеток (включения EdU), более выраженное в клетках с нокаутом гена *PRIMPOL*, но также не достигшее статистической достоверности ($p = 0,09$ при 0,25 мМ H₂O₂) (рис. 2, б). При этом жизнеспособность клеток *PRIMPOL*^{-/-}, измеренная методом МТТ, оказалась достоверно дозозависимо выше по сравнению с родительскими клетками (рис. 2, а).

ММС вызвал практически равное снижение фракции родительских клеток в фазе G1 и повышение фракций клеток в S- и G2-фазах клеточного цикла (рис. 1). При этом нокаут *PRIMPOL* почти в два раза снизил процент клеток в фазе G2 после обработки 540 мкМ ММС ($p < 0,05$) и привёл к появлению выраженной субпопуляции G1-клеток, содержащей фрагментированную ДНК и соответствующей клеткам, подвергшимся апоптотической гибели (рост с 2,4 до 5,5%, $p < 0,05$) (рис. 1).

Нокаут *PRIMPOL* не влиял на жизнеспособность клеток, обработанных ММС, по данным МТТ-теста (рис. 2, а), значительно снижая долю ДНК-реплицирующих клеток в диапазоне концентраций свыше 400 мкМ (рис. 2, б). По сравнению с родительскими клетками при низких концентрациях (200–300 мкМ) ММС наблюдалось значительное увеличение количества ДНК-реплицирующих клеток *PRIMPOL*^{-/-}. Это может быть связано с запуском альтернативных механизмов толерантности к повреждениям, восстанавливающих скорость репликации (транслезионного синтеза, репарации), но ростом доли клеток с не завершённой полностью репликацией в фазе S. При большом количестве повреждений в отсутствии PrimPol-зависимого репрайминга альтернативные механизмы, вероятно, не справляются, что приводит к тотальному подавлению репликации.

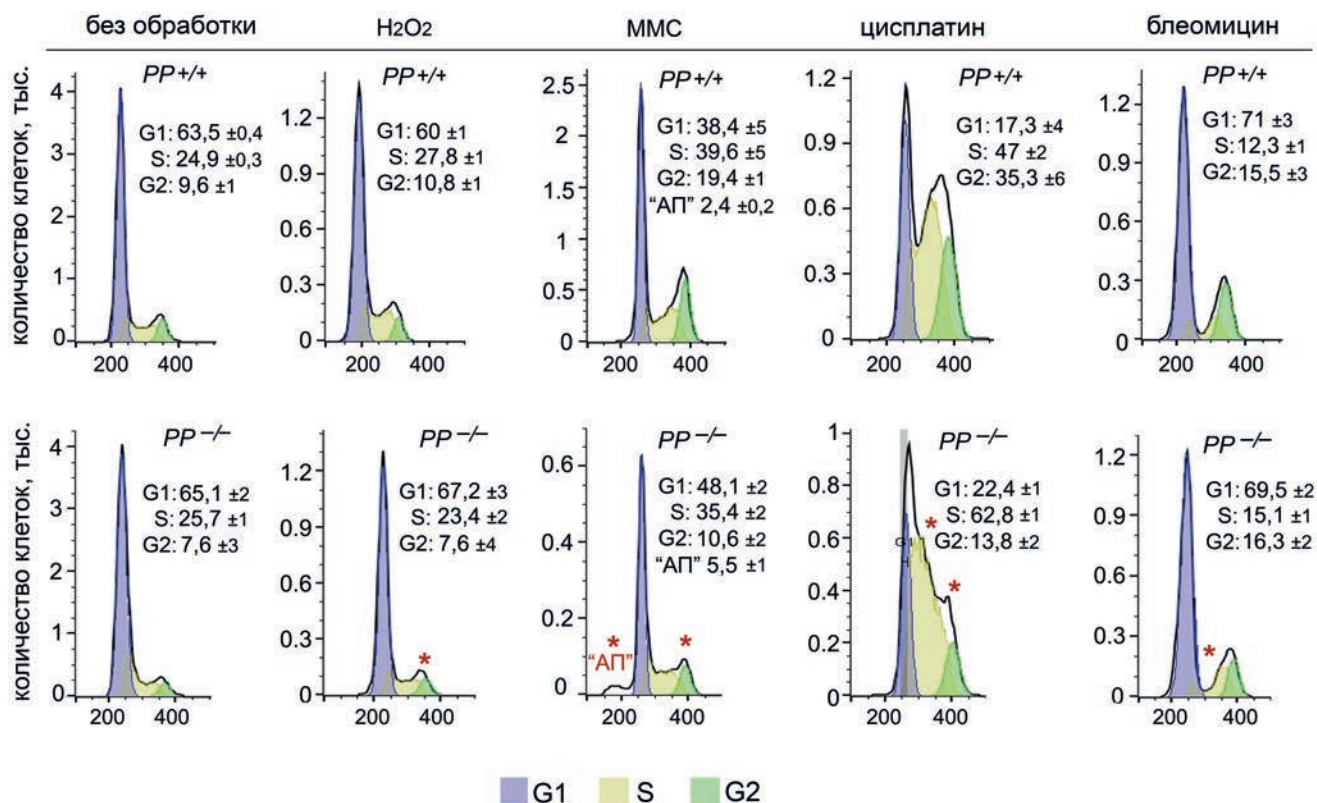


Рис. 1. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла с помощью проточной цитометрии. Указаны проценты клеток, находящихся в G1-, S- и G2-фазах клеточного цикла. G1-, S- и G2-фазы показаны фиолетовым, жёлтым и зелёным соответственно. Субпопуляция G1-клеток, соответствующая фрагментированной ДНК и апоптотическим клеткам, отмечена «АП». PP^{+/+} и PP^{-/-} — клетки дикого типа и клетки *PRIMPOL*^{-/-} соответственно. Для обработки использовали концентрации ДНК-повреждающих агентов, при которых погибло 40–60% клеток. Эксперименты выполнены в трёх экспериментальных и двух измерительных повторностях

Чувствительность клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} к химиотерапевтическим препаратам. В качестве химиотерапевтических препаратов были выбраны цисплатин, вызывающий внутри- и межцепочечные сшивки ДНК [26, 27], и блеомицин, стимулирующий образование двуцепочечных разрывов ДНК [28]. Нокаут *PRIMPOL* не оказал значительного влияния на жизнеспособность клеток (рис. 2, а) и распределение клеток в фазах клеточного цикла (рис. 1) при однократных обработках блеомицином. Наблюдалась лишь незначительная задержка клеток в фазе S (с 12,3 до 15,1%, $p < 0,05$) (рис. 1).

Нокаут *PRIMPOL* также существенно не повлиял на жизнеспособность и количество ДНК-реплицирующих клеток, однократно обработанных цисплатином (рис. 2, а, б), однако оказал более существенное влияние на клеточный цикл (рис. 1). Обработка цисплатином ожидаемо привела к аресту клеток дикого типа в S- и G2-фазах клеточного цикла, что объясняется подавлением репликации. При этом задержка *PRIMPOL*^{-/-} клеток в S-фазе была более выражена по сравнению с клетками дикого типа (соотношение S/G2 возросло с 1,3

до 4,6, $p < 0,05$). Таким образом, цисплатин одинаково резко подавлял ДНК-синтетическую активность родительских и нокаутных клеток, но отсутствие PrimPol дополнительно препятствовало завершению репликации.

Чувствительность клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} к ионизирующему излучению. Среди повреждений ДНК, вызываемых ионизирующим излучением, основную опасность представляют двуцепочечные разрывы. Один из наиболее чувствительных и широко используемых маркеров двуцепочечных разрывов ДНК — число фокусов корового гистона H2AX, фосфорилированного по остатку Ser139 (γ H2AX). Оценка числа двуцепочечных разрывов ДНК проводилась с помощью иммуноцитохимического анализа фокусов γ H2AX в течение 24 ч после облучения в дозе 2 Гр (рис. 3, а, б). Максимальное число фокусов наблюдалось через 1 ч после облучения, и через 24 ч их количество возвращалось к исходному уровню (вследствие репарации двуцепочечных разрывов). Нокаут *PRIMPOL* вызвал небольшое (на ~14%), но статистически значимое увеличение числа фокусов γ H2AX, по сравнению с клетками

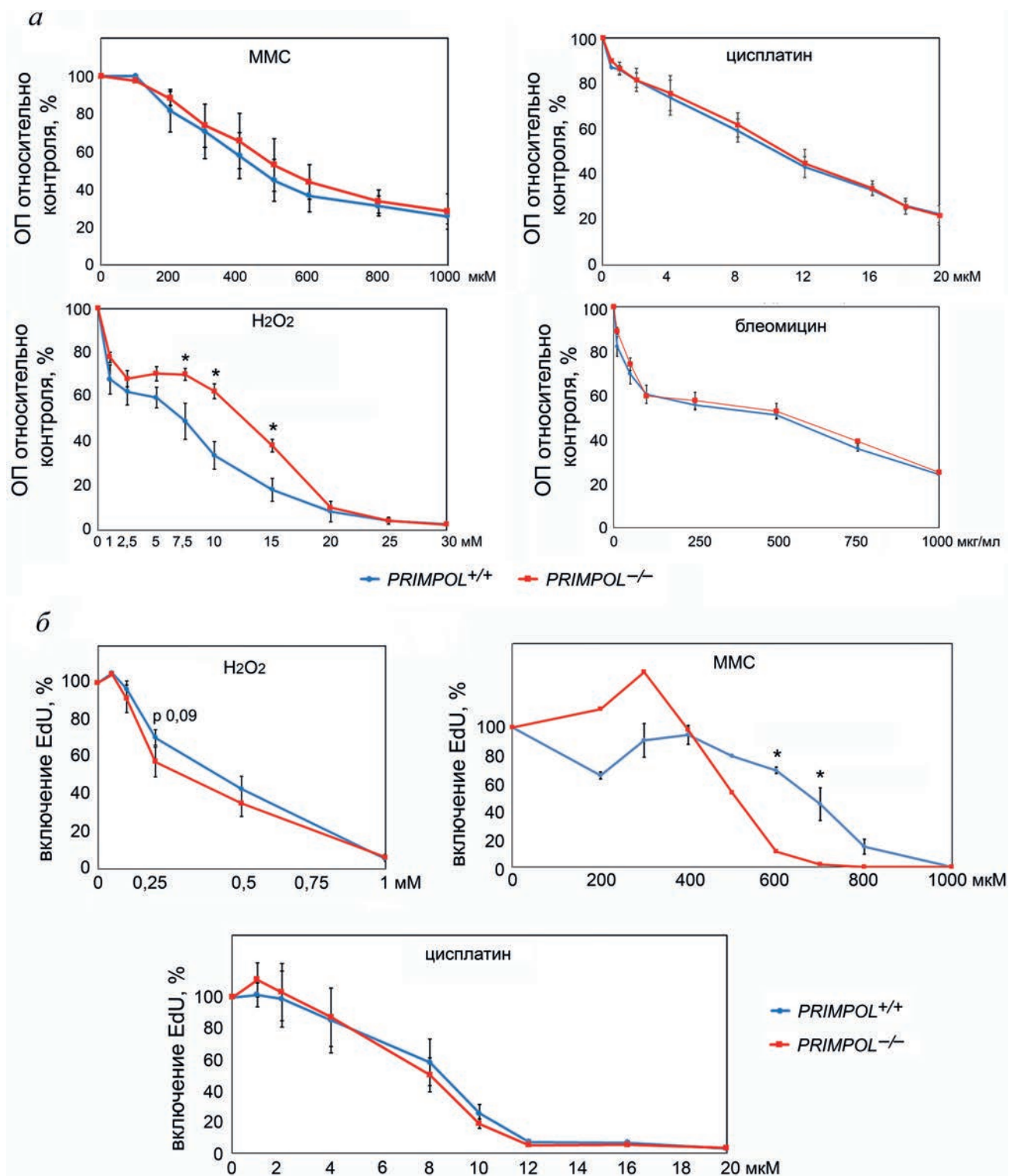


Рис. 2. Анализ жизнеспособности клеток. *а* – Жизнеспособность клеток, определённая методом МТТ. ОП – оптическая плотность. *б* – Доля ДНК-реплицирующих клеток, определённая по включению EdU в *de novo* синтезированную цепь ДНК. * $p < 0,05$. Значения стандартных ошибок данных при анализе включения EdU в нокаутных клетках после обработки MMC составляют менее 2% и не отображаются на графике. Анализ жизнеспособности проводили в четырёх экспериментальных и трёх измерительных повторностях. Определение доли ДНК-реплицирующих клеток проводили в двух экспериментальных и трёх измерительных повторностях

дикого типа ($p < 0,05$), через 1 ч после воздействия ионизирующим излучением (рис. 3, *а, б*). Однако в клетках дикого типа и нокаутных

клетках наблюдалась сходная кинетика деградации фокусов γ H2AX. Важно отметить, что клетки *PRIMPOL*^{-/-} демонстрировали более

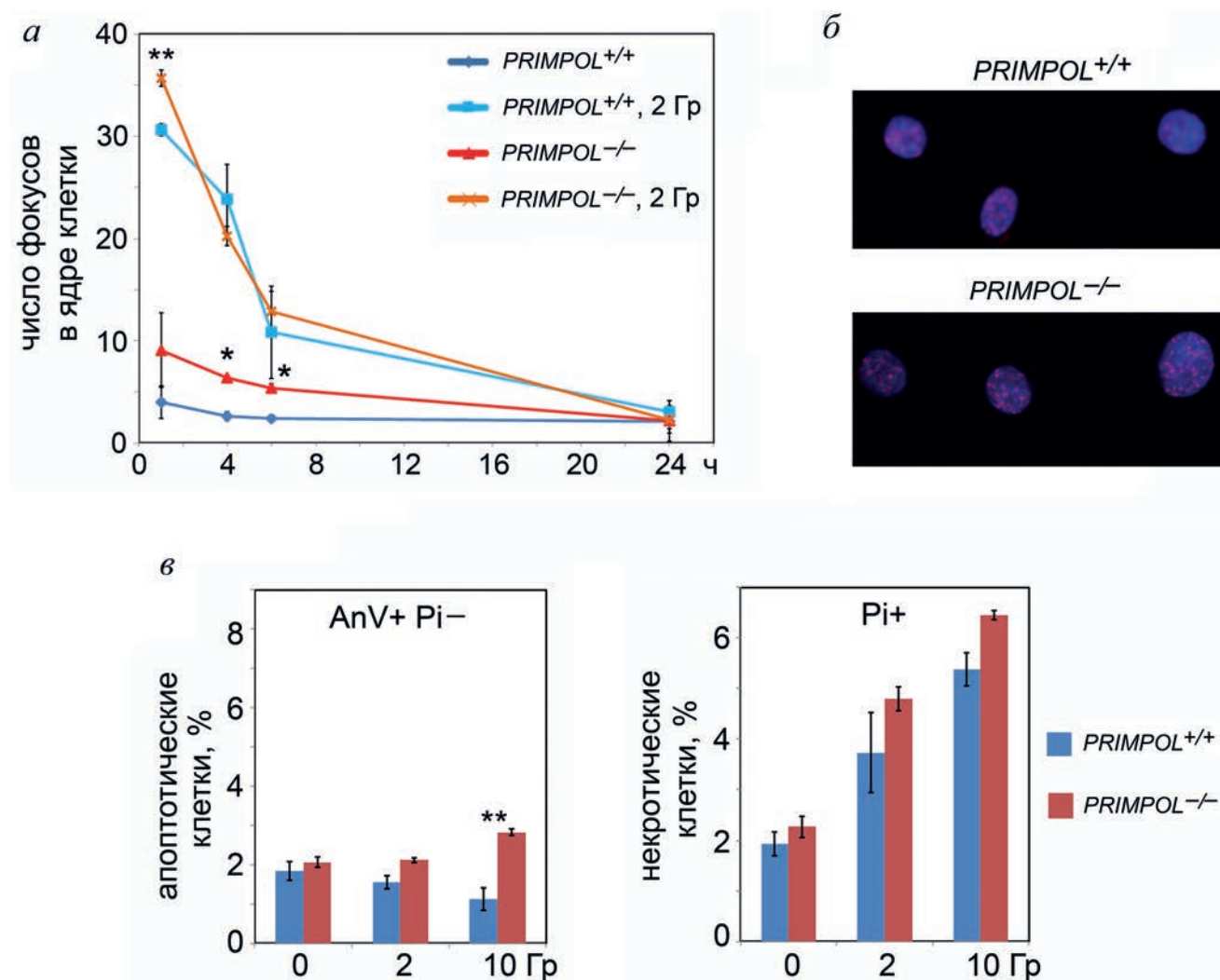


Рис. 3. Оценка чувствительности клеток A549 к ионизирующему излучению. *а* – Оценка количества двуцепочечных разрывов ДНК после облучения в дозе 2 Гр с помощью иммунофлуоресцентного анализа радиационно-индуцированных фокусов, содержащих гистон γ H2AX. *б* – Репрезентативная фотография иммуноцитохимического анализа фокусов γ H2AX через 1 ч после облучения в дозе 2 Гр. Ядра, окрашенные DAPI, – синий, фокусы γ H2AX – красный. *в* – Апоптотическая гибель клеток. Способность ионизирующего излучения стимулировать клеточную гибель определяли по способности аннексина V и PI проникать через мембраны апоптотических клеток. Выделяли клетки на раннем этапе апоптоза (AnV+ PI–) и некротические клетки (PI+). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Анализ проводили в трёх экспериментальных и трёх измерительных повторностях

высокий фоновый уровень числа фокусов γ H2AX (отражающий уровень спонтанных двуцепочечных разрывов) по сравнению с клетками *PRIMPOL*^{+/+} ($p < 0,01$). При этом нокаут *PRIMPOL* не повлиял на количество фокусов, содержащих ключевой белок гомологичной рекомбинации RAD51, как в облучённых, так и в необлучённых клетках (рис. П2 Приложения).

После воздействия на клетки ионизирующим излучением был также проведён анализ клеточной гибели. Полученные результаты свидетельствуют о связанном с дозой увеличении доли некротических клеток (PI+) после облучения как в клетках дикого типа, так и в нокаутных клетках (рис. 3, в). При этом нокаут

гена *PRIMPOL* вызвал более чем двукратное ($p < 0,05$) увеличение доли клеток на ранней стадии апоптоза (PI–/Annexin V+) через 24 ч после облучения в дозе 10 Гр (рис. 3, в).

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе описано несколько линий клеток человека и млекопитающих с нокаутом гена *PRIMPOL*, полученных на основе клеток U2OS (остеосаркома) [29, 30], эмбриональных фибробластов мыши (MEF) [14, 21, 29], MRC5 (фибробласты лёгкого) [24], фибробластов пациента с пигментной ксеродермой группы комплемента V (XP-V) [24]

и пре-В-лимфоцитов [31]. Опубликовано также несколько работ с нокадаун *PRIMPOL* в культурах клеток HeLa [7, 21], U2OS и 143B [10, 13, 21], нормальных фибробластах человека (HDF) [21], MRC5 [6, 32], фибробластах XP30RO пациента с XP-V и клетках с нокаутом гена *XPA* с нарушением системы эксцизионной репарации нуклеотидов [6], HEK293 [5] и в *BRCA1*-дефицитных клетках рака яичника UWB1.289 [13]. Результаты, полученные в разных исследованиях на разных культурах клеток, заметно отличаются. В отсутствие экзогенных повреждений нокаут и нокадаун *PRIMPOL* снижал скорость пролиферации и продвижение репликативной вилки в опухолевых клетках HeLa, U2OS, 43B и фибробластах HDF и MEF в работах Wan et al., Mourón et al. и Bailey et al. [7, 21, 24], но не влиял на скорость репликации и пролиферацию в фибробластах MRC5, MEF и XP30RO в работах Torregrosa-Muñumer et al. и Bailey et al. [14, 24]. В ряде публикаций сообщалось о повышении чувствительности клеток лимфомы курицы DT40, клеток MRC5, HeLa и MEF к ультрафиолетовому излучению при нокауте *PRIMPOL* [6, 14, 15, 21, 32, 33], но в других работах этого не наблюдалось [24, 31].

Мутации *PRIMPOL* обнаружены в культурах клеток карциномы лёгких [29, 34]. В настоящей работе была получена и охарактеризована (с использованием большого набора ДНК-повреждающих агентов) линия клеток карциномы лёгкого A549 с нокаутом гена *PRIMPOL*.

Известно, что нокаут *PRIMPOL* приводит к нарушению клеточного цикла в некоторых клеточных линиях. В частности, фибробласты лёгкого MRC5 и фибробласты XP30RO с дополнительным дефектом Pol η задерживаются в фазе G2 [24]. Нокаут *PRIMPOL* в линии A549 не оказал существенного влияния на клеточный цикл (рис. 1) и пролиферативную активность (рис. 2, б) в отсутствие экзогенных повреждений. Однако нокаутные клетки демонстрировали более высокое число фоновых фокусов гистона γH2AX по сравнению с клетками дикого типа (рис. 3, а), что свидетельствует об образовании двуцепочечных разрывов в отсутствие повреждающих ДНК агентов и может быть связано с участием PrimPol в репликации ДНК, содержащей спонтанные повреждения, R-петли или G-квадруплексы.

По сравнению с родительскими клетками A549 влияние нокаута *PRIMPOL* на жизнеспособность клеток, долю ДНК-реплицирующих клеток и клеточный цикл было более выражено при обработке повреждающими ДНК аген-

тами. ММС вызывал дозозависимое снижение доли ДНК-реплицирующих клеток (рис. 2, б), а в высоких концентрациях – и арест как родительских, так и *PRIMPOL*^{-/-} клеток в S- и G2-фазах (рис. 1). Нокаут *PRIMPOL* ещё больше снижал долю ДНК-реплицирующих клеток и привёл к сокращению доли клеток в G2-фазе и появлению популяции клеток с фрагментированной ДНК (популяция «АП» на рис. 1), соответствующей апоптотическим. Полученные результаты можно объяснить замедлением репликации, повышением чувствительности клеток в G2-фазе к ММС и гибели клеток в G2-фазе из-за неспособности пройти G2/M-чекпойнт.

Чувствительность к ММС была описана ранее для культуры клеток лимфомы курицы DT40 с нокаутом *PRIMPOL* [15], но не при деплеции PrimPol в клетках остеосаркомы человека U2OS [30]. Разные результаты можно объяснить как отличиями в ответе клеток курицы на повреждения ДНК (например, нет фермента транслезионного синтеза Pol ι), так и остаточной активностью PrimPol при деплеции в клетках остеосаркомы или разными методиками оценки. Наши данные подтверждают роль PrimPol в ответе клеток человека на алкилированные повреждения с помощью нокаутной модели.

Анализ нокаута *PRIMPOL* на чувствительность клеток к окислительному стрессу был проведён впервые. При обработке клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} перекисью водорода наблюдалось существенное повышение жизнеспособности клеток (рис. 2, а), сопровождавшееся снижением доли ДНК-реплицирующих клеток в узком диапазоне концентраций (хотя и статистически незначимым) (рис. 2, б). Похожие результаты были получены в другом исследовании при облучении *PRIMPOL*^{-/-} клеток ультрафиолетом [22]. Несмотря на то что нокаутные клетки медленнее пролиферировали, они оказались жизнеспособнее клеток дикого типа. Полученные нами результаты, предположительно, можно объяснить влиянием нокаута на клеточный цикл и большей чувствительностью клеток к окислительному стрессу в момент репликации. Действительно, в условиях окислительного стресса нокаут *PRIMPOL* показывал сокращение количества клеток в G2-фазе ($p < 0,05$), а также тенденцию к сокращению количества клеток в фазе S и росту количества клеток в фазе G1 (хотя и не достигших статистической значимости), что указывает на возможное замедление перехода G1/S. Чувствительность клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} к H₂O₂ согласуется с участием PrimPol в репликации

ДНК с повреждениями, вызванными активными радикалами кислорода. Замедление перехода G1/S может быть обусловлено нарушением роста нокаутных клеток в G1-фазе вследствие замедления репликации митохондриальной ДНК. Актуальными представляются дальнейшие исследования роли PrimPol в окислительном стрессе с использованием других индукторов и протекторов окислительного стресса.

Потеря PrimPol не оказала существенного влияния на чувствительность клеток A549 к химиотерапевтическому препарату цисплатину при однократной обработке: наблюдалось только замедление клеток в S-фазе клеточного цикла (рис. 1). Недостаток *PRIMPOL* в клетках может быть компенсирован другими механизмами защиты от повреждений ДНК: системами репарации и транслезионными ДНКП. Полученные результаты по цисплатину согласуются с литературными данными. В частности, нокаут и нокадаун *PRIMPOL* не повышают чувствительность к цисплатину фибробластов лёгкого MRC5 [24] и клеток остеосаркомы U2OS [30], но вызывают чувствительность к этому агенту у клеток линии XP30RO, полученной от пациента с XP-V — вариантом пигментной ксеродермы, вызванным дефектом гена *POLH* [24]. Pol η ведёт эффективный и точный транслезионный синтез напротив внутрицепочечных цисплатиновых сшивок [35]. Таким образом, транслезионный синтез с участием Pol η и ре-инициация репликации с участием PrimPol могут представлять два независимых и дополняющих друг друга пути толерантности к цисплатину. В другой работе подавление экспрессии *PRIMPOL* повысило чувствительность клеток UW и U2OS к цисплатину только при одновременном нокауте гена *BRCA1* (*BReast CAncer gene 1*) и многократных обработках препаратом (воспроизводящих режим химиотерапии) [13], что указывает на роль PrimPol в адаптации к повторному генотоксическому стрессу.

Важно также отметить, что опухолевые клетки часто демонстрируют повышенную способность адаптации к повреждениям ДНК, связанную с эффективной работой систем репарации и других механизмов устойчивости к препаратам химиотерапии, поэтому эффекты нокаута генов отдельных ферментов толерантности к повреждениям ДНК в опухолевых клетках могут быть выражены слабее. Для клеток линии A549 характерна мутация онкогена *KRAS* (замена G12S), на долю которой приходится около 1,8% случаев мутаций *KRAS* немелкоклеточных опухолей лёгких [36, 37].

Разные мутации *KRAS* могут оказывать очень разное (иногда даже противоположное) влияние на чувствительность к цисплатину [36, 38, 39]. Вклад замены G12S в чувствительность к ДНК-повреждающим агентам и химиотерапии отдельно не исследовался. Известно, что линия аденокарциномы A549 может быстро адаптироваться к цисплатину за счёт изменения контрольных точек клеточного цикла [40] либо, возможно, содержит устойчивую к цисплатину субпопуляцию клеток [41]. Однако наблюдаемое в работе значение IC50 (~10 мкМ) соответствует литературным данным для A549 [42].

В настоящей работе мы также проанализировали влияние нокаута *PRIMPOL* на чувствительность клеток аденокарциномы лёгких человека к ионизирующему излучению и блеомицину. Оба этих агента преимущественно вызывают двуцепочечные разрывы ДНК за счёт локализованной генерации радикалов $\cdot\text{OH}$. Однако, как и в случае с цисплатином, нокаут *PRIMPOL* не оказал существенного влияния на жизнеспособность клеток, однократно обработанных блеомицином (рис. 2, а). *PRIMPOL*^{-/-} клетки оказались немного более чувствительны к ионизирующему излучению и чаще подвергались апоптозу. Репарация двуцепочечных разрывов ДНК в клетках млекопитающих осуществляется с помощью гомологичной рекомбинации и негомологичного соединения концов. Нокаут *PRIMPOL* мог привести к запуску программы апоптоза (апоптотические (PI-/Annexin V+) клетки на рис. 3, в) и активации системы репарации ДНК (фокусы γH2AX на рис. 3, а) в ответ на ионизирующее излучение. В целом, отсутствие выраженной чувствительности клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} к ионизирующему излучению и блеомицину согласуется с данными, полученными для культуры клеток лимфомы курицы (DT40) (ионизирующее излучение) [6, 15] и клеток U2OS (ионизирующее излучение и блеомицин) [30].

Представляется также вполне вероятным, что нокаут *PRIMPOL* может оказывать более выраженное влияние на стресс-адаптивную реакцию на ионизирующее излучение и блеомицин в клетках с дефектами репарации. В пользу такого предположения говорят данные о том, что деплеция *PRIMPOL* не оказала влияния на скорость движения репликативной вилки после обработки ионизирующим излучением и блеомицином в клетках U2OS дикого типа, но нивелировала повышение скорости репликации при совместной деплеции с *BRCA2* (*BReast CAncer gene 2*) [30]. При этом одновременная деплеция *PRIMPOL* и *BRCA2*

Влияние нокаута и нокдауна *PRIMPOL* на ответ клеток к повреждениям ДНК

ДНК-повреждающий агент	Линия клеток	Эффект	Ссылки
Физиологические условия	HeLa нокдаун U2OS нокдаун 143B нокдаун HDF нокдаун MEF нокаут	снижает скорость пролиферации и продвижение репликативной вилки	[6, 21, 24]
	MRC5 нокаут MEF нокаут XP30RO нокаут пре-В-лимфоциты нокаут	не влияет на скорость пролиферации и репликации	[14, 24, 31]
	MRC5 нокаут, XP30RO нокаут	вызывает задержку в G2	[24]
	A549 нокаут	повышает количество двуцепочечных разрывов, существенно не влияет на клеточный цикл и пролиферативную активность	настоящая работа
Перекись водорода	A549 нокаут	повышает жизнеспособность	настоящая работа
ММС	DT40 нокаут A549 нокаут	повышает чувствительность	[15], настоящая работа
	U2OS нокдаун	не влияет	[30]
Цисплатин	XP30RO нокаут	повышает чувствительность при дефиците Pol η	[24]
	MRC5 нокаут U2OS нокдаун A549 нокаут	не влияет; предположительно, замедляет скорость репликации в A549	[24, 30], настоящая работа
	UW нокдаун U2OS нокдаун	повышает чувствительность при многократных обработках и нокауте <i>BRCA</i>	[13]
Ионизирующее излучение	DT40 нокаут U2OS нокдаун A549 нокаут	не влияет или незначительно повышает чувствительность	[6, 15, 30], настоящая работа
Блеомицин	U2OS нокдаун A549 нокаут	не влияет или влияет незначительно	[30], настоящая работа
УФ	DT40 нокаут и нокдаун MRC5 нокдаун HeLa нокдаун MEF нокаут	повышает чувствительность	[6, 14, 21, 24, 32, 33]
	пре-В-лимфоциты, нокаут	не влияет на чувствительность, но замедляет скорость репликации	[24, 31]
	DT40 нокаут	повышает жизнеспособность	[22]

стимулировала меньшее количество хроматидных разрывов, чем деплеция только *BRCA2*. Литературные данные указывают на роль *BRCA2* в сдерживании прогрессии репликативной вилки в результате PrimPol-опосредованного репрайминга, который сопровождается образованием чувствительных к разрывам одноцепочечных брешей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывают на участие *PRIMPOL* в модулировании адаптивных реакций на различные типы генотоксического стресса и расширяют представления о биологических функциях *PRIMPOL*. Данные настоящей работы для линии A549 в сравнении

с известными литературными данными суммированы в таблице. Актуальным представляется дальнейшее изучение культур клеток с двойным нокаутом *PRIMPOL* в комбинациях с другими ферментами репарации и ДНКП транслезионного синтеза.

Финансирование. Работа (получение *PRIMPOL*^{-/-} клеток, анализ жизнеспособности клеток, доли ДНК-пролиферирующих клеток и анализ клеточного цикла) поддержана грантом Российского научного фонда № 18-14-00354 (АВМ). Д.В. Ким (участие в получении

моноклональных клеточных линий) поддержана грантом РФФИ 20-34-90092-Аспиранты. Эксперименты с ионизирующим излучением выполнены М.В. Пустоваловой при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание 075-03-2023-106, проект № FSMG-2023-0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Игнатов А. В., Бондаренко К. А., Макарова А. В. (2017) Необъемные повреждения ДНК у человека: пути образования, репарации и репликации, *Acta Naturae*, **9**, 13-28, doi: 10.32607/20758251-2017-9-3-12-26.
- Vaisman, A., and Woodgate, R. (2017) Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **52**, 274-303, doi: 10.1080/10409238.2017.1291576.
- Jain, R., Aggarwal, A. K., and Rechkoblit, O. (2018) Eukaryotic DNA polymerases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **53**, 77-87, doi: 10.1016/j.sbi.2018.06.003.
- Dash, R. C., and Hadden, K. (2021) Protein-protein interactions in translesion synthesis, *Molecules*, **26**, 5544, doi: 10.3390/molecules26185544.
- García-Gómez, S., Reyes, A., Martínez-Jiménez, M. I., Chocrón, S., Mourón, S., et al. (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells, *Mol. Cell*, **52**, 541-553, doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.025.
- Bianchi, J., Rudd, S. G., Jozwiakowski, S. K., Bailey, L. J., Soura, V., et al. (2013) PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication, *Mol. Cell*, **52**, 566-573, doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.035.
- Wan, L., Lou, J., Xia, Y., Su, B., Liu, T., et al. (2013) HPrimpol1/CCDC111 is a human DNA primase-polymerase required for the maintenance of genome integrity, *EMBO Rep.*, **14**, 1104-1112, doi: 10.1038/embor.2013.159.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Leipe, D. D., and Aravind, L. (2005) Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: Structural insights and new members, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3875-3896, doi: 10.1093/nar/gki702.
- González-Acosta, D., Blanco-Romero, E., Ubieto-Capella, P., Mutreja, K., Míguez, S., et al. (2021) PrimPol-mediated repriming facilitates replication traverse of DNA interstrand crosslinks, *EMBO J.*, **40**, e106355, doi: 10.15252/embj.2020106355.
- Piberger, A. L., Bowry, A., Kelly, R., Walker, A. K., Gonzalez, D., Bailey, L. J., et al. (2020) PrimPol-dependent single-stranded gap formation mediates homologous recombination at bulky DNA adducts, *Nat. Commun.*, **11**, 5863, doi: 10.1038/s41467-020-19570-7.
- Butler, T. J., Estep, K. N., Sommers, J. A., Maul, R. W., Moore, A. Z., Bandinelli, S., et al. (2020) Mitochondrial genetic variation is enriched in G-quadruplex regions that stall DNA synthesis *in vitro*, *Hum. Mol. Genet.*, **29**, 1292-1309, doi: 10.1093/hmg/ddaa043.
- Šviković, S., Crisp, A., Tan-Wong, S. M., Guillian, T. A., Doherty, A. J., Proudfoot, N. J., Guilbaud, G., and Sale, J. E. (2019) R-loop formation during S phase is restricted by PrimPol-mediated repriming, *EMBO J.*, **38**, e99793, doi: 10.15252/embj.201899793.
- Quinet, A., Tirman, S., Jackson, J., Šviković, S., Lemaçon, D., et al. (2019) PRIMPOL-mediated adaptive response suppresses replication fork reversal in BRCA-deficient cells, *Mol. Cell*, **77**, 461-474.e9, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.008.
- Torregrosa-Muñumer, R., Forslund, J., Goffart, S., Pfeiffer, A., Stojkovic, G., et al. (2017) PrimPol is required for replication reinitiation after mtDNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11398-11403, doi: 10.1073/pnas.1705367114.
- Kobayashi, K., Guillian, T. A., Tsuda, M., Yamamoto, J., Bailey, L. J., Iwai, S., Takeda, S., Doherty, A. J., and Hirota, K. (2016) Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides, *Cell Cycle*, **15**, 1997-2008, doi: 10.1080/15384101.2016.1191711.
- Taglialatela, A., Leuzzi, G., Sannino, V., Cuella-Martin, R., Huang, J. W., et al. (2021) REV1-Pol ζ maintains the viability of homologous recombination-deficient cancer cells through mutagenic repair of PRIMPOL-dependent ssDNA gaps, *Mol. Cell*, **81**, 4008-4025.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.016.

17. Makarova, A. V., Boldinova, E. O., Belousova, E. A., and Lavrik, O. I. (2018) *In vitro* lesion bypass by human PrimPol, *DNA Rep.*, **70**, 18-24, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.07.009.
18. Guillian, T. A., Jozwiakowski, S. K., Ehlinger, A., Barnes, R. P., Rudd, S. G., et al. (2015) Human PrimPol is a highly error-prone polymerase regulated by single-stranded DNA binding proteins, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 1056-1068, doi: 10.1093/nar/gku1321.
19. Zafar, M. K., Ketkar, A., Lodeiro, M. F., Cameron, C. E., and Eoff, R. L. (2014) Kinetic analysis of human PrimPol DNA polymerase activity reveals a generally error-prone enzyme capable of accurately bypassing 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, *Biochemistry*, **53**, 6584-6594, doi: 10.1021/bi501024u.
20. Boldinova, E. O., Yudkina, A. V., Shilkin, E. S., Gagarinskaya, D. I., Baranovskiy, A. G., et al. (2021) Translesion activity of PrimPol on DNA with cisplatin and DNA-protein cross-links, *Sci. Rep.*, **11**, 17588, doi: 10.1038/s41598-021-96692-y.
21. Mourón, S., Rodríguez-Acebes, S., Martínez-Jiménez, M. I., García-Gómez, S., Chocrón, S., Blanco, L., and Méndez, J. (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1383-1389, doi: 10.1038/nsmb.2719.
22. Bailey, L. J., Bianchi, J., Hégarat, N., Hochegeger, H., and Doherty, A. J. (2016) PrimPol-deficient cells exhibit a pronounced G2 checkpoint response following UV damage, *Cell Cycle*, **15**, 908-918, doi: 10.1080/15384101.2015.1128597.
23. Schiavone, D., Jozwiakowski, S. K., Romanello, M., Guilbaud, G., Guillian, T. A., et al. (2016) PrimPol is required for replicative tolerance of G quadruplexes in vertebrate cells, *Mol. Cell*, **61**, 161-169, doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.038.
24. Bailey, L. J., Bianchi, J., and Doherty, A. J. (2019) PrimPol is required for the maintenance of efficient nuclear and mitochondrial DNA replication in human cells, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4026-4038, doi: 10.1093/nar/gkz056.
25. Duong, V. N., Zhou, L., Martínez-Jiménez, M. I., He, L., Cosme, M., et al. (2020) Identifying the role of PrimPol in TDF-induced toxicity and implications of its loss of function mutation in an HIV+ patient, *Sci. Rep.*, **10**, 9343, doi: 10.1038/s41598-020-66153-z.
26. Jamieson, E. R., and Lippard, S. J. (1999) Structure, recognition, and processing of cisplatin – DNA adducts, *Chem. Rev.*, **99**, 2467-2498, doi: 10.1021/cr980421n.
27. Natile, G., and Cannito, F. (2009) Platinum drugs, nucleotides and DNA: the role of interligand interactions, in *Metal Complex-DNA Interactions*, pp. 135-173, doi: 10.1002/9781444312089.ch5.
28. Hay, J., Shahzeidi, S., and Laurent, G. (1991) Mechanisms of bleomycin-induced lung damage, *Arch. Toxicol.*, **65**, 81-94, doi: 10.1007/BF02034932.
29. Díaz-Talavera, A., Calvo, P. A., González-Acosta, D., Díaz, M., Sastre-Moreno, G., et al. (2019) A cancer-associated point mutation disables the steric gate of human PrimPol, *Sci. Rep.*, **9**, 1121, doi: 10.1038/s41598-018-37439-0.
30. Kang, Z., Fu, P., Alcivar, A. L., Fu, H., Redon, C., et al. (2021) BRCA2 associates with MCM10 to suppress PRIMPOL-mediated repriming and single-stranded gap formation after DNA damage, *Nat. Commun.*, **12**, 5966, doi: 10.1038/s41467-021-26227-6.
31. Pilzecker, B., Buoninfante, O. A., Pritchard, C., Blomberg, O. S., Huijbers, I. J., Van Den Berk, P. C. M., and Jacobs, H. (2016) PrimPol prevents APOBEC/AID family mediated DNA mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4734-4744, doi: 10.1093/nar/gkw123.
32. Guillian, T. A., Bailey, L. J., Brissett, N. C., and Doherty, A. J. (2016) PolDIP2 interacts with human PrimPol and enhances its DNA polymerase activities, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3317-3329, doi: 10.1093/nar/gkw175.
33. Keen, B. A., Bailey, L. J., Jozwiakowski, S. K., and Doherty, A. J. (2014) Human PrimPol mutation associated with high myopia has a DNA replication defect, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12102-12111, doi: 10.1093/nar/gku879.
34. Liu, J., Lee, W., Jiang, Z., Chen, Z., Jhunhunwala, S., et al. (2012) Genome and transcriptome sequencing of lung cancers reveal diverse mutational and splicing events, *Genome Res.*, **22**, 2315-2327, doi: 10.1101/gr.140988.112.
35. Vaisman, A., Masutani, C., Hanaoka, F., and Chaney, S. G. (2000) Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta, *Biochemistry*, **39**, 4575-4580, doi: 10.1021/bi000130k.
36. Shen, M., Qi, R., Ren, J., Lv, D., and Yang, H. (2022) Characterization with KRAS mutant is a critical determinant in immunotherapy and other multiple therapies for non-small cell lung cancer, *Front. Oncol.*, **11**, 780655, doi: 10.3389/fonc.2021.780655.
37. Yoon, Y. K., Kim, H. P., Han, S. W., Oh, D. Y., Im, S. A., et al. (2010) KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: Implication for combinatorial approach, *Mol. Carcinog.*, **49**, 353-362, doi: 10.1002/mc.20607.
38. Garassino, M. C., Marabese, M., Rusconi, P., Rulli, E., Martelli, O., et al. (2011) Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer, *Ann. Oncol.*, **22**, 235-237, doi: 10.2959/logo.2002.13.2.109.
39. Shepherd, F. A., Domerg, C., Hainaut, P., Jänne, P. A., Pignon, J. P., et al. (2013) Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of

- adjuvant chemotherapy, *J. Clin. Oncol.*, **31**, 2173–2181, doi: 10.1200/JCO.2012.48.1390.
40. Sarin, N., Engel, F., Kalayda, G. V., Mannewitz, M., Cinatl, J., et al. (2017) Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest, *PLoS One*, **12**, e0181081, doi: 10.1371/journal.pone.0181081.
 41. Gao, Y., Dorn, P., Liu, S., Deng, H., Hall, S. R. R., et al. (2019) Cisplatin-resistant A549 non-small cell lung cancer cells can be identified by increased mitochondrial mass and are sensitive to pemetrexed treatment, *Cancer Cell Int.*, **19**, 317, doi: 10.1186/s12935-019-1037-1.
 42. Ray, R., Al Khashali, H., Haddad, B., Wareham, J., Coleman, K. L., et al. (2022) Regulation of cisplatin resistance in lung cancer cells by nicotine, BDNF, and a β -adrenergic receptor blocker, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12829, doi: 10.3390/ijms232112829.

CHARACTERISTICS OF *PRIMPOL* KNOCKOUT A549 CELL RESPONSE TO GENOTOXIC STRESS

A. S. Gromova^{1,2#}, E. O. Boldinova^{1,2#}, D. V. Kim^{3,4}, R. N. Chuprov-Netochin⁵,
S. V. Leonov^{5,6}, M. V. Pustovalova⁵, D. O. Zharkov^{3,4*}, and A. V. Makarova^{1,2*}

¹ *Institute of Molecular Genetics, National Research Center “Kurchatov Institute”,
123182 Moscow, Russia; e-mail: amakarova-img@yandex.ru*

² *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

³ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*

⁴ *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

⁵ *School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology,
141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

⁶ *Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Russia*

Human DNA primase/polymerase PrimPol synthesizes DNA primers *de novo* after replication fork stalling at damaged DNA sites, contributing to DNA damage tolerance. The contribution of PrimPol in response to the various types of DNA damage is not fully understood. We obtained the lung carcinoma cells A549 with *PRIMPOL* knockout and characterized its response to DNA damage caused by hydrogen peroxide, methylmethanesulfonate (MMS), cisplatin, bleomycin and ionizing radiation. Knockout of *PRIMPOL* reduced the number of proliferating cells and cells in G2 phase after treatment with MMS, caused a more pronounced delay of cisplatin-treated cells in S phase. A significant increase in the proportion of apoptotic cells was noted in *PRIMPOL*^{-/-} cells in response to ionizing radiation at a dose of 10 Gy, while the proportion of cells prone to necroptosis increased significantly in both parental and knockout cells at any radiation dose. Under conditions of oxidative stress stimulated by hydrogen peroxide, *PRIMPOL* knockout increased cell viability, measured by the MTT method. The data obtained indicate the involvement of *PRIMPOL* in modulating stress-adaptive responses to various types of genotoxic stress.

Keywords: replication, DNA damage, damage tolerance, apoptosis, PrimPol, primase, knockout cell lines