

ISSN 0320-9725

Том 88, Номер 2

Февраль 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 2, 2023

Возможности комплексного анализа данных секвенирования РНК единичных клеток (обзор) <i>А.А. Хозяинова, А.А. Валяева, М.С. Арбатский, С.В. Исаев, П.С. Ямщиков, Е.В. Волчков, М.С. Сабиров, В.Р. Зайнуллина, В.И. Чечехин, Р.С. Воробьёв, М.Е. Меньяло, П.А. Тюрин-Кузьмин, Е.В. Денисов</i>	171
рН-Зависимые редокс-свойства галлата эпигаллокатехина (EGCG) и его действие на дыхание, фотосинтез и гибель клеток гороха <i>Д.Б. Киселевский, О.В. Самуилова, В.Д. Самуилов</i>	199
Новый гибрид донепезил—кофейная кислота: синтез, биологическая оценка и молекулярный докинг <i>D. Kılıçaslan, A. H. Kurt, M. Köse, M. Çeşme, Ö. Güngör, C. K. Oztabag, A. Doganer</i>	211
Влияние активатора кальций-зависимого K ⁺ -канала NS1619 на функцию митохондрий в сердце дистрофин-дефицитных мышей <i>М.В. Дубинин, В.С. Старинец, Ю.А. Челядникова, Н.В. Белослудцева, И.Б. Михеева, Д.К. Пенкина, А.Д. Игошкина, Е.Ю. Таланов, И.И. Киреев, Д.Б. Зоров, К.Н. Белослудцев</i>	228
Дисбаланс плацентарных ангиогенных и ростовых факторов при материнской гипергомоцистеинемии <i>А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко, Ю.П. Милютин, А.Д. Щербицкая, И.В. Залозная, А.В. Михель, Д.Б. Иноземцева, Д.С. Васильев, А.А. Коваленко, И.Ю. Коган</i>	243
5,7-Диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновые кислоты в капсульных полисахаридах <i>Acinetobacter baumannii</i> (обзор) <i>Ю.А. Книрель, А.А. Касимова, Н.П. Арбатский, М.М. Шнейдер, А.В. Попова, Ф.А. Бровко, А.С. Шашков, С.Н. Сенченкова, А.В. Перепелов, А.М. Шпирт</i>	263
Изменение активности MEK1/2—ERK1/2-сигнального пути в сетчатке крыс с возрастом и при развитии признаков возрастной макулярной дегенерации <i>Н.А. Муралёва, Н.Г. Колосова</i>	274
Эволюция систем рестрикции-модификации, содержащих одну эндонуклеазу рестрикции и две ДНК-метилтрансферазы <i>А.С. Фокина, А.С. Карягина, И.С. Русинов, Д.М. Мошенский, С.А. Спирин, А.В. Алексеевский</i>	285
Кумулятивное влияние параоксона и лептина на процесс окислительного повреждения в тканях крыс: профилактическая и терапевтическая роль N-ацетилцистеина <i>S. Khazaie, M. Jafari, M. Golamloo, A. Asgari, J. Heydari, M. Salehi, F. Saleem</i>	295
Узнавание γ-субъединицы β-субъединицей. Стабилизация GTP-связанного состояния фактора инициации трансляции 2 архей и эукариот <i>О.С. Никонов, Е.Ю. Никонова, А.Г. Тарабарова, А.О. Михайлина, О.В. Кравченко, Н.А. Невская, С.В. Никонов</i>	311
Лечебный потенциал ценных фитохимических веществ при инфекции COVID-19 (обзор) <i>D. Sruthi, M. Dhanalakshmi, H. Ch. Y. Rao, R. Parthasarathy, Sh. P. Deepanraj, C. Jayabaskaran</i>	324
Взаимодействие адипоцитов и В-лимфоцитов при метаболических заболеваниях человека (обзор) <i>Е.М. Стасевич, Э.А. Жеремян, Д.В. Купраш, А.М. Шварц</i>	335

КОММЕНТАРИЙ

К комментарию А.И. Михальского о статье Л.А. Гаврилова и Н.С. Гавриловой «Исторические тренды видовой продолжительности жизни человека и актуарной скорости старения», опубликованному в т. 88, вып. 1, с. 164—165 <i>Л.А. Гаврилов, Н.С. Гаврилова</i>	345
--	-----

CONTENTS

Vol. 88, Issue 2, 2023

Opportunities of Complex Analysis in Single-Cell RNA Sequencing (Review) <i>A. A. Khozyainova, A. A. Valyaeva, M. S. Arbatsky, S. V. Isaev, P. S. Iamshchikov, E. V. Volchkov, M. S. Sabirov, V. R. Zainullina, V. I. Chechekhin, R. S. Vorobev, M. E. Menyailo, P. A. Tyurin-Kuzmin, and E. V. Denisov</i>	171
pH-Dependent Redox Properties of Epigallocatechin Gallate (EGCG) and Its Effect on Respiration, Photosynthesis and Cell Death in Pea <i>D. B. Kiselevsky, O. V. Samuilova, and V. D. Samuilov</i>	199
A Novel Donepezil–Caffeic Acid Hybrid: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Studies <i>D. Kılıçaslan, A. H. Kurt, M. Köse, M. Çeşme, Ö. Güngör, C. K. Oztabag, A. Doganer</i>	211
Effect of the Large-Conductance Calcium-Dependent K ⁺ Channel Activator NS1619 on the Function of Mitochondria in the Heart of Dystrophin-Deficient Mice <i>M. V. Dubinin, V. S. Starinets, Y. A. Chelyadnikova, N. V. Belosludtseva, I. B. Mikheeva, D. K. Penkina, A. D. Igoshkina, E. Y. Talanov, I. I. Kireev, D. B. Zorov, and K. N. Belosludtsev</i>	228
Imbalance of Angiogenic and Growth Factors in the Placenta in Maternal Hyperhomocysteinemia <i>A. V. Arutjunyan, G. O. Kerkeshko, Yu. P. Milyutina, A. D. Shcherbitskaia, I. V. Zalozniaia, A. V. Mikhel, D. B. Inozemtseva, D. S. Vasilev, A. A. Kovalenko, and I. Yu. Kogan</i>	243
5,7-Diamino-3,5,7,9-Tetradeoxynon-2-Ulosonic Acids in Capsular Polysaccharides of <i>Acinetobacter baumannii</i> (Review) <i>Y. A. Knirel, A. A. Kasimova, N. P. Arbatsky, M. M. Shneider, A. V. Popova, F. A. Brovko, A. S. Shashkov, S. N. Senchenkova, A. V. Perepelov, and A. M. Shpirt</i>	263
Alteration of the MEK1/2–ERK1/2 Signaling Pathway in the Retina with Age and with the Development of AMD-Like Retinopathy <i>N. A. Muraleva and N. G. Kolosova</i>	274
Evolution of Restriction-Modification Systems with One Restriction Endonuclease and Two DNA Methyltransferases <i>A. S. Fokina, A. S. Karyagina, I. S. Rusinov, D. M. Moshensky, S. A. Spirin, and A. V. Alexeevski</i>	285
Cumulative Effects of Paraoxon and Leptin on Oxidative Damages in Rat Tissues: Prophylactic and Therapeutic Roles of N-Acetylcysteine <i>S. Khazaie, M. Jafari, M. Golamloo, A. Asgari, J. Heydari, M. Salehi, and F. Salem</i>	295
Recognition of γ -Subunit by β -Subunit. Stabilization of the GTP-Bound State of Translation Initiation Factor 2 in Archaea and Eukaryotes <i>O. S. Nikonov, E. Yu. Nikonova, A. G. Tarabarova, A. O. Mikhaylina, O. V. Kravchenko, N. A. Nevskaya, and S. V. Nikonov</i>	311
Curative Potential of High-Value Phytochemicals on COVID-19 Infection (Review) <i>D. Sruthi, M. Dhanalakshmi, H. Ch. Y. Rao, R. Parthasarathy, Sh. P. Deepanraj, and C. Jayabaskaran</i>	324
Interaction Between Adipocytes and B Lymphocytes in Human Metabolic Diseases (Review) <i>E. M. Stasevich, E. A. Zheremyan, D. V. Kuprash, and A. M. Schwartz</i>	335

COMMENTARY

On the Commentary by Anatoly I. Mikhalsky 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. 88, N. 1, pp. 164-165 <i>Leonid A. Gavrilov and Natalia S. Gavrilova</i>	345
--	-----

ВОЗМОЖНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ РНК ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК

Обзор

© 2023 А.А. Хозяинова^{1*}, А.А. Валяева², М.С. Арбатский²,
С.В. Исаев^{3,4}, П.С. Ямщиков^{1,5}, Е.В. Волчков⁶, М.С. Сабиров⁷, В.Р. Зайнуллина¹,
В.И. Чечехин², Р.С. Воробьев¹, М.Е. Меняйло¹, П.А. Тюрин-Кузьмин², Е.В. Денисов¹

¹ Научно-исследовательский институт онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
634050 Томск, Россия; электронная почта: khozainova@onco.tnims.ru

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

³ Институт персонализированной медицины,
Национальный центр персонализированной медицины эндокринных заболеваний,
Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии,
117036 Москва, Россия

⁴ Московский физико-технический институт, физтех-школа биологической и медицинской физики,
115184 Долгопрудный, Россия

⁵ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
634050 Томск, Россия

⁶ ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России,
117198 Москва, Россия

⁷ ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.09.2022

После доработки 13.12.2022

Принята к публикации 13.12.2022

Секвенирование РНК единичных (отдельных/индивидуальных) клеток (single-cell RNA-sequencing, scRNA-seq) является революционным инструментом для изучения физиологии нормальных и патологически изменённых тканей. Данный подход предоставляет информацию о молекулярных особенностях (генной экспрессии, мутациях, степени открытости хроматина и др.) клеток, открывает возможность для анализа траекторий клеточной дифференцировки/филогении и межклеточных взаимодействий и позволяет обнаруживать новые типы клеток и ранее неизученные процессы. В клиническом аспекте scRNA-seq позволяет проводить более глубокий и детальный анализ молекулярных механизмов развития различных заболеваний и предоставляет основу для разработки новых профилактических, диагностических и терапевтических решений. В данном обзоре описываются различные подходы к анализу данных scRNA-seq, рассматриваются сильные стороны и недостатки биоинформатических инструментов, приводятся рекомендации и примеры их успешного использования и предлагаются потенциальные направления в области их совершенствования. Также подчёркивается необходимость создания новых, в том числе мультиомиксных, протоколов для подготовки библиотек единичных клеток с целью получения более полного и системного представления о каждой клетке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: секвенирование РНК единичных клеток, клеточный цикл, кластеризация, дифференциальная экспрессия, клеточные типы, траектории развития, межклеточная коммуникация, генные регуляторные сети, вариации числа копий ДНК, однонуклеотидные замены, филогенетика, эпигеномика, пространственная транскриптомика.

DOI: 10.31857/S032097252302001X, **EDN:** QFSJMW

Принятые сокращения: ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; aCGH – микроматричная сравнительная геномная гибридизация; bulk RNA-seq – секвенирование тотальной РНК; CNV – вариации числа копий ДНК; MLPA – амплификация лигированных зондов; SNV – однонуклеотидные замены; scRNA-seq – секвенирование РНК единичных клеток; WGCNA – анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов; WGS – полногеномное секвенирование.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Секвенирование РНК единичных клеток (single-cell RNA-sequencing, scRNA-seq) стало поистине революционным методом, позволившим в значительной степени расширить понимание гетерогенности и динамики транскриптома клеток в различных биологических объектах. Впервые данный метод был применён в 2009 г. для изучения бластомеров мыши на стадии второго деления [1]. Именно тогда было показано, что секвенирование единичных клеток существенно превосходит технологию микрочипов для количественного анализа экспрессии генов. Однако главным ограничением того времени являлась невозможность мультиплексирования образцов, и библиотека каждой клетки создавалась вручную в отдельной пробирке. Однако уже в 2011 г. был разработан первый протокол мультиплексного scRNA-seq [2], а в 2014 г. — первая коммерчески доступная платформа автоматической подготовки библиотек единичных клеток Fluidigm C1 [2]. На настоящий момент

доступны различные платформы для выполнения scRNA-seq, среди которых Fluidigm C1/Smart-seq, BD Rhapsody («BD Biosciences», США), Chromium («10x Genomics», США) и другие, которые обеспечивают высокую производительность данного типа анализа [3, 4].

Процесс scRNA-seq схематически представлен на рис. 1. Посредством гомогенизации из исследуемого образца получают суспензию клеток, которые далее разделяются либо физически, например, с помощью сортировки и микроманипуляции, либо посредством баркодирования с использованием олигонуклеотидов в составе планшето́в или на основе микрофлюидики и комбинаторики [5, 6]. Образцы крови и клеточных культур подвергают сортировке и микроманипуляции без подготовки суспензии. Полученные клетки используют для подготовки библиотек и последующего секвенирования, данные которого обрабатываются биоинформатически.

Развитие технологий в области scRNA-seq позволило охарактеризовать основные клеточные и молекулярные механизмы, вовлечённые

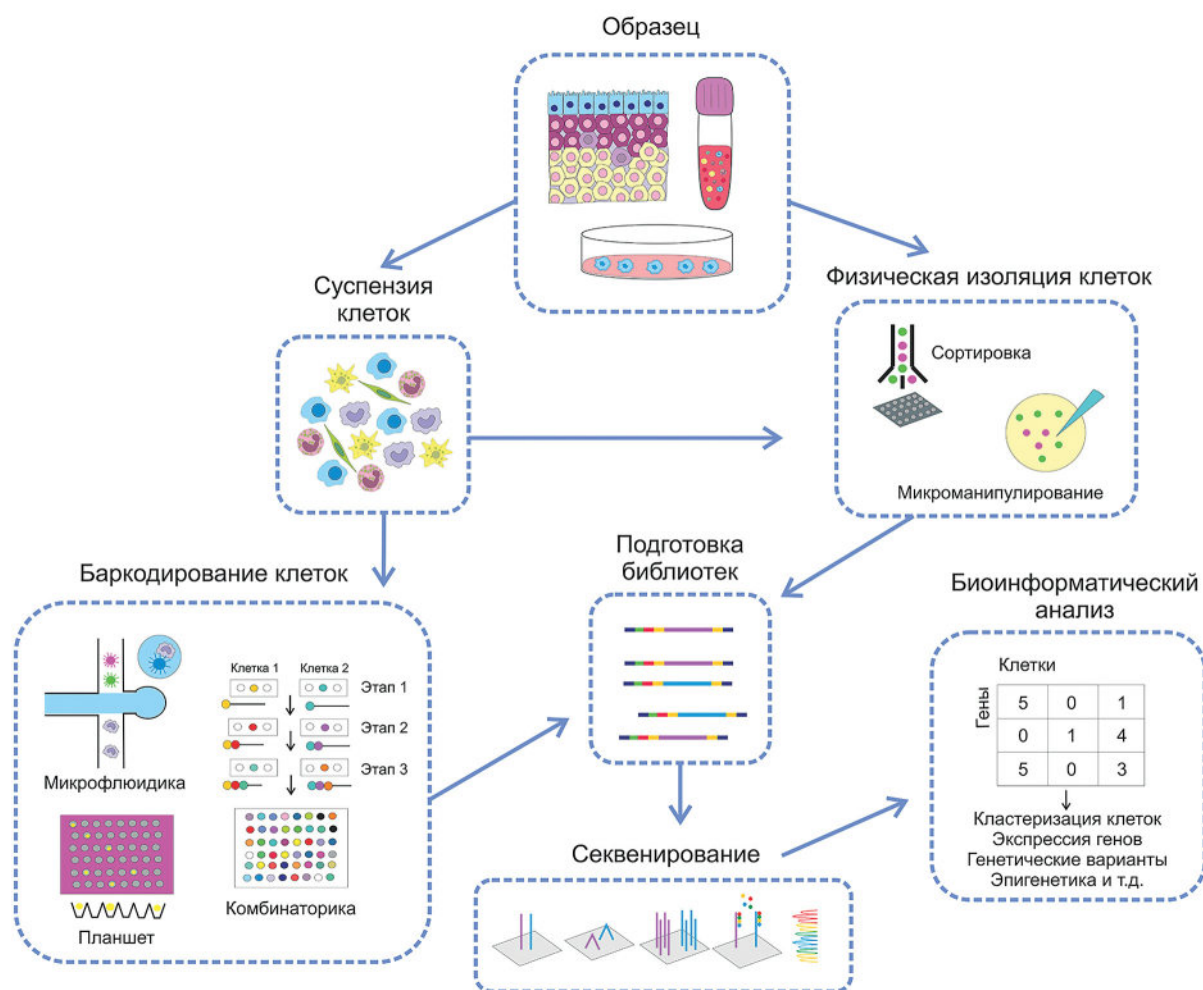


Рис. 1. Процесс scRNA-seq

В начале развития эры секвенирования единичных клеток исследователи в большей степени акцентировали внимание на изучении популяционного состава исследуемых образ-

В данном обзоре мы описываем прогресс в области обработки данных scRNA-seq и связанные с ним методы анализа для получения информации о клеточном цикле, клеточных



Рис. 2. Подходы биоинформатического анализа данных scRNA-seq

кластерах и типах клеток, дифференциально экспрессирующихся генах (ДЭГ), траекториях развития и скорости РНК (Cell trajectory inference and RNA Velocity), межклеточных взаимодействиях, генетических вариантах, включая вариации числа копий ДНК (CNV) и однонуклеотидные замены (SNV), филогении клеток, доступности хроматина, сайтах связывания транскрипционных факторов и пространственной транскриптомики (рис. 2). Для каждого из мультимодальных приложений подчёркиваются сильные стороны, недостатки, возможные пути их преодоления и биологические примеры использования.

ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Секвенирование РНК единичных клеток, в отличие от секвенирования тотальной РНК (bulk RNA-seq), позволяет получить информацию о транскрипционном профиле каждой индивидуальной клетки в исследуемом образце. С помощью scRNA-seq возможно исследование клеточного многообразия тканей, обнаружение ранее неизвестных популяций клеток и изучение биологических процессов на уровне единичных клеток. Однако увеличению разрешения метода сопутствует и повышение доли технического и биологического шума в данных. При этом одним из главных источников биологического шума в данных scRNA-seq оказывается клеточный цикл [17]. При анализе данных scRNA-seq стадия клеточного цикла часто рассматривается как конфаундер, то есть та переменная, которая может исказить биологический эффект, искомый исследователем, будь то различия между клеточными типами или изменения транскрипционных программ при заболеваниях или в процессе лечения. Клетки исследуемого образца могут находиться в различных временных точках и, соответственно, иметь различные профили экспрессии, даже если они являются клетками одного типа. Поэтому на этапе подготовки матрицы генной экспрессии для последующего анализа возможно удаление из данных дисперсии, связанной с клеточным циклом. Эта процедура представляется особо целесообразной, когда исследователь не ожидает увидеть в своих данных активно пролиферирующие клетки, например, при изучении апоптоза. Также удаление генов клеточного цикла или пролиферирующих клеток целесообразно в случае, если большая часть наиболее вариабельных генов представлена генами клеточного цикла, что отрицательно сказывается на определении

дифференциальной экспрессии. Однако в некоторых случаях, например, при сравнении субпопуляций делящихся и неделящихся клеток, информация о стадии клеточного цикла может оказаться важной, и данный конфаундер удалять не стоит.

Популярные программные пакеты для анализа данных scRNA-seq, такие как Seurat [18] и Scanpy [19], предлагают считать два параметра [20], основанных на усреднённой экспрессии известных генов-маркеров стадий клеточного цикла S и G2/M [21]. В зависимости от рассчитанных значений параметра клетка может быть проаннотирована как находящаяся на стадии G2/M, G1 или S клеточного цикла. Удаление эффекта, связанного с клеточным циклом, происходит с помощью линейной регрессии, в которой учитываются рассчитанные параметры. Если для последующего анализа необходимо сохранить разделение между субпопуляциями делящихся и покоящихся клеток и одновременно избавиться от различий в стадиях клеточного цикла, то рекомендуется в линейной регрессии использовать не G2/M- и S-параметры, а разницу между ними.

Ещё один метод Cyclone [20] также использует известные гены-маркеры стадий клеточного цикла для оценки и удаления эффектов, связанных с клеточным делением. Однако этот алгоритм построен на сравнении экспрессии пар маркерных генов, поскольку их отношение позволяет определить стадию клеточного цикла, в которой клетка находится.

Другие методы позволяют проводить более подробный анализ клеточного цикла на основе данных scRNA-seq и реконструировать продвижение индивидуальных клеток по клеточному циклу. Некоторые из них, такие как reso [22] и reCAT [23], как и вышеперечисленные методы, используют наборы известных генов, ассоциированных с клеточным циклом. Другие алгоритмы (Cyclum [24], CYCLOPS [25] и CCPE [26]) основаны на обучении без учителя (unsupervised learning/самообучение) и для расчёта «псевдовремени» клеточного цикла учитывают цикличность в экспрессии генов. При этом с помощью этих алгоритмов можно экстрагировать информацию о генах, наиболее ассоциированных с каждой из стадий клеточного цикла.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КЛАСТЕРОВ

Типичный анализ данных экспрессии генов в единичных клетках, полученных с помощью scRNA-seq, начинается с определения

клеточного состава исследуемого образца. На этом этапе происходит объединение индивидуальных клеток в транскрипционные кластеры на основе сходства их профилей экспрессии и определение клеточного типа каждого из кластеров по уровням экспрессии специфических и дифференциально-экспрессирующихся маркерных генов. Для решения этих задач используются алгоритмы кластеризации данных и методы анализа дифференциальной экспрессии генов. Однако эти алгоритмы и методы применимы не только в контексте первоначального анализа данных scRNA-seq, их можно использовать и как самостоятельные инструменты для решения конкретных биологических задач.

Анализ ДЭГ применяется для исследования влияния различных патологических или экспериментальных условий на транскрипционные профили изучаемых популяций клеток. С помощью такого подхода были определены гены и ассоциированные с ними клеточные процессы, активируемые и подавляемые в разных типах клеток при COVID-19 [27, 28], болезни Альцгеймера [29], аутизме [30] и многих других заболеваниях. Кроме того, дифференциальный анализ находит применение в идентификации генов, чья экспрессия меняется при клеточной дифференцировке или другом динамическом процессе, затрагивающем фенотипы популяций клеток. Также данный метод может применяться для отбора генов, экспрессия которых необходима для построения клеточных траекторий.

Применение алгоритмов кластеризации также не ограничивается начальным этапом анализа данных scRNA-seq. Кластеризация клеток как элементов набора данных может быть проведена несколько раз последовательно при биоинформатическом анализе, например, с целью поиска редких популяций клеток [31]. При этом повторная кластеризация клеток может проводиться не по всему изначальному набору экспрессионных профилей, а, например, по генной подписи — определённому набору генов, по которым можно идентифицировать интересующий тип клеток — или по любому другому набору признаков, описывающих клетку.

Аннотация клеток проводится не только для определения их типов, но и для других задач. Например, кластеры клеток можно аннотировать по вирусной нагрузке и их состоянию [32].

Текущий и два последующих раздела настоящего обзора рассказывают о каждой биоинформатической задаче в отдельности: определении кластеров, поиске ДЭГ и идентификации клеточных типов.

Определение клеточных, или транскрипционных кластеров в данных scRNA-seq, осуществляемое с помощью алгоритмов кластеризации, — это одна из популярных задач обучения без учителя. Цель кластеризации заключается в объединении похожих по своим транскрипционным профилям клеток в группы, которые затем можно охарактеризовать как кластеры одного клеточного типа, одной стадии дифференцировки или клеточного цикла. Стоит понимать, что кластеры — это математически определяемые группы клеток, которые действительно могут состоять из клеток одного типа, однако на практике биология зачастую имеет малое отношение к алгоритмам кластеризации.

На настоящий момент существует множество применимых для кластеризации scRNA-seq методов, каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками. Консенсуса о наиболее эффективном методе до сих пор нет [33]. Методы кластеризации данных scRNA-seq основываются на широко применяемых алгоритмах, таких как иерархическая кластеризация, метод *k*-средних и кластеризация графов. На кластеризацию клеток оказывает влияние не только выбор метода и его параметров, но и увеличение количества измеряемых данных. При экспоненциальном возрастании их количества происходит увеличение размерности, что сопровождается возникновением «проклятия размерности». Многомерность данных приводит к сближению индивидуальных клеток, что вызывает проблемы в определении расстояния между клетками. Наиболее удалённые (различающиеся по экспрессии множества генов) клетки в многомерных данных находятся на таком же расстоянии, что и наиболее близкие (похожие по профилю РНК). Из-за этой проблемы стандартные методы кластеризации не могут разделить отличные по паттерну РНК клетки. Для многомерных данных scRNA-seq для снижения размерности и ускорения вычислений проводят отбор значимых генов и применяют метод главных компонент (*principal component analysis*, PCA). В качестве значимых генов (признаков) могут быть выбраны высоко-вариабельные гены (*highly variable genes*, HVG), чья экспрессионная изменчивость объясняется преимущественно биологическими различиями между анализируемыми клетками, а не техническим шумом [34]. Также существуют методы для моделирования технического шума и отбора значимых генов, например, на основе построенной модели M3Drop [35]. Для кластеризации данных затем используются расстояния между клетками в пространстве пониженной размерности.

Алгоритм иерархической кластеризации подразумевает под собой объединение клеток в растущие кластеры (восходящий, или агломеративный подход) или разбиение кластеров на подгруппы (нисходящий, или дивизионный подход) на основании матрицы расстояний между клетками. Программы, использующие этот алгоритм для идентификации клеточных субпопуляций, например, *pcaReduce* [36] или *CIDR* [37], позволяют определять взаимоотношения между кластерами с помощью дендрограммы, но по сравнению с другими методами кластеризации работают медленнее, что может быть критично для больших объёмов данных *scRNA-seq*.

Метод кластеризации данных *scRNA-seq* *SC3* [38] использует в своей основе алгоритм *k*-средних, идея которого заключается в итеративном определении центров масс (центроидов) заданного числа кластеров и уточнении границ кластеров. Отличительной особенностью методов, основанных на алгоритме *k*-средних, является получение кластеров примерно одного размера. В такой ситуации большие субпопуляции клеток будут разбиваться на несколько кластеров, а редкие клетки будут объединены с другими кластерами. Кроме того, результат кластеризации с помощью *k*-средних во многом зависит от случайной инициализации центроидов и не обязательно представляет собой глобальный минимум.

В случае больших данных *scRNA-seq* для более оптимального решения проблемы определения клеточных кластеров предлагают методы кластеризации, основанные на поиске кластеров в графах — лувенский метод (*Louvain method*) и алгоритм Лейдена (*Leiden method*). Данные методы предварительно строят граф *k* ближайших соседей (*kNN*-граф), используя проекцию данных в пространство пониженной размерности, и затем определяют кластеры клеток как группы наиболее плотно связанных друг с другом вершин графа. Количество определяемых кластеров напрямую не задаётся, но на него влияет значение параметра разрешения, а также указанное число *k* ближайших соседей, используемое для построения графа. Графовый подход для идентификации субпопуляций реализован в программе *PhenoGraph* [39] и программных пакетах *Seurat* [18] и *Scanpy* [19]. Более подробно преимущества и недостатки каждой из групп методов описаны *Kiselev et al.* [33].

С помощью кластеризации данных *scRNA-seq* можно обнаружить уже известные типы или состояния клеток с характерной высокой экспрессией ряда генов-маркеров или определить ранее не описанные популяции кле-

ток, существование которых впоследствии подтверждается дополнительными экспериментами, например, иммуноокрашиванием [40, 41]. При этом для поиска редких и малочисленных субпопуляций клеток возможно использование более сложных подходов для нормализации данных [41] и ре-кластеризации отобранных, одного или нескольких наиболее интересных, кластеров [31]. Избавиться от биологического шума в данных *scRNA-seq*, вызванного контаминацией исследуемой ткани, возможно с помощью удаления кластера нецелевых клеток с последующей ре-кластеризацией данных [40].

АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ

Анализ дифференциальной экспрессии генов позволяет установить различия между кластерами и определить клеточные типы и их маркеры. Дифференциальная экспрессия позволяет изучить транскрипционную динамику в процессе дифференцировки клеток, развития заболеваний или при воздействии каких-либо экзогенных и/или эндогенных факторов.

Несмотря на то что задачи поиска ДЭГ на основе данных *bulk RNA-seq* и *scRNA-seq* формулируются схожим образом, методы их решения различны. Методы анализа дифференциальной экспрессии по данным *bulk RNA-seq*, такие как *DESeq2* [42] и *edgeR* [43], учитывают сложность в определении дисперсии экспрессии генов на основании малого количества повторностей — биологически различных образцов из одной экспериментальной группы. Такой проблемы в *scRNA-seq* не существует, так как каждую клетку можно рассматривать как повторность. Однако увеличение количества измерений (клеток) может привести к ложноположительным результатам. Например, в одном из кластеров экспрессия гена может быть повышена статистически значимо, но всего в 1,1 раза. Если уменьшить количество измерений, статистическая значимость может быть полностью нивелирована. В связи с этим следует находить ДЭГ, повышенные до определённого уровня, причём для каждого конкретного данных значение этого порога будет различно. Тем не менее, вышеуказанные методы оказываются применимыми и для анализа данных *scRNA-seq*. Так, для анализа ДЭГ с помощью *DESeq2* и *edgeR* из данных *scRNA-seq* используют процедуру взвешивания значений экспрессии для каждой клетки

и каждого гена, которая позволяет преодолеть проблему высокой разреженности данных scRNA-seq ввиду чрезвычайно высокой доли генов с нулевой экспрессией в каждой клетке. Ранее методы, специально разработанные для анализа scRNA-seq, решали эту проблему за счёт использования отрицательной биномиальной модели с избытком нулей (zero-inflated negative binomial, ZINB) [44]. Но сегодня для scRNA-seq рекомендуется использовать отрицательную биномиальную модель без избытка нулей (negative binomial, NB) [45]. Кроме того, при сравнении эффективности методов анализа дифференциальной экспрессии было показано, что при простом дизайне эксперимента (сравнение контроля и «эксперимента» в отсутствии других переменных) лучшие результаты показывает непараметрический тест Манна–Уитни [46].

Однако вышеперечисленные методы не учитывают ряд особенностей, характерных для данных scRNA-seq. Так, распределение экспрессии генов в единичных клетках отличается бимодальностью. Значения экспрессии либо положительны в тех клетках, где соответствующий транскрипт был детектирован, либо равны нулю в клетках, где по некоторой биологической или технической причине экспрессия не была детектирована. Отсутствие экспрессии может объясняться её стохастической природой (биологическая причина) или потерей транскрипта на этапе подготовки кДНК-библиотек (техническая причина). Данная особенность транскриптомики единичных клеток принята во внимание в таких методах, как SCDE [47] и MAST [48]. Метод SCDE использует комбинацию отрицательного биномиального распределения для положительных значений экспрессии и Пуассоновского для «нулевых» генов, в случае которых может присутствовать также фоновый сигнал. Метод SCDE возможно использовать только для поиска ДЭГ между двумя группами клеток (контроль и «эксперимент»). Использование в SCDE других переменных, таких как номер группы образцов (batch-переменная) или временная точка, невозможно, что ограничивает применимость данного метода только для экспериментов с простым дизайном. Метод MAST учитывает более сложные дизайны экспериментов, например, с несколькими вариантами «воздействия», и использует модель преодоления препятствий (hurdle model) для описания экспрессии генов в единичных клетках.

Поиск ДЭГ между субпопуляциями клеток зависит от этапа кластеризации, в ходе кото-

рого используется та же самая информация об экспрессии генов в индивидуальных клетках. По этой причине анализ дифференциальной экспрессии, следующий за кластеризацией клеток, приводит к искусственно заниженным значениям статистической значимости (p -значение). Данная проблема решается с помощью теста TN (truncated normal), который учитывает уровни экспрессии генов, определяющие границы между клеточными кластерами [49].

Идея о том, что каждая индивидуальная клетка представляет из себя независимый образец, в действительности является серьёзным допущением, поскольку все клетки в образце обычно объединены общим происхождением от одного или нескольких доноров. Поэтому при сравнении субпопуляций клеток, полученных из одного организма, происходит оценка вариабельности транскрипционных профилей не в популяции, а только внутри одного индивидуума. Если в наборе данных присутствует выборка клеток, полученных от нескольких доноров, то для анализа дифференциальной экспрессии можно использовать подход с подсчётом агрегированной (псевдобалк, pseudobulk) экспрессии или обобщённую линейную смешанную модель, в которой донор указан как случайный фактор [50]. Агрегированная экспрессия рассчитывается путём суммирования или усреднения экспрессии гена среди клеток каждого из доноров, в результате чего получается несколько псевдоповторностей, соответствующих независимым донорам. Таким образом, с помощью данного подхода задача анализа ДЭГ на основе данных scRNA-seq сводится к задаче, которая уже успешно решается для bulk RNA-seq.

Однако результаты анализа дифференциальной экспрессии, полученные с использованием bulk RNA-seq и scRNA-seq, могут значительно различаться. В случае scRNA-seq дифференциальная экспрессия детектируется преимущественно среди генов с высоким средним уровнем экспрессии, но средними значениями разницы в экспрессии между сравниваемыми группами (fold change) [51]. В связи с этим с помощью scRNA-seq-подходов оказывается труднее идентифицировать гены с сильным изменением уровня экспрессии в ответ на изучаемое воздействие.

Из-за особенностей протоколов подготовки scRNA-seq-библиотек, а именно использования олиго(dT)-праймеров в подавляющем большинстве методов, в транскриптомах единичных клеток детектируются преимущественно полиаденилированные РНК — мРНК и некоторые длинные некодирующие РНК

(днРНК). Для анализа экспрессии других типов РНК на уровне единичных клеток, например, микроРНК (миРНК), используются специальные методы пробоподготовки образцов [52]. Тем не менее, судить об активности микроРНК в индивидуальных клетках возможно, используя в качестве такой оценки уровень экспрессии предшественников микроРНК, которые могут полиаденилироваться и экспироваться, тем самым обеспечивая своё попадание в секвенируемый транскриптом.

С помощью анализа дифференциальной экспрессии с использованием scRNA-seq на клеточном уровне были определены причины нарушения регенерации эпителия альвеол лёгких при COVID-19 [27, 53] и охарактеризованы особенности цитокинового шторма и иммунного ответа на вирусную инфекцию, который обеспечивается разными типами иммунных клеток [54]. Выявлены маркеры, вовлечённые в лекарственную резистентность и прогрессирование саркомы Юинга [55]. Оценена функциональная гетерогенность мультипотентных стромальных клеток человека и мыши по характеру экспрессии аденилатциклаз [56]. Изменения экспрессии генов в процессе клональной экспансии и возможного сопутствующего истощения Т-клеток при противоопухолевой иммунотерапии также были изучены на уровне единичных клеток с помощью методов дифференциальной экспрессии [57]. Эти же методы используются для поиска генных сигнатур, то есть наборов предиктивных маркеров, которые могли бы предсказывать ответ на иммунотерапию с использованием ингибиторов контрольных точек иммунного ответа [58].

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТИПОВ

Общепринято, что идентификация типов клеток выполняется стандартными гистологическими методами, из которых основным является иммуноокрашивание — связывание антител с белковыми маркерами клеток и последующая визуализация. Альтернативой может быть РНК-секвенирование и последующее биоинформатическое типирование, когда маркеры клеток детектируются на уровне транскриптов. Однако хорошо известно, что наличие мРНК в клетке не всегда коррелирует с продукцией соответствующего белка ввиду обилия посттранскрипционных и посттрансляционных механизмов регуляции [59, 60]. Типирование клеток, основанное на scRNA-seq, может быть автоматическим или ручным.

Автоматическое типирование. Автоматическое типирование осуществляется за счёт сравнения клеток изучаемого образца с известными маркерными генами, информация о которых представлена в различных базах, содержащих данные микрочипов, bulk RNA-seq или scRNA-seq для клеток определённого типа. В случае совпадения профилей экспрессии программа автоматически определяет тип клетки. По такому принципу работает R-пакет SingleR [61], в состав которого входит пакет cellDex, содержащий доступ к семи клеточным базам. Для типирования клеток в автоматическом режиме также возможно использовать инструменты ScType [62], scCATCH [63], scSorter [64] и SCINA [65]. В своей работе автоматические аннотаторы могут использовать ранее проведённую кластеризацию или проводить её перерасчёт в соответствии с клеточными типами, которые были обнаружены в образце. Важно отметить, что автоматические аннотаторы способны распознавать ограниченное число клеточных типов ввиду отсутствия данных об экспрессионных профилях множества типов клеток в используемых базах.

Ещё одним способом аннотировать клетки в автоматическом режиме является использование аннотированных образцов других исследовательских групп. В биоинформатике эта методика называется label transferring [66]. Суть этого метода состоит в том, что в исследуемом образце сначала находятся клетки, совпадающие по паттерну экспрессии с образцом-эталоном. После того как найдены якорные клетки (совпадающие между образцами), на определяемый образец переносится информация о типе клетки с образца-эталоны. По такому принципу работает веб-сервис Azimuth [67]. На сегодняшний день в веб-сервисе доступны 11 наборов эталонных данных.

Существует и промежуточный вариант автоматического типирования с созданием собственной библиотеки аннотированных образцов именно тех клеток, с которыми работает исследователь. Этот подход позволяет самостоятельно отобрать самые лучшие открытые данные и иметь чёткое представление о дизайне эксперимента, в котором эти образцы были получены.

Ручное типирование. Необходимость ручного типирования прежде всего обусловлена наличием большей части клеток исследуемого образца в промежуточных, недифференцированных формах. Такие клетки, как правило, не имеют специфических маркеров, характерных для их дифференцированных форм,

и не могут быть проаннотированы системами автоматического типирования. Кроме того, в реальной практике классических генов-маркеров может быть недостаточно для идентификации и дифференцированных форм. В таких случаях тип клеток может быть определён вручную, на основании менее известных или заданных пользователем маркерных генов [68]. Также, по нашему мнению, типирование клеток может быть основано на анализе их вовлечённости в различные биологические процессы, переходных генов или положения клеток исследуемого образца относительно траектории развития.

Типирование по менее известным или заданным пользователем специфическим маркерам в большей мере подходит для определения типа дифференцированных клеток и осуществляется за счёт изучения списка генов каждого кластера, полученного после этапа кластеризации. Исследователь визуально оценивает список высокопредставленных генов на предмет наличия определённых маркеров и при условии их наличия аннотирует клетки к известному типу. Ещё одной возможной реализацией данного подхода является присвоение кластерам клеточного типа на основании заданных пользователем маркеров в Seurat и Scanpy. Маркерные гены могут быть выбраны пользователем на основании литературных данных. Так, использование заранее заданной панели генов позволило выявить типы клеток при сравнительном анализе идентичных регионов мозга высших приматов [69]. Данный вид типирования использовался и при идентификации субпопуляций клеток фолликулярной лимфомы, которые выявляются при прогрессировании и рецидивировании заболевания [70].

Типирование по биологическим процессам основано на выявлении групп генов, участвующих в определённых биохимических процессах, специфичных для некоторых клеток в контексте индуцирующего воздействия. По списку ДЭГ можно определить биологические процессы, которые активны в данном кластере клеток. Для этого очень удобно использовать веб-сервис g:Profiler, который объединяет информацию о ДЭГ кластера и определяет все биологические процессы, сигнальные пути и клеточные компоненты, за которые ответственны белковые продукты этих генов. С помощью данного подхода становится возможным типирование клеток, находящихся в процессе дифференцировки на основании детекции маркеров, ассоциированных с изменением клеточного фенотипа.

Типирование по переходным генам, в отличие от первых двух способов ручного типирования, помимо белок-кодирующих транскриптов, учитывает несплайсированные формы будущих мРНК. Соотношение сплайсированных и несплайсированных форм мРНК позволяет оценить, в каком состоянии находится экспрессия того или иного белка на момент исследования — индуцированном или репрессированном, и выделить те гены, которые являются ключевыми для развития клетки на момент анализа, например, с помощью пакета scVelo [71]. Среди данных генов вручную осуществляется поиск ответственных за переход клетки в дифференцированную форму. Таким образом, исследователь может предположить, предшественником какого типа является исследуемая группа клеток.

Ручное типирование клеток также может осуществляться на основании результатов вывода траектории развития. В большинстве случаев при выводе данной модальности кластеры с отсутствием специфических маркеров находятся между кластерами с наличием таковых. В таком случае можно предположить, что данный кластер является промежуточным и содержит клетки в переходном состоянии между исходной и конечной формами.

ТРАЕКТОРИИ РАЗВИТИЯ И СКОРОСТЬ РНК

Любой вид секвенирования является снимком момента жизни клетки, предоставляющим информацию об интересующей модальности на момент проведения исследования. Библиотека scRNA-seq содержит информацию о транскрипционном профиле нескольких сотен и тысяч клеток, гетерогенность которых в том числе обусловлена динамическим процессом клеточного развития. Методы вывода траекторий развития, также называемые анализом псевдовремени, позволяют упорядочивать клетки исследуемого образца вдоль смоделированной временной траектории на основе сходства их паттернов экспрессии. Результатом построения траектории развития в псевдовремени является графическое изображение всех клеток образца, расположенных друг за другом, начиная с начальной/исходной клетки (root cell) и до конечной или дифференцированной клетки (end cell). С помощью вывода траекторий развития становится возможным изучение интересующего биологического явления, например, путей дифференцировки, клеточного цикла или иммунных реакций, в динамическом контексте.

Впервые для построения траекторий развития был предложен R-пакет Monocle. Monocle сначала использует тест дифференциальной экспрессии для уменьшения количества генов, а затем применяет анализ независимых компонентов для дополнительного уменьшения размерности. Для построения траектории Monocle вычисляет минимальное остовное дерево, а затем находит самый длинный соединённый путь в этом дереве. Ячейки проецируются на ближайшую к ним точку на этом пути [72]. После Monocle было предложено ещё более 50 различных методов, самыми известными из которых стали TSCAN [73] и Slingshot [74]. Методы отличаются друг от друга по многим параметрам: указание начальных и конечных клеток; тип визуализации графа (прямой, линейное псевдовремя, циклическое псевдовремя, вероятность конечного состояния, кластерная оценка, ортогональная проекция и клеточный граф); тип траектории (несвязный и связный граф, циклический и ациклический граф, древовидный граф) [75]. На сегодняшний день методов стало настолько много, что появилась необходимость создания единой платформы, где можно анализировать свои данные с помощью сразу нескольких методов. Одной из таких платформ является *dynverse*, объединившая в себе 45 методов построения траекторий развития.

Чтобы улучшить качество выводимых траекторий, в некоторых методах вместо подсчёта экспрессии генов или в дополнение к ним используются дополнительные источники информации, наиболее популярным из которых на сегодняшний день является скорость РНК (RNA velocity) [71]. Идея RNA velocity возникла при изучении данных scRNA-seq, полученных на различных платформах (Smart-seq2, STRT/C1, inDrop и 10x Genomics Chromium). Оказалось, что от 15 до 25% прочтений содержат несплайсированные интронные последовательности, что объясняется наличием поли(А)-участков не только в поли(А)-хвосте, но и в поли(А)-вставке [76]. В связи с таким наблюдением было предложено при анализе данных учитывать как сплайсированные, так и несплайсированные формы мРНК. Под скоростью в данном случае понимается производная по времени от стадии экспрессии гена. Весь процессинг был поделен на три стадии: транскрипция, сплайсинг и деградация. Экспрессия гена констатируется в случае преобладания транскрипции и сплайсинга над деградацией и ингибируется, если деградация преобладает над транскрипцией и сплайсингом. Значение скорости определяет направление вектора каж-

дой клетки в пространстве со сниженной размерностью, так формируется векторное поле, в котором можно видеть направление развития клеток в образце. Учитывая то, что векторное поле накладывается на заранее полученные кластеры клеток, можно предполагать направление дифференцировки или восприятия клетками фактора воздействия.

МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ

Развитие, функционирование, регенерация и гомеостаз тканей и органов обеспечиваются путём межклеточной коммуникации, или межклеточного сигналинга — процесса, происходящего за счёт лиганд-рецепторного взаимодействия различных клеток. В роли лигандов могут выступать цитокины, хемокины, гормоны, факторы роста и нейромедиаторы.

Межклеточный сигналинг принято делить на аутокринный (выделяемый клеткой лиганд взаимодействует с рецептором той же клетки), паракринный (выделяемый клеткой лиганд взаимодействует с рецепторами клеток из той же ткани) и эндокринный (выделяемый клеткой лиганд взаимодействует с рецепторами клеток из других тканей или органов). Отдельно можно выделить межклеточные взаимодействия, то есть физический контакт двух клеток друг с другом. Межклеточные взаимодействия могут быть как участниками межклеточной коммуникации (при так называемом межклеточном распознавании), так и выполнять исключительно структурную функцию.

Изучение межклеточной коммуникации помогает понять механизмы дифференцировки и морфогенеза клеток, этиологию заболеваний [77] и особенности формирования иммунного ответа [78]. Понимание межклеточного сигналинга позволяет разрабатывать новые терапевтические стратегии [79] и прогнозировать течение различных заболеваний [80, 81].

Исследования межклеточного сигналинга берут своё начало с определения белок-белковых взаимодействий при помощи двугибридных систем, коиммунопреципитации и иных методов [82]. С их помощью накоплен целый пласт экспериментально подтверждённых лиганд-рецепторных взаимодействий, который, однако, был получен лишь для конкретных типов клеток в конкретных тканях. ScRNA-seq позволяет оценивать уровни экспрессии генов лигандов и рецепторов в тысячах клеток за один эксперимент и не только изучать клеточный состав ткани, но и на системном

уровне оценивать возможные паракринные и аутокринные регуляции.

Анализ межклеточного сигналинга по данным scRNA-seq ставит перед собой задачу понять, коммуницирует ли определённая пара типов клеток A-B по определённому каналу лиганд-рецептор l-r. Простые методы, такие как iTalk [83] и CellTalker, решают эту задачу следующим образом: если ген лиганда l дифференциально активирован в типе клеток A, а ген рецептора r дифференциально активирован в типе клеток B, то такие клетки считаются взаимодействующими. Эти методы интуитивно понятны и легко интерпретируемы, однако они нечувствительны к коммуникациям, которые характерны для большого числа типов клеток ткани.

В более сложных методах вводится понятие силы, или активности коммуникации S, которую оценивают как функцию от средних экспрессий l в A (lA) и r в B (rB) — от их суммы (метод CellPhoneDB [84]) либо от их произведения (SingleCellSignalR [85]). Алгоритм CellCall [86] для оценки активности коммуникации между клетками A и B дополнительно использует информацию об экспрессии регулона *RegB* (набор генов-мишеней транскрипционного фактора, которые коэкспрессируются вместе с транскрипционным фактором), находящегося под регуляцией транскрипционного фактора, который активируется при воздействии на клетку через рецептор r. Отдельно стоит упомянуть случаи, когда рецептор состоит из нескольких субъединиц, кодируемых разными генами. В таком случае за r будет взята либо минимальная экспрессия среди всех субъединиц рецептора (CellPhoneDB), либо их среднее геометрическое (CellCall).

Однако не все клетки, коэкспрессирующие пару лиганд-рецептор, коммуницируют в реальности. Одним из способов преодоления ложноположительных результатов является пермутационный тест (реализован в CellPhoneDB), в ходе которого метки клеточных типов множество раз случайно перемешиваются, а сила коммуникации S считается заново, задавая нулевое распределение, по которому будет рассчитываться p-значение для исходного S. Минус такого подхода схож с минусами подходов, основанных на дифференциальной экспрессии: широко распространённые в исследуемом наборе данных коммуникации могут оказаться статистически незначимыми. Иное решение этой проблемы реализовано в SingleCellSignalR: авторы этого алгоритма предлагают считать значимыми

все коммуникации с силой выше некоторого установленного ими порогового значения. Другой алгоритм CellCall предполагает, что коммуникация значима, если ожидаемая доля ложных отклонений анализа обогащения набора генов (FDR GSEA) регулона *RegB* меньше 0,05.

Особо следует выделить алгоритм scTensor [87], в котором сначала из данных формируется тензор третьего ранга размерности $A \times A \times L$, где A — количество типов клеток, L — количество исследуемых пар лиганд-рецептор, а (a, b, l)-й элемент этого тензора — сила коммуникации клеток A и B при помощи пары лиганд-рецептор l-r. Т.е. тензор состоит из всех попарных сил коммуникации всеми возможными парами лиганд-рецептор. Сила коммуникации в данном методе рассчитывается как простое произведение lA и rB. Сконструированный тензор преобразуется в произведение трёх матриц и нового тензора при помощи неотрицательного разложения Таккера. В результате информация о межклеточном сигналинге описывается сразу для всего набора данных, и это позволяет увидеть более комплексные эффекты, в частности, включающие в себя целые коммуникационные сети. Несмотря на свои достоинства, этот метод не пользуется большой популярностью в первую очередь из-за сложности интерпретации результатов.

Описанные выше подходы к определению межклеточного сигналинга принципиально отличаются в первую очередь гипотезами, которые они тестируют. CellTalker, iTalk и CellPhoneDB позволяют определить сигналинги, уникальные для некоторых типов клеток в исследуемом наборе данных. SingleCellSignalR, CellCall и scTensor позволяют детектировать большее число коммуникаций, в том числе и неспецифичных, однако могут оказаться нечувствительными в случаях, когда сила коммуникации низкая [88]. Кроме того, все перечисленные выше методы говорят только о возможных путях сигналинга, которые необходимо в дальнейшем валидировать экспериментально, и результат работы данных инструментов сильно зависит от базы лиганд-рецепторных взаимодействий. Более значимое подтверждение коммуникации между различными клетками можно получить при помощи бурно развивающихся методов пространственной транскриптомики [89], которые, по всей видимости, позволят точно ответить на множество вопросов о том, каким образом формируется и поддерживается архитектура различных тканей.

ГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СЕТИ

Регуляция экспрессии генов внутри клетки осуществляется за счёт сложного сочетания процессов синтеза и сплайсинга РНК, а также деградации уже зрелой мРНК. В основном уровень экспрессии генов тесно связан с активностью транскрипции мРНК. Транскрипция, в свою очередь, регулируется за счёт воздействия на клетки различного рода сигналов. Например, гормоны, воздействуя на специфические рецепторы, запускают сигнальные каскады, локализующиеся в основном в цитоплазме клетки. Сигнальные каскады запускают транскрипционные факторы, которые взаимодействуют с сайтами связывания на генах-мишенях. Эти взаимодействия осуществляются в ядре клетки и называются генными регуляторными сетями (gene regulatory networks). Именно генные регуляторные сети осуществляют поддержание клеточного гомеостаза, формирование клеточной гетерогенности, а их нарушение может приводить к развитию различных патологических состояний и утяжелять течение заболеваний [90, 91]. Изучение генных регуляторных сетей улучшает понимание механизмов различных биологических процессов в живых организмах и позволяет разрабатывать новые терапевтические стратегии для борьбы с заболеваниями.

Построение генных регуляторных сетей из данных scRNA-seq может осуществляться на основании регрессионных моделей, корегуляторных взаимодействий и вывода траектории развития.

Подходы на основе регрессии работают с конкретными списками генов и позволяют оценивать связь между регуляторами и генами-мишенями, а также делают вывод об интенсивности этого взаимодействия. Первоначально для построения генных регуляторных сетей на основе регрессии был разработан метод GENIE3 [92]. Этот метод широко используется для построения генных сетей из данных bulk RNA-seq и scRNA-seq. Однако применение GENIE3 невозможно в случаях scRNA-seq, когда количество исследуемых клеток исчисляется тысячами. Данная проблема была успешно решена с помощью градиентного бустинга в методе GRNBoost2 [93]. Тем не менее значительным недостатком анализа регуляторных сетей, выведенных из регрессионного анализа отдельных клеток, является большее количество ложноположительных связей по сравнению с анализом bulk RNA-seq. Использование инструмента SCENIC [94] позволяет преодолеть данный недостаток за счёт отбора

связей между регуляторами и генами-мишенями, в которых гены-мишени имеют предполагаемый сайт связывания с соответствующими транскрипционными факторами. При этом транскрипционный фактор вместе с активируемыми генами-мишенями называют регулоном (regulon).

Построение генных сетей, основанных на корегуляторных взаимодействиях, подразумевает подсчёт корреляции экспрессии генов в единичных клетках с помощью коэффициента Пирсона и рангового коэффициента Спирмена и реализуется посредством анализа взвешенных сетей коэкспрессии генов (WGCNA) [95]. Коэкспрессионные модули соотносятся с функциями генов с помощью метода GSEA [96] и баз данных, таких как STRING [97] и HumanNet [98]. Применение WGCNA на данных scRNA-seq позволяет идентифицировать функциональные модули и составляющие их ключевые гены для каждого типа клеток, которые могут быть связаны с конкретным физиологическим или патофизиологическим состоянием [99]. Ключевые гены имеют наибольшее количество корреляционных связей в плане коэкспрессии и в большей степени определяют функциональную принадлежность модулей. Выявление таких генов позволяет обнаруживать, например, факторы, связанные с устойчивостью к химиотерапии [100], или прогностические маркеры [101].

Анализ траекторий развития позволяет рассмотреть данные секвенирования единичных клеток как динамическую систему, что даёт возможность выйти за пределы статической природы транскриптома и получить псевдовремя для последующего построения генных сетей с помощью метода обычных дифференциальных уравнений. Такие сети отражают генные взаимодействия в динамике, т.е. изменение экспрессии генов в течение непрерывного псевдовремени характеризуется функцией, которая включает активирующее или подавляющее влияние других генов в качестве переменных [102]. Данный подход наиболее точно описывает генные взаимодействия в непрерывных процессах, таких как дифференцировка, и реализован в инструменте SCODE [103].

АНАЛИЗ CNV

CNV вносят важный вклад в генетическую изменчивость живых организмов и определяют предрасположенность к различным заболеваниям. К основным критериям определения структурного варианта как CNV относят

повторяемость, числовую изменчивость и «значительную» длину. Несмотря на заданные критерии, границы между типами структурных вариантов формируются по-разному в различных работах, поэтому некоторые CNV соответствуют одновременно нескольким категориям [104]. В настоящее время многие исследователи определяют CNV как несбалансированные хромосомные перестройки — делеции и вставки участков ДНК, размеры которых варьируют от нескольких килобаз до целых хромосом и могут включать мобильные элементы и некодирующие последовательности [105]. Соответственно, в зависимости от размера CNV могут быть фокальными и полнохромосомными. Последние генерируются анеуплоидными клетками с аномальным числом хромосом и ведут к изменению уровня транскрипции большого количества генов. CNV могут быть представлены как нейтральными, так и патогенными формами. Патогенность определяется прямым влиянием CNV на экспрессию генов и/или образованием новых белковых продуктов [106].

Классическими методами для идентификации CNV являются микроматричная сравнительная геномная гибридизация (aCGH), мультиплексная амплификация лигированных зондов (MLPA) и секвенирование следующего поколения (NGS), главным образом полногеномное секвенирование (WGS). Однако aCGH и MLPA ограничены разрешением чипа (связанным с охватом и плотностью флуоресцентных зондов) и неспособны детектировать копий-нейтральные потери гетерозиготности. Стоимость, продолжительность обработки данных и высокие вычислительные требования усложняют проведение анализа CNV с помощью WGS [107].

Существует лишь небольшое количество методов, созданных для идентификации CNV по данным scRNA-seq. Все эти методы основаны на предположении, что дифференциальная экспрессия генов коррелирует с CNV [108]. Метод inferCNV основан на усреднении уровня экспрессии генов и сравнении профиля CNV изучаемого образца с эталонным. Несмотря на то что такой метод с высокой точностью выявляет клональные изменения на уровне плеч хромосом, inferCNV с трудом удается идентифицировать субклональные изменения. Результаты, получаемые с помощью inferCNV, также высокочувствительны к выбору эталонных клеток. Ввиду этого необходима независимая нормализация различных клеточных типов с помощью соответствующих эталонных клеток [109]. На конечные результаты оказывает влияние и отсутствие данных

об относительной нормализованной мере соотношения измеренных интенсивностей двух аллелей (BAF), что приводит к повышенному количеству ложноположительных результатов.

В других инструментах для анализа CNV реализован подход объединения генетической и транскрипционной информации. Например, метод HoneyBADGER [109], использующий байесовский подход с интегрированной скрытой марковской моделью, рассчитывает отклонение доли аллелей гетерозиготных вариантов от ожидаемой и определяет регионы CNV. Для защиты от ложноположительных результатов для предсказанных регионов оценивается апостериорная вероятность принадлежности области CNV заданному состоянию. При использовании HoneyBADGER необходимо предварительно определять SNV, так как инструмент подтверждает наличие CNV в регионах-кандидатах на основании моноаллельного характера экспрессии SNV в данных регионах. Другой метод, CaSpER [110], использует многомасштабную декомпозицию для сглаживания сигналов экспрессии и аллельного сдвига (allelic shift), благодаря чему большая часть шума удаляется. Ввиду того, что данный инструмент генерирует профиль сигнала аллельного сдвига из выровненных прочтений, определение SNV не требуется. Однако поскольку сигнал сдвига частоты альтернативного аллеля вычисляется путём объединения всех прочтений, клетки, имеющие большое количество прочтений, могут доминировать в сигнале сдвига и быть основным фактором искажения результата. Перечисленные методы были разработаны для анализа полноразмерных транскриптов, однако были валидированы для данных секвенирования одноконцевых транскриптов [109, 110]. Для последнего был разработан инструмент CоруKAT [111] с интегративным байесовским подходом и иерархической кластеризацией. Данный метод в большей степени подходит для анализа опухолевых клеток, которые часто являются анеуплоидными. Так, данный метод показал свою эффективность в идентификации опухолевых и гибридных клеток среди циркулирующих эпителиальных клеток у больных раком молочной железы [112].

В то время как инструменты по поиску CNV, используемые при WGS, основаны на равномерном покрытии генома прочтениями, при scRNA-seq сигнал концентрируется только на экзонных участках. В этом плане рекомендуется проведение анализа аллельного дисбаланса для понимания корреляции между геномом и транскриптомом. Однако отличие

настоящих генетических вариантов от технических артефактов достаточно осложнено из-за выпадения аллелей, неоднородности и низких показателей глубины секвенирования [113]. Таким образом, на данный момент анализ ploidy ДНК и идентификация анеуплоидии в scRNA-seq даёт более корректные результаты, чем нахождение фокальных CNV.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН

Как и CNV, однонуклеотидные варианты составляют генетическую изменчивость живых организмов, влияют на протекание биологических процессов и могут выступать в роли генетических факторов предрасположенности к заболеваниям. Идентификация SNV возможна посредством использования различных молекулярно-генетических методов, основными из которых являются полимеразная цепная реакция, микроматричный анализ, секвенирование по Сэнгеру и NGS. Для обнаружения SNV на уровне отдельных клеток классическим методом является секвенирование ДНК. Наиболее информативным и концептуально верным для этой цели является scDNA-seq, реализованный в платформе Tapestry (Mission Bio). Однако анализ SNV также возможно проводить на основе данных scRNA-seq, тем самым получая одновременно информацию и об экспрессии генов. Основным ограничением является анализ SNV только в белок-кодирующих участках (экзонах), поскольку в качестве исходного материала для scRNA-seq чаще всего выступает матричная РНК. Более того, различные паттерны экспрессии генов и альтернативный сплайсинг существенно ограничивают доступную для анализа белок-кодирующую область генома. Другим важным моментом является то, что при анализе экспрессии генов чаще всего применяется короткое одноконцовое секвенирование с 5'- или 3'-конца, что опять же исключает из анализа значительную часть финальной библиотеки. Эта проблема наиболее остро возникает в случае с 3'-секвенированием, где прочтение затрагивает только небольшой участок с поли(А)-хвоста мРНК, и большая часть экзонных последовательностей, наиболее интересных для SNV-анализа, теряется. В случае 5'-секвенирования при достаточной экспрессии интересующего участка экзона проблема частично решается, если в процессе пробоподготовки происходит случайная фрагментация захваченной за

поли(А)-хвост мРНК и конверсия образовавшихся фрагментов в цепь кДНК, на основе которых и будет происходить подготовка библиотеки. Другим ограничением при SNV-анализе данных scRNA-seq может быть выпадение одного исследуемого аллеля (allelic dropout), в частности, при использовании технологии масляных капель для изоляции отдельных клеток перед баркодированием и амплификацией целевых молекул, что затрудняет идентификацию гетерозиготных субпопуляций клеток. Таким образом, при планировании исследования SNV на основе данных scRNA-seq необходимо учитывать указанные ограничения и по возможности использовать двуконцовое прочтение при секвенировании с последующей верификацией находок классическими молекулярно-генетическими методами.

Идентификация SNV на основе scRNA-seq в большинстве своём осуществляется методами, разработанными для анализа данных секвенирования ДНК: SAMtools, GATK, CTAT, FreeBayes, MuTect2, Strelka2, VarScan2 и др. Общая схема работы данных алгоритмов заключается в четырёх последующих операциях: картирование на референсный геном, предобработка, идентификация вариантов и фильтр ложноположительных вариантов. Для картирования чаще всего используют алгоритм STAR, рекомендованный GATK Best Practices [114]. Для анализа данных scRNA-seq может дополнительно использоваться инструмент GSNAP, позволяющий работать с короткими и сложнокартируемыми последовательностями [115]. Предобработка предназначена для удаления дубликатов, повторного выравнивания и базовой оценки качества прочтений. Выявление генетических вариантов проводится на основе расхождения нуклеотидных последовательностей с референсом и удаления вариантов с низким качеством или недостаточным покрытием. Хотя MuTect2, Strelka2 и VarScan2 применяются в основном для секвенирования ДНК, а также и bulk RNA-seq, выявленные с помощью данных алгоритмов варианты могут быть соотнесены с кластерами единичных клеток на основе других инструментов, например, VarTrix, с целью вывода связи генотип-фенотип. Стоит отметить, что большинство описанных алгоритмов, за исключением SAMtools [116], в той или иной степени работают на основе GATK. Более детальное сравнение описанных пайплайнов представлено в обзоре Liu et al. [117]. Что касается SAMtools, то в литературе имеется сообщение о применении инструмента Pysam, функционирующего на основе SAMtools, для

детекции вариантов в митохондриальной ДНК методом scRNA-seq [118].

При использовании разных платформ для подготовки библиотек при scRNA-seq необходимо учитывать их разную «пропускную способность», то есть количество клеток, которое можно проанализировать за один запуск и, как следствие, число прочтений на одну клетку. Так, например, для Fluidigm C1 (1000 клеток за запуск) значение глубины секвенирования может достигать 1 миллиона ридов на клетку, а для 10x Genomics Chromium (до 10 000 клеток за запуск) глубина секвенирования в реальной практике редко превышает 10–20 тысяч. Это приводит к тому, что существует вероятность не обнаружить варианты со слабой экспрессией и субклональные SNV. Дальнейшее увеличение количества прочтений может быть малоэффективным в случае малой «сложности» библиотеки и большой скорости «насыщения» секвенирования (sequencing saturation rate). В частности, это связано с тем, что подавляющее число ридов будет картироваться на ограниченную группу сильно представленных транскриптов, а детекция слабо экспрессирующихся генов и вариантов в них потребует сильного увеличения глубины прочтения. Такая ситуация, например, описана для 10x Genomics scRNA-seq мононуклеаров периферической крови, где показатель «насыщения» секвенирования составлял более 90%. Повысить вероятность детекции SNV в таких случаях можно путём анализа дубликатов ПЦР, образующихся в результате многократной амплификации малого числа исходных молекул. В стандартных биоинформатических алгоритмах такие дубликаты удаляются из последующего анализа как источник ложноположительных вариантов. Однако в статье Wilson et al. описан пайплайн scSNV, позволяющий анализировать подобные дубликаты с низким процентом ложноположительных SNV [119]. Суть метода заключается в «слиянии» дублирующих прочтений в длинные молекулы после выравнивания на референс и последующий анализ. При этом риды с низкой «сложностью» и артефакты из неправильно картированных прочтений, являющихся основным источником ложноположительных вариантов, удаляются.

ФИЛОГЕНЕТИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Одним из основных признаков онкологических заболеваний является геномная неста-

бильность [120]. Генетические нарушения, в частности однонуклеотидные замены и аберрации числа копий ДНК, являются драйверами клональной эволюции опухолевых клеток, приводя к формированию клонов и субклонов, устойчивых к противоопухолевому лечению и обладающих высоким потенциалом к метастазированию и рецидивированию. Исследование клонального состава опухолей, особенно в динамике терапии, позволяет не только понять механизмы появления и прогрессирования злокачественных новообразований, но и разработать эффективные методы лечения, в том числе адаптированные под конкретного пациента.

Как правило, для изучения генетической гетерогенности и клональной эволюции опухолей используют bulk DNA-seq. Однако при смешивании ДНК нескольких тысяч или миллионов клеток информация о редких событиях зачастую теряется. Использование scDNA-seq в полной степени способно решить проблему поиска редких вариантов и анализа клональной структуры опухолей из-за баркодирования каждой клетки. Однако на сегодняшний день применение данного метода в значительной степени ограничено. Единственная коммерчески доступная технология scDNA-seq Tapestry позволяет судить лишь о структуре заранее выбранной пользователем или предоставленной производителем панели генов. Подходы, основанные на полногеномной амплификации, страдают от ряда проблем, в числе которых недостаточный процент охвата генома либо систематическая ошибка амплификации, которая может привести к высокой зашумлённости данных [121]. В связи с этим особо привлекательной задачей становится анализ клональной эволюции на основе данных scRNA-seq ввиду возможности совместной оценки генетической и транскрипционной гетерогенности. Однако такой подход для построения филогении опухолей осложнён рядом ограничений, в частности, невозможностью поиска генетических вариантов в нетранскрибируемых регионах, наличием аллель-специфичной экспрессии, низкими показателями глубины scRNA-seq и высоким уровнем шума в полученных данных [117, 122, 123]. В связи с этим биоинформатический анализ данных scRNA-seq для понимания клональной архитектуры опухолей является вызовом и пока реализован только в некоторых инструментах: DENDRO, Cardelino, Trisicell и SASC.

DENDRO позволяет учитывать транскрипционные всплески (transcriptional bursting), выпадение SNV и ошибки секвенирования [124].

С использованием DENDRO была оценена мутационная нагрузка, определены неоантигены для каждого опухолевого субклона и выявлена связь между транскриптомными изменениями и генетической дивергенцией опухолевых клеток [124].

Байесовский метод Cardelino позволяет интегрировать информацию о филогении, построенной на основе bulk или scDNA-seq с данными об аллельных вариантах, полученных с помощью scRNA-seq [125]. Данный подход учитывает стохастические выпадения SNV в транскриптомных данных и систематический аллельный дисбаланс ввиду моноаллельного характера экспрессии или влияния регуляторных факторов. Кроме того, Cardelino может работать только на данных scRNA-seq, предоставляя информацию о субклональной иерархии опухолевых клеток.

Большинство инструментов для вывода филогении основаны на предположении о бесконечных участках (infinite sites assumption), согласно которому каждая мутация возникает не более одного раза и не элиминируется в процессе филогенеза. Использование такой теории значительно упрощает вычислительный процесс и приемлемо для построения филогении нормальных клеток, но не злокачественных, ввиду высокой скорости накопления мутаций, а также их элиминации за счёт возникновения CNV. Авторы инструмента для анализа внутриопухолевой прогрессии SASC отходят от модели совершенной филогении и используют филогенетическую Dollo-k, допускающую элиминацию мутаций на протяжении филогенеза [126]. Использование данной модели приближает выводимое *in silico* филогенетическое древо к реальному. Кроме того, инструмент учитывает различия в частоте ложноотрицательных результатов для каждой мутации ввиду разницы в уровне экспрессии генов.

Для уточнения результатов, повышения производительной мощности существующих инструментов вывода филогении, а также сравнения древ, полученных с помощью различных инструментов и/или из различных наборов данных, был разработан инструмент Trisicell [127]. Trisicell состоит из трёх вычислительных методов: Trisicell-Boost, Trisicell-PartF и Trisicell-Cons. Trisicell-Boost увеличивает производительность и точность других инструментов за счёт многократного отбора случайных подмножеств мутаций, для каждого из которых строится филогенетическое мутационное древо. После этого Trisicell-Boost проводит сравнение различных деревьев для одного образца и осуществляет построение результирующего дерева на основе механизма консенсуса. Затем

Trisicell-PartF вычисляет вероятность содержания каждого узла консенсусного древа в исследуемых клетках. Trisicell-Cons, в свою очередь, предназначен для вывода консенсусных филогенетических древ, полученных с помощью различных инструментов и/или из данных scDNA и scRNA-seq. Trisicell-Cons минимизирует количество ветвей двух или более древ, выводя более достоверную историю прогрессирования опухоли.

Стоит отметить, что перечисленные выше инструменты в большей степени применимы для обработки данных секвенирования полноразмерных транскриптов (например, Smart-seq, NuGen Solo и др.), обеспечивающего наиболее равномерное покрытие и относительно низкий уровень шума [128]. Анализ данных секвенирования одноконцевых транскриптов (10x Genomics Chromium, BD Rhapsody и др.) ввиду низкой глубины секвенирования может приводить к ошибкам в идентификации генетических вариантов и, как следствие, построению некорректных филогенетических деревьев. В этом плане секвенирование одноконцевых транскриптов целесообразно комбинировать с bulk DNA-seq или scDNA-seq и проводить совместный биоинформатический анализ, например, с помощью Cardelino или Trisicell.

ЭПИГЕНОМИКА: ДОСТУПНОСТЬ ХРОМАТИНА, ИДЕНТИФИКАЦИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

Пространственно-временная динамика экспрессии генов обусловлена работой различных транскрипционных факторов и регулируется со стороны разного рода эпигенетических механизмов. Доступность и транскрипционная активность хроматина на регуляторных элементах генома является одним из ключевых факторов регуляции экспрессии генов. Регуляторные элементы, в частности промоторы и энхансеры, представляют собой последовательности ДНК (от нескольких сотен до тысяч пар оснований), которые состоят из уникальных сайтов связывания для транскрипционных факторов [129]. Сравнительный анализ мотивов связывания на регуляторных элементах в сочетании с информацией об экспрессии транскрипционных факторов даёт возможность пролить свет на механизмы клеточных процессов и причины возникновения различных заболеваний.

Клеточно-специфичная активность промоторов обычно определяется энхансерами. В многоклеточном организме энхансеры в первую очередь ответственны за точный контроль экспрессии генов [130]. Таким образом, изменение экспрессии одного и того же гена в разных типах клеток или в одном и том же типе клеток в разных состояниях может быть объяснено изменениями в этих цис-регуляторных элементах [131].

В последнее время общепринятым подходом для определения открытых участков ДНК стал анализ доступности хроматина для транспозазы с последующим секвенированием (ATAC-seq). Данный подход получил особую популярность из-за относительно простой экспериментальной процедуры, а также небольшого количества исходного материала — от единичных клеток до нескольких сотен [132]. Однако без информации о транскрипционных факторах, которые связывают тот или иной открытый участок хроматина, а также характерного профиля пост-трансляционных модификаций гистонов, фланкирующих доступную ДНК нуклеосом, анализ только доступности хроматина не является достаточным для определения типа регуляторного элемента. Метод иммунопреципитации хроматина (ChIP-seq) с использованием антител к транскрипционным факторам или специфичным пост-трансляционным модификациям гистонов позволил картировать расположение различных регуляторных элементов в активном и репрессированном состоянии [131]. Не так давно был разработан метод single-cell CUT&TAG для изучения полногеномного распределения различных гистоновых модификаций на уровне единичных клеток [133]. Эффективное картирование регуляторных элементов генома достигается за счёт совместного применения вышеуказанных методик. Однако это накладывает серьёзные ограничения, связанные со стоимостью, а также с потребностью в большом количестве биологического материала, так как данные методы нельзя выполнять в одних и тех же клетках одновременно. Помимо этого, данные scATAC-seq и single-cell CUT&TAG по своей природе дискретны, поскольку каждый геномный локус имеет только две копии хроматина, которые можно проанализировать внутри клетки. Данные, полученные с помощью этих методов, немногочисленны (~10⁴ прочтений на клетку) и, таким образом, имеют узкий динамический диапазон. Это отличает их от данных scRNA-seq, которые являются более непрерывными, поскольку ген может иметь несколько поддающихся анализу транскриптов в клетке.

Ещё одним свойством функционально активных промоторов и энхансеров является транскрипция. С промоторов транскрибируется РНК соответствующего им гена, а с энхансеров — энхансерная РНК (эРНК). Изучение активности регуляторных элементов показало, что эРНК транскрибируется в ходе контакта энхансера с промотором-мишенью, коррелирует с гистоновыми модификациями активных энхансеров и ассоциирована с активацией транскрипции [129].

Большое количество накопленных к настоящему времени данных RNA-seq и ATAC-seq позволило выявить корреляцию между профилем доступности хроматина и транскрипцией. Современные методы анализа данных позволяют использовать модели машинного обучения с целью предсказания ландшафта хроматина на основе данных RNA-seq. Основанный на регрессионных моделях инструмент BIRD (Big data Regression for predicting DNase I hypersensitivity) использует данные RNA-seq для предсказания открытых участков хроматина. Изначально разработанный для метода DNase-seq в качестве тренировочного набора, он был успешно применён и с использованием данных ATAC-seq. BIRD применим для предсказания открытого хроматина как в данных bulk RNA-seq, так и в scRNA-seq [134]. Полученные результаты можно использовать для анализа обогащения мотивов связывания специфичных транскрипционных факторов на промоторах ДЭГ с помощью широко применяемого набора инструментов MEME, основанных на скрытых марковских моделях [135] и разработанных для пакета ChromVAR в среде R [136]. Однако данный подход неприменим для аналогичного анализа на энхансерах, которыми являются далеко не все дистальные от гена открытые участки хроматина. Один из последних инструментов, разработанных для анализа регуляторных элементов на основе данных scRNA-seq, SCAFE (Single Cell Analysis of Five-prime Ends), позволяет решить эту проблему. В своей основе он использует факт транскрипции с активных регуляторных элементов. Использование 5'-концевого scRNA-seq позволяет идентифицировать сайты старта транскрипции (TSS) как с промоторов (для оценки транскрипции гена), так и с энхансеров (для оценки транскрипции эРНК). Для поиска транскрибирующихся цис-регуляторных элементов SCAFE, как и ранее описанный метод BIRD, использует пакет референсного генома, который содержит информацию о существующих открытых участках хроматина для соответствующего вида, полученных

с помощью ATAC-seq. Идентифицировав TSS, данный инструмент позволяет получить набор активных регуляторных элементов. Помимо анализа мотивов связывания транскрипционных факторов, SCAFE позволяет оценивать изменения динамики транскрипции активных регуляторных элементов в разных состояниях и выявлять котранскрибирующиеся энхансеры и промоторы для предсказания их физического взаимодействия [137]. Такой анализ можно проводить, используя R-пакет Cicero, разработанный для предсказания взаимодействий между цис-регуляторной ДНК на основе данных доступности хроматина [138].

Используя один тип экспериментальных данных, стало возможным получать информацию о природе ДЭГ, оценивая активность регуляторных элементов всех интересующих генов. Серьёзным ограничением является необходимость наличия данных ATAC-seq как части тренировочного набора при обучении модели, что сильно затрудняет использование BIRD и SCAFE при работе с немодельными организмами. В отличие от классических экспериментальных подходов, информация о доступных участках хроматина на основе scRNA-seq формируется только за счёт генов, чьи транскрипты удалось проанализировать. Поэтому невозможно составить полноценной эпигеномной картины для каждой клетки. Однако полученных данных достаточно, чтобы оценить различия между разными клетками в исследуемом образце. Дальнейшее развитие экспериментальных методик для увеличения глубины секвенирования каждой отдельной клетки, а также усовершенствование вычислительных подходов повысит эффективность предсказания динамики доступности хроматина и активности регуляторных элементов на основе данных scRNA-seq.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ТРАНСКРИПТОМИКИ

Пространственное расположение клеток в пределах тканей и органов тесно взаимосвязано с их биологическими функциями. Хотя все клетки имеют один и тот же геном, их морфология и паттерны экспрессии генов сильно различаются в зависимости от принадлежности к типу тканей и месторасположению. Такая клеточная гетерогенность связана как с регуляторными механизмами внутри клеток, так и с влиянием внеклеточного микроокружения. Последнее наиболее ярко выражено

при различных злокачественных новообразованиях, где клетки опухолевого микроокружения вносят вклад в клиническое течение и ответ на противоопухолевую терапию [139–141].

ScRNA-seq позволяет определять клеточный состав исследуемых образцов, транскрипционные особенности клеток, траектории их дифференцировки и другие показатели, рассмотренные выше. Однако пространственное расположение клеток в структуре тканей оказывается утерянным ввиду диссоциации образцов во время подготовки кДНК-библиотек и может быть предсказано лишь приблизительно. Алгоритм реконструкции пространственной организации novoSpaRc основан на теории схожести транскрипционного профиля клеток, расположенных в физической близости друг от друга [142], т.е. соседние клетки демонстрируют большее сходство в транскрипционном профиле, чем клетки, находящиеся далеко друг от друга. Однако при реконструкции пространственной организации novoSpaRc использует предопределённую геометрическую форму в качестве эталона, и, таким образом, все расчёты строятся на геометрических особенностях выбранного пространства. Кроме того, экспрессионная схожесть клеток действительно может быть следствием их близости друг к другу, но никак не предопределять её. Другой инструмент, CSOmap, предсказывает координаты каждой клетки в трёхмерном псевдо-пространстве, не ограниченном заданной формой [143]. CSOmap построен на предположении, что пространственное расположение клеток связано с их взаимодействиями по типу лиганд-рецептор. В частности, данный инструмент комбинирует профили экспрессии генов единичных клеток и общедоступную информацию о лиганд-рецепторных взаимодействиях [144, 145] для создания матрицы аффинности, которая переводится в трёхмерное пространство. Такой подход позволяет не только реконструировать пространственную организацию *de novo*, но и оценивать статистическую значимость межклеточных взаимодействий и вклад отдельных пар лиганд-рецептор в формирование таких коммуникаций. К недостаткам данного инструмента можно отнести вариабельность конечных результатов: общедоступная информация о лиганд-рецепторных взаимодействиях может различаться среди доступных источников, тем самым влияя на выводимые данные.

Иммуногистохимическое окрашивание, различные варианты гибридизации *in situ* и экспрессионное профилирование, совмещённое с

лазерной микродиссекцией, не являются идеальными методами для изучения пространственной транскриптомики. Для первых характерна большая площадь захвата, но малый охват транскриптов. Для третьего, наоборот, свойствен большой спектр анализируемых генов, но низкая исследуемая область. В последние годы разработаны различные экспериментальные методы, позволяющие проводить анализ большого количества транскриптов на больших участках ткани [146]. Коммерчески доступными являются Visium («10x Genomics»), GeoMx «NanoString Technologies», Molecular Cartography от «Resolve Biosciences», Stereo-seq от «BGI STOmics» и другие методы пространственной транскриптомики. Однако в данный момент Visium и GeoMx не способны предоставить разрешение на уровне единичной клетки. Размер ячейки с пространственным штрих-кодом на слайде Visium составляет 55 мкм, что создаёт вероятность попадания в одну ячейку нескольких клеток. Технически GeoMx способен проводить захват на уровне единичной клетки, однако высокое отношение шум/сигнал ограничивает эту возможность. Кроме того, применение данных методов ограничивается их высокой стоимостью и, как следствие, относительной недоступностью. В 2021 г. компания «10x Genomics» анонсировала Visium HD — технологию пространственной транскриптомики с разрешением, в 400 раз превосходящим таковое у классического Visium и, соответственно, возможностью анализа на уровне единичной клетки.

ВЫВОДЫ И ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Прогресс в области мультиплексирования кДНК-библиотек единичных клеток и в разработке вычислительных методов биоинформатического анализа позволил в значительной степени расширить спектр информации, которую возможно извлечь, используя данные scRNA-seq. Помимо классических для scRNA-seq приложений, таких как определение клеточного цикла, идентификация клеточных кластеров, анализ дифференциальной экспрессии и сигнальных путей и типирование клеток, стало возможным исследовать предопределяющие фенотип генетические и эпигенетические характеристики клеток (CNV/SNV и состояние хроматина), предсказывать направление их дифференцировки, получать информацию о межклеточных взаимодействиях и филогении, в том числе в контексте пространственной организации тканей и органов.

Тем не менее получение информации о CNV/SNV, филогении и доступности хроматина в значительной степени зависит от качества и глубины секвенирования. Наиболее корректным в этом плане решением может быть коммерчески доступный, но трудоёмкий Smart-seq, основанный на захвате полноразмерных транскриптов, или интегративный анализ данных scRNA-seq, bulk DNA-seq и scDNA-seq. Другим потенциальным решением может стать усовершенствование протоколов подготовки библиотек полноразмерных транскриптов. Так, в 2022 г. был представлен протокол FLASH-seq, превосходящий по скорости и чувствительности любой из существующих протоколов scRNA-seq [147]. В основе разработки лежит протокол Smart-seq 2, однако для уменьшения временных затрат и повышения разрешающей способности авторы внесли в него несколько ключевых модификаций: объединили обратную транскрипцию и предварительную амплификацию кДНК; заменили обратную транскриптазу Superscript II на более эффективную Superscript IV; увеличили количество дезоксицитидинтрифосфата для индукции C-хвостовой активности SSRTIV и усиления реакции переключения матрицы и разместили рибогуанозин в позиции 3' олигонуклеотида, необходимого для инвазии цепи ДНК и смены матрицы. Кроме того, многообещающей перспективой могут быть платформы для мультиомиксного анализа единичных клеток. Подобные протоколы уже разработаны и предоставляют возможность комбинирования оценки доступности хроматина и транскриптома единичных клеток (sci-CAR [148] и SNARE-seq [149]) и совместного проведения полногеномного секвенирования и профилирования экспрессии генов (DNTR-seq) [150]. Однако данные методы чрезвычайно трудоёмки, дороги в исполнении и характеризуются высоким процентом ложноположительных результатов.

Стоит также уделить внимание нюансам в определении межклеточных взаимодействий на основе анализа пар лиганд-рецептор. Инструменты, позволяющие выводить данную модальность из данных scRNA-seq, опираются на информацию о лиганд-рецепторных взаимодействиях из различных источников. Соответственно, при использовании различных эталонных данных конечный результат будет отличаться. Информация о лиганд-рецепторных взаимодействиях также используется и при *de novo* реконструкции пространственной организации в инструменте CSOmap. Из-за потенциальной вариабельности конечных

результатов данные методы могут дать лишь ряд гипотез, которые необходимо валидировать в других экспериментах, например, с помощью методов пространственной транскриптомики.

В целом, мы ожидаем, что бурное развитие инструментов биоинформатического анализа совместно с усовершенствованием протоколов по подготовке библиотек РНК/ДНК единичных клеток и разработкой платформ для мультиомиксного анализа в значительной степени увеличит качество биомедицинских исследований. Технический прогресс в области технологий на уровне единичных клеток поможет расшифровать клеточную гетерогенность, обусловленную совокупностью конститутивных и функциональных особенностей, что, в свою очередь, позволит расширить понимание биологических процессов в норме и патологии и сформировать принципиально новые подходы к персонализированной терапии заболеваний.

Вклад авторов. А.А. Хозяинова, Е.В. Денисов — концепция обзора; А.А. Хозяинова, А.А. Валяева, М.С. Арбатский, С.В. Исаев, П.С. Ямщиков, Е.В. Волчков, М.С. Сабиров, В.Р. Зайнуллина, В.И. Чечехин, Р.С. Воробьев, М.Е. Меняйло, П.А. Тюрин-Кузьмин, Е.В. Денисов — сбор информации, анализ публикаций, написание и редактирование разделов обзора.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30016).

Благодарности. Мы благодарим А.А. Щеголеву за графическое сопровождение статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B. B., Siddiqui, A., Lao, K., and Surani, M. A. (2009) mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell, *Nat. Methods*, **6**, 377-382, doi: 10.1038/nmeth.1315.
2. Islam, S., Kjällquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J. B., Lönnerberg, P., and Linnarsson, S. (2011) Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq, *Genome Res.*, **21**, 1160-1167, doi: 10.1101/gr.110882.110.
3. Ke, M., Elshenawy, B., Sheldon, H., Arora, A., and Buffa, F. M. (2022) Single cell RNA-sequencing: A powerful yet still challenging technology to study cellular heterogeneity, *BioEssays*, **44**, 2200084, doi: 10.1002/bies.202200084.
4. Luo, G., Gao, Q., Zhang, S., and Yan, B. (2020) Probing infectious disease by single-cell RNA sequencing: progresses and perspectives, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **18**, 2962-2971, doi: 10.1016/j.csbj.2020.10.016.
5. Yifan, C., Fan, Y., and Jun, P. (2020) Visualization of cardiovascular development, physiology and disease at the single-cell level: opportunities and future challenges, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **142**, 80-92, doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.03.005.
6. Pan, Y., Cao, W., Mu, Y., and Zhu, Q. (2022) Microfluidics facilitates the development of single-cell RNA sequencing, *Biosensors*, **12**, 450, doi: 10.3390/bios12070450.
7. Wehrens, M., de Leeuw, A. E., Wright-Clark, M., Eding, J. E., Boogerd, C. J., Molenaar, B., van der Kraak, P. H., Kuster, D. W., van der Velden, J., and Michels, M. (2022) Single-cell transcriptomics provides insights into hypertrophic cardiomyopathy, *Cell Rep.*, **39**, 110809, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110809.
8. Olah, M., Menon, V., Habib, N., Taga, M. F., Ma, Y., Yung, C. J., Cimpean, M., Khairallah, A., Coronas-Samano, G., and Sankowski, R. (2020) Single cell RNA sequencing of human microglia uncovers a subset associated with Alzheimer's disease, *Nat. Commun.*, **11**, 1-18, doi: 10.1038/s41467-020-19737-2.
9. Kamath, T., Abdulraouf, A., Burris, S., Langlieb, J., Gazestani, V., Nadaf, N. M., Balderrama, K., Vanderburg, C., and Macosko, E. Z. (2022) Single-cell genomic profiling of human dopamine neurons identifies a population that selectively degenerates in Parkinson's disease, *Nat. Neurosci.*, **25**, 588-595, doi: 10.1038/s41593-022-01061-1.
10. Zhou, S., Huang, Y.-E., Liu, H., Zhou, X., Yuan, M., Hou, F., Wang, L., and Jiang, W. (2021) Single-cell RNA-seq dissects the intratumoral heterogeneity of triple-negative breast cancer based on gene regulatory networks, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **23**, 682-690, doi: 10.1016/j.omtn.2020.12.018.
11. Zhang, T.-Q., Chen, Y., and Wang, J.-W. (2021) A single-cell analysis of the Arabidopsis vegetative shoot apex, *Dev. Cell*, **56**, 1056-1074.e1058, doi: 10.1016/j.devcel.2021.02.021.
12. Fu, Y., Huang, X., Zhang, P., van de Leemput, J., and Han, Z. (2020) Single-cell RNA sequencing identifies novel cell types in Drosophila blood, *J. Genet. Genomics*, **47**, 175-186, doi: 10.1016/j.jgg.2020.02.004.

13. Jiang, M., Xiao, Y., Weigao, E., Ma, L., Wang, J., Chen, H., Gao, C., Liao, Y., Guo, Q., and Peng, J. (2021) Characterization of the zebrafish cell landscape at single-cell resolution, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 743421, doi: 10.3389/fcell.2021.743421.
14. Ho, D. W.-H., Tsui, Y.-M., Chan, L.-K., Sze, K. M.-F., Zhang, X., Cheu, J. W.-S., Chiu, Y.-T., Lee, J. M.-F., Chan, A. C.-Y., and Cheung, E. T.-Y. (2021) Single-cell RNA sequencing shows the immunosuppressive landscape and tumor heterogeneity of HBV-associated hepatocellular carcinoma, *Nat. Commun.*, **12**, 1-14, doi: 10.1038/s41467-021-24010-1.
15. Zhao, J., Zhang, S., Liu, Y., He, X., Qu, M., Xu, G., Wang, H., Huang, M., Pan, J., and Liu, Z. (2020) Single-cell RNA sequencing reveals the heterogeneity of liver-resident immune cells in human, *Cell Discov.*, **6**, 1-19, doi: 10.1038/s41421-020-0157-z.
16. Macosko, E. Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A. R., Kamitaki, N., and Martersteck, E. M. (2015) Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets, *Cell*, **161**, 1202-1214, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.002.
17. Kowalczyk, M. S., Tirosh, I., Heckl, D., Rao, T. N., Dixit, A., Haas, B. J., Schneider, R. K., Wagers, A. J., Ebert, B. L., and Regev, A. (2015) Single-cell RNA-seq reveals changes in cell cycle and differentiation programs upon aging of hematopoietic stem cells, *Genome Res.*, **25**, 1860-1872, doi: 10.1101/gr.192237.115.
18. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E., and Satija, R. (2018) Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species, *Nat. Biotechnol.*, **36**, 411-420, doi: 10.1038/nbt.4096.
19. Wolf, F. A., Angerer, P., and Theis, F. J. (2018) SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis, *Genome Biol.*, **19**, 1-5, doi: 10.1186/s13059-017-1382-0.
20. Scialdone, A., Tanaka, Y., Jawaid, W., Moignard, V., Wilson, N. K., Macaulay, I. C., Marioni, J. C., and Göttgens, B. (2016) Resolving early mesoderm diversification through single-cell expression profiling, *Nature*, **535**, 289-293, doi: 10.1038/nature18633.
21. Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S. M., Wadsworth, M. H., Treacy, D., Trombetta, J. J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., and Murphy, G. (2016) Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq, *Science*, **352**, 189-196, doi: 10.1126/science.aad0501.
22. Hsiao, C. J., Tung, P., Blischak, J. D., Burnett, J. E., Barr, K. A., Dey, K. K., Stephens, M., and Gilad, Y. (2020) Characterizing and inferring quantitative cell cycle phase in single-cell RNA-seq data analysis, *Genome Res.*, **30**, 611-621, doi: 10.1101/gr.247759.118.
23. Liu, Z., Lou, H., Xie, K., Wang, H., Chen, N., Aparicio, O. M., Zhang, M. Q., Jiang, R., and Chen, T. (2017) Reconstructing cell cycle pseudo time-series via single-cell transcriptome data, *Nat. Commun.*, **8**, 1-9, doi: 10.1038/s41467-017-00039-z.
24. Liang, S., Wang, F., Han, J., and Chen, K. (2020) Latent periodic process inference from single-cell RNA-seq data, *Nat. Commun.*, **11**, 1-8, doi: 10.1038/s41467-020-15295-9.
25. Anafi, R. C., Francey, L. J., Hogenesch, J. B., and Kim, J. (2017) CYCLOPS reveals human transcriptional rhythms in health and disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 5312-5317, doi: 10.1073/pnas.1619320114.
26. Liu, J., Yang, M., Zhao, W., and Zhou, X. (2022) CCPE: cell cycle pseudotime estimation for single cell RNA-seq data, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 704-716, doi: 10.1093/nar/gkab1236.
27. Melms, J. C., Biermann, J., Huang, H., Wang, Y., Nair, A., Tagore, S., Katsyv, I., Rendeiro, A. F., Amin, A. D., Schapiro, D., et al. (2021) A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19, *Nature*, **595**, 114-119, doi: 10.1038/s41586-021-03569-1.
28. Delorey, T. M., Ziegler, C. G., Heimberg, G., Normand, R., Yang, Y., Segerstolpe, Å., Abbondanza, D., Fleming, S. J., Subramanian, A., Montoro, D. T., et al. (2021) COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets, *Nature*, **595**, 107-113, doi: 10.1038/s41586-021-03570-8.
29. Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J. Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., et al. (2019) Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease, *Nature*, **570**, 332-337, doi: 10.1038/s41586-019-1195-2.
30. Velmshchev, D., Schirmer, L., Jung, D., Haeussler, M., Perez, Y., Mayer, S., Bhaduri, A., Goyal, N., Rowitch, D. H., and Kriegstein, A. R. (2019) Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism, *Science*, **364**, 685-689, doi: 10.1126/science.aav8130.
31. Kathiriyai, J. J., Brumwell, A. N., Jackson, J. R., Tang, X., and Chapman, H. A. (2020) Distinct airway epithelial stem cells hide among club cells but mobilize to promote alveolar regeneration, *Cell Stem Cell*, **26**, 346-358.e344, doi: 10.1016/j.stem.2019.12.014.
32. Steuerma, Y., Cohen, M., Peshes-Yaloz, N., Valadarsky, L., Cohn, O., David, E., Frishberg, A., Mayo, L., Bacharach, E., Amit, I., and Gat-Viks, I. (2018) Dissection of influenza infection in vivo by single-cell RNA sequencing, *Cell Systems*, **6**, 679-691.e674, doi: 10.1016/j.cels.2018.05.008.
33. Kiselev, V. Y., Andrews, T. S., and Hemberg, M. (2019) Challenges in unsupervised clustering of single-cell RNA-seq data, *Nat. Rev. Genet.*, **20**, 273-282, doi: 10.1038/s41576-018-0088-9.
34. Brennecke, P., Anders, S., Kim, J. K., Kołodziejczyk, A. A., Zhang, X., Proserpio, V., Baying, B., Benes, V., Teichmann, S. A., Marioni, J. C., and Heisler, M. G. (2013) Accounting for technical noise

- in single-cell RNA-seq experiments, *Nat. Methods*, **10**, 1093-1095, doi: 10.1038/nmeth.2645.
35. Andrews, T. S., and Hemberg, M. (2019) M3Drop: dropout-based feature selection for scRNASeq, *Bioinformatics*, **35**, 2865-2867, doi: 10.1093/bioinformatics/bty1044.
 36. Yau, C. (2016) pcaReduce: hierarchical clustering of single cell transcriptional profiles, *BMC Bioinformatics*, **17**, 1-11, doi: 10.1186/s12859-016-0984-y.
 37. Lin, P., Troup, M., and Ho, J. W. (2017) CIDR: Ultrafast and accurate clustering through imputation for single-cell RNA-seq data, *Genome Biol.*, **18**, 1-11, doi: 10.1186/s13059-017-1188-0.
 38. Kiselev, V. Y., Kirschner, K., Schaub, M. T., Andrews, T., Yiu, A., Chandra, T., Natarajan, K. N., Reik, W., Barahona, M., Green, A. R., and Hemberg, M. (2017) SC3: consensus clustering of single-cell RNA-seq data, *Nat. Methods*, **14**, 483-486, doi: 10.1038/nmeth.4236.
 39. Levine, J. H., Simonds, E. F., Bendall, S. C., Davis, K. L., El-ad, D. A., Tadmor, M. D., Litvin, O., Fienberg, H. G., Jager, A., Zunder, E. R., et al. (2015) Data-driven phenotypic dissection of AML reveals progenitor-like cells that correlate with prognosis, *Cell*, **162**, 184-197, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.047.
 40. Montoro, D. T., Haber, A. L., Biton, M., Vinarsky, V., Lin, B., Birket, S. E., Yuan, F., Chen, S., Leung, H. M., and Villoria, J. (2018) A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes, *Nature*, **560**, 319-324, doi: 10.1038/s41586-018-0393-7.
 41. Plasschaert, L. W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., Klein, A. M., and Jaffe, A. B. (2018) A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte, *Nature*, **560**, 377-381, doi: 10.1038/s41586-018-0394-6.
 42. Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, **15**, 1-21, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
 43. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*, **26**, 139-140, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
 44. Van den Berge, K., Perraudeau, F., Soneson, C., Love, M. I., Risso, D., Vert, J.-P., Robinson, M. D., Dudoit, S., and Clement, L. (2018) Observation weights unlock bulk RNA-seq tools for zero inflation and single-cell applications, *Genome Biol.*, **19**, 1-17, doi: 10.1186/s13059-018-1406-4.
 45. Tang, W., Bertaux, F., Thomas, P., Stefanelli, C., Saint, M., Marguerat, S., and Shahrezaei, V. (2020) bayNorm: Bayesian gene expression recovery, imputation and normalization for single-cell RNA-sequencing data, *Bioinformatics*, **36**, 1174-1181, doi: 10.1093/bioinformatics/btz726.
 46. Soneson, C., and Robinson, M. D. (2018) Bias, robustness and scalability in single-cell differential expression analysis, *Nat. Methods*, **15**, 255-261, doi: 10.1038/nmeth.4612.
 47. Kharchenko, P. V., Silberstein, L., and Scadden, D. T. (2014) Bayesian approach to single-cell differential expression analysis, *Nat. Methods*, **11**, 740-742, doi: 10.1038/nmeth.2967.
 48. Finak, G., McDavid, A., Yajima, M., Deng, J., Gersuk, V., Shalek, A. K., Slichter, C. K., Miller, H. W., McElrath, M. J., Prlic, M., et al. (2015) MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data, *Genome Biol.*, **16**, 1-13, doi: 10.1186/s13059-015-0844-5.
 49. Zhang, J. M., Kamath, G. M., and David, N. T. (2019) Valid post-clustering differential analysis for single-cell RNA-Seq, *Cell Systems*, **9**, 383-392.e386, doi: 10.1016/j.cels.2019.07.012.
 50. Zimmerman, K. D., Espeland, M. A., and Langefeld, C. D. (2021) A practical solution to pseudo-replication bias in single-cell studies, *Nat. Commun.*, **12**, 1-9, doi: 10.1038/s41467-021-21038-1.
 51. Denninger, J. K., Walker, L. A., Chen, X., Turkoglu, A., Pan, A., Tapp, Z., Senthilvelan, S., Rindani, R., Kokiko-Cochran, O. N., and Bundschuh, R. (2022) Robust transcriptional profiling and identification of differentially expressed genes with low input RNA sequencing of adult hippocampal neural stem and progenitor populations, *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 810722, doi: 10.3389/fnmol.2022.810722.
 52. Hücker, S. M., Fehlmann, T., Werno, C., Weidele, K., Lüke, F., Schlenska-Lange, A., Klein, C. A., Keller, A., and Kirsch, S. (2021) Single-cell microRNA sequencing method comparison and application to cell lines and circulating lung tumor cells, *Nat. Commun.*, **12**, 1-13, doi: 10.1038/s41467-021-24611-w.
 53. Valyaeva, A. A., Zharikova, A. A., Kasianov, A. S., Vassetzky, Y. S., and Sheval, E. V. (2020) Expression of SARS-CoV-2 entry factors in lung epithelial stem cells and its potential implications for COVID-19, *Sci. Rep.*, **10**, 1-8, doi: 10.1038/s41598-020-74598-5.
 54. Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., Cheng, L., Li, J., Wang, X., Wang, F., et al. (2020) Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19, *Nat. Med.*, **26**, 842-844, doi: 10.1038/s41591-020-0901-9.
 55. Yakushov, S., Menyailo, M., Denisov, E., Karlina, I., Zainullina, V., Kirgizov, K., Romantsova, O., Timashev, P., and Ulasov, I. (2022) Identification of factors driving doxorubicin-resistant ewing tumor cells to survival, *Cancers*, **14**, 5498, doi: 10.3390/cancers14225498.
 56. Tyurin-Kuzmin, P. A., Karagyaur, M. N., Kulebyakin, K. Y., Dyikanov, D. T., Chechekhin, V. I., Ivanova, A. M., Skryabina, M. N., Arbatskiy, M. S., Sysoeva, V. Y., Kalinina, N. I., and Tkachuk, V. A.

- (2020) Functional heterogeneity of protein kinase a activation in multipotent stromal cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4442, doi: 10.3390/ijms21124442.
57. Bassez, A., Vos, H., Van Dyck, L., Floris, G., Arijis, I., Desmedt, C., Boeckx, B., Vanden Bempt, M., Nevelsteen, I., Lambein, K., et al. (2021) A single-cell map of intratumoral changes during anti-PD1 treatment of patients with breast cancer, *Nat. Med.*, **27**, 820-832, doi: 10.1038/s41591-021-01323-8.
 58. Bi, K., He, M. X., Bakouny, Z., Kanodia, A., Napolitano, S., Wu, J., Grimaldi, G., Braun, D. A., Cuoco, M. S., Mayorga, A., et al. (2021) Tumor and immune reprogramming during immunotherapy in advanced renal cell carcinoma, *Cancer Cell*, **39**, 649-661.e645, doi: 10.1016/j.ccell.2021.02.015.
 59. Hoernes, T. P., Hüttenhofer, A., and Erlacher, M. D. (2016) mRNA modifications: Dynamic regulators of gene expression? *RNA Biol.*, **13**, 760-765, doi: 10.1080/15476286.2016.1203504.
 60. Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples, *FEBS Lett.*, **583**, 3966-3973, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036.
 61. Aran, D., Looney, A. P., Liu, L., Wu, E., Fong, V., Hsu, A., Chak, S., Naikawadi, R. P., Wolters, P. J., Abate, A. R., et al. (2019) Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage, *Nat. Immunol.*, **20**, 163-172, doi: 10.1038/s41590-018-0276-y.
 62. Ianevski, A., Giri, A. K., and Aittokallio, T. (2022) Fully-automated and ultra-fast cell-type identification using specific marker combinations from single-cell transcriptomic data, *Nat. Commun.*, **13**, 1-10, doi: 10.1038/s41467-022-28803-w.
 63. Shao, X., Liao, J., Lu, X., Xue, R., Ai, N., and Fan, X. (2020) scCATCH: automatic annotation on cell types of clusters from single-cell RNA sequencing data, *iScience*, **23**, 100882, doi: 10.1016/j.isci.2020.100882.
 64. Guo, H., and Li, J. (2021) scSorter: assigning cells to known cell types according to marker genes, *Genome Biol.*, **22**, 1-18, doi: 10.1186/s13059-021-02281-7.
 65. Zhang, Z., Luo, D., Zhong, X., Choi, J. H., Ma, Y., Wang, S., Mahrt, E., Guo, W., Stawiski, E. W., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Kapur, P., Hon, G. C., Brugarolas, J., and Wang, T. (2019) SCINA: a semi-supervised subtyping algorithm of single cells and bulk samples, *Genes*, **10**, 531, doi: 10.3390/genes10070531.
 66. Xu, C., Lopez, R., Mehlman, E., Regier, J., Jordan, M. I., and Yosef, N. (2021) Probabilistic harmonization and annotation of single-cell transcriptomics data with deep generative models, *Mol. Syst. Biol.*, **17**, e9620, doi: 10.15252/msb.20209620.
 67. Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck III, W. M., Zheng, S., Butler, A., Lee, M. J., Wilk, A. J., Darby, C., Zager, M., et al. (2021) Integrated analysis of multimodal single-cell data, *Cell*, **184**, 3573-3587.e3529, doi: 10.1016/j.cell.2021.04.048.
 68. Pasquini, G., Arias, J. E. R., Schäfer, P., and Busskamp, V. (2021) Automated methods for cell type annotation on scRNA-seq data, *Computat. Struct. Biotechnol. J.*, **19**, 961-969, doi: 10.1016/j.csbj.2021.01.015.
 69. Khrameeva, E., Kurochkin, I., Han, D., Guijarro, P., Kanton, S., Santel, M., Qian, Z., Rong, S., Mazin, P., Sabirov, M., et al. (2020) Single-cell-resolution transcriptome map of human, chimpanzee, bonobo, and macaque brains, *Genome Res.*, **30**, 776-789, doi: 10.1101/gr.256958.119.
 70. Han, G., Deng, Q., Marques-Piubelli, M. L., Dai, E., Dang, M., Ma, M. C. J., Li, X., Yang, H., Henderson, J., Kudryashova, O., et al. (2022) Follicular lymphoma microenvironment characteristics associated with tumor cell mutations and MHC class II expression, *Blood Cancer Discov.*, **3**, 428-443, doi: 10.1158/2643-3230.BCD-21-0075.
 71. La Manno, G., Soldatov, R., Zeisel, A., Braun, E., Hochgerner, H., Petukhov, V., Lidschreiber, K., Kastrioti, M. E., Lönnerberg, P., Furlan, A., et al. (2018) RNA velocity of single cells, *Nature*, **560**, 494-498, doi: 10.1038/s41586-018-0414-6.
 72. Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharrel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N. J., Livak, K. J., Mikkelsen, T. S., and Rinn, J. L. (2014) The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 381-386, doi: 10.1038/nbt.2859.
 73. Ji, Z., and Ji, H. (2016) TSCAN: Pseudo-time reconstruction and evaluation in single-cell RNA-seq analysis, *Nucleic Acids Res.*, **44**, e117-e117, doi: 10.1093/nar/gkw430.
 74. Street, K., Risso, D., Fletcher, R. B., Das, D., Ngai, J., Yosef, N., Purdom, E., and Dudoit, S. (2018) Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics, *BMC Genomics*, **19**, 1-16, doi: 10.1186/s12864-018-4772-0.
 75. Saelens, W., Cannoodt, R., Todorov, H., and Saeys, Y. (2019) A comparison of single-cell trajectory inference methods, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 547-554, doi: 10.1038/s41587-019-0071-9.
 76. Nam, D. K., Lee, S., Zhou, G., Cao, X., Wang, C., Clark, T., Chen, J., Rowley, J. D., and Wang, S. M. (2002) Oligo (dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly (A) priming during reverse transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6152-6156, doi: 10.1073/pnas.092140899.
 77. Perrimon, N., Pitsouli, C., and Shilo, B. Z. (2012) Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a005975, doi: 10.1101/cshperspect.a005975.
 78. Gaud, G., Lesourne, R., and Love, P. E. (2018) Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling, *Nat. Rev. Immunol.*, **18**, 485-497, doi: 10.1038/s41577-018-0020-8.

79. Yeung, T. L., Sheng, J., Leung, C. S., Li, F., Kim, J., Ho, S. Y., Matzuk, M. M., Lu, K. H., Wong, S. T. C., and Mok, S. C. (2019) Systematic identification of druggable epithelial-stromal crosstalk signaling networks in ovarian cancer, *J. Natl. Cancer Institute*, **111**, 272-282, doi: 10.1093/jnci/djy097.
80. Chua, R. L., Lukassen, S., Trump, S., Hennig, B. P., Wendisch, D., Pott, F., Debnath, O., Thürmann, L., Kurth, F., Völker, M. T., Kazmierski, J., Timmermann, B., Twardziok, S., Schneider, S., Machleidt, F., Müller-Redetzky, H., Maier, M., Krannich, A., Schmidt, S., Balzer, F., et al. (2020) COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis, *Nat. Biotechnol.*, **38**, 970-979, doi: 10.1038/s41587-020-0602-4.
81. Yuan, D., Tao, Y., Chen, G., and Shi, T. (2019) Systematic expression analysis of ligand-receptor pairs reveals important cell-to-cell interactions inside glioma, *Cell Commun. Signal.*, **17**, 48, doi: 10.1186/s12964-019-0363-1.
82. Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., and Kumar, G. N. (2014) Protein-protein interaction detection: methods and analysis, *Int. J. Proteomics*, **2014**, 147648, doi: 10.1155/2014/147648.
83. Wang, Y., Wang, R., Zhang, S., Song, S., Jiang, C., Han, G., Wang, M., Ajani, J., Futreal, A., and Wang, L. (2019) iTALK: an R package to characterize and illustrate intercellular communication, *bioRxiv*, 507871, doi: 10.1101/507871.
84. Efremova, M., Vento-Tormo, M., Teichmann, S. A., and Vento-Tormo, R. (2020) CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes, *Nat. Protocols*, **15**, 1484-1506, doi: 10.1038/s41596-020-0292-x.
85. Cabello-Aguilar, S., Alame, M., Kon-Sun-Tack, F., Fau, C., Lacroix, M., and Colinge, J. (2020) SingleCellSignalR: inference of intercellular networks from single-cell transcriptomics, *Nucleic Acids Res.*, **48**, e55, doi: 10.1093/nar/gkaa183.
86. Zhang, Y., Liu, T., Hu, X., Wang, M., Wang, J., Zou, B., Tan, P., Cui, T., Dou, Y., Ning, L., Huang, Y., Rao, S., Wang, D., and Zhao, X. (2021) CellCall: integrating paired ligand-receptor and transcription factor activities for cell-cell communication, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 8520-8534, doi: 10.1093/nar/gkab638.
87. Tsuyuzaki, K., Ishii, M., and Nikaido, I. (2019) Uncovering hypergraphs of cell-cell interaction from single cell RNA-sequencing data, *bioRxiv*, 566182, doi: 10.1101/566182.
88. Armingol, E., Officer, A., Harismendy, O., and Lewis, N. E. (2021) Deciphering cell-cell interactions and communication from gene expression, *Nat. Rev. Genet.*, **22**, 71-88, doi: 10.1038/s41576-020-00292-x.
89. Fischer, D. S., Schaar, A. C., and Theis, F. J. (2021) Learning cell communication from spatial graphs of cells, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.07.11.451750.
90. Van Dam, S., Vösa, U., van der Graaf, A., Franke, L., and de Magalhães, J. P. (2018) Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions, *Brief. Bioinform.*, **19**, 575-592, doi: 10.1093/bib/bbw139.
91. Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y. H., Debiec-Rychter, M., Adriaens, C., Radaelli, E., Wolter, P., Bechter, O., Dummer, R., Levesque, M., Piris, A., Frederick, D. T., Boland, G., Flaherty, K. T., et al. (2018) Toward minimal residual disease-directed therapy in melanoma, *Cell*, **174**, 843-855.e819, doi: 10.1016/j.cell.2018.06.025.
92. Huynh-Thu, V. A., Irrthum, A., Wehenkel, L., and Geurts, P. (2010) Inferring regulatory networks from expression data using tree-based methods, *PLoS One*, **5**, e12776, doi: 10.1371/journal.pone.0012776.
93. Moerman, T., Aibar Santos, S., Bravo González-Blas, C., Simm, J., Moreau, Y., Aerts, J., and Aerts, S. (2019) GRNBoost2 and Arboreto: efficient and scalable inference of gene regulatory networks, *Bioinformatics*, **35**, 2159-2161, doi: 10.1093/bioinformatics/bty916.
94. Aibar, S., González-Blas, C. B., Moerman, T., Huynh-Thu, V. A., Imrichova, H., Hulselmans, G., Rambow, F., Marine, J.-C., Geurts, P., and Aerts, J. (2017) SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering, *Nat. Methods*, **14**, 1083-1086, doi: 10.1038/nmeth.4463.
95. Langfelder, P., and Horvath, S. (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis, *BMC Bioinformatics*, **9**, 1-13, doi: 10.1186/1471-2105-9-559.
96. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15545-15550, doi: 10.1073/pnas.0506580102.
97. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., et al. (2019) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D607-D613, doi: 10.1093/nar/gky1131.
98. Kim, C. Y., Baek, S., Cha, J., Yang, S., Kim, E., Marcotte, E. M., Hart, T., and Lee, I. (2022) HumanNet v3: an improved database of human gene networks for disease research, *Nucleic acids Res.*, **50**, D632-D639, doi: 10.1093/nar/gkab1048.

99. Xue, Z., Huang, K., Cai, C., Cai, L., Jiang, C.-Y., Feng, Y., Liu, Z., Zeng, Q., Cheng, L., Sun, Y. E., et al. (2013) Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing, *Nature*, **500**, 593-597, doi: 10.1038/nature12364.
100. Wu, H., Chen, S., Yu, J., Li, Y., Zhang, X.-Y., Yang, L., Zhang, H., Jiang, M., Brunicardi, F. C., Wang, C., and Wu, S. (2018) Single-cell transcriptome analyses reveal molecular signals to intrinsic and acquired paclitaxel resistance in esophageal squamous cancer cells, *Cancer Lett.*, **420**, 156-167, doi: 10.1016/j.canlet.2018.01.059.
101. Lu, J., Chen, Y., Zhang, X., Guo, J., Xu, K., and Li, L. (2022) A novel prognostic model based on single-cell RNA sequencing data for hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell Int.*, **22**, 1-12, doi: 10.1186/s12935-022-02469-2.
102. Lee, W.-P., and Tzou, W.-S. (2009) Computational methods for discovering gene networks from expression data, *Brief. Bioinform.*, **10**, 408-423, doi: 10.1093/bib/bbp028.
103. Matsumoto, H., Kiryu, H., Furusawa, C., Ko, M. S., Ko, S. B., Gouda, N., Hayashi, T., and Nikaido, I. (2017) SCODE: an efficient regulatory network inference algorithm from single-cell RNA-Seq during differentiation, *Bioinformatics*, **33**, 2314-2321, doi: 10.1093/bioinformatics/btx194.
104. Pös, O., Radvanszky, J., Buglyó, G., Pös, Z., Rusnakova, D., Nagy, B., and Szemes, T. (2021) DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects, *Biomed. J.*, **44**, 548-559, doi: 10.1016/j.bj.2021.02.003.
105. Lye, Z. N., and Purugganan, M. D. (2019) Copy number variation in domestication, *Trends Plant Sci.*, **24**, 352-365, doi: 10.1016/j.tplants.2019.01.003.
106. Zhao, Y., Carter, R., Natarajan, S., Varn, F. S., Compton, D. A., Gawad, C., Cheng, C., and Godek, K. M. (2019) Single-cell RNA sequencing reveals the impact of chromosomal instability on glioblastoma cancer stem cells, *BMC Med. Genom.*, **12**, 1-16, doi: 10.1186/s12920-019-0532-5.
107. Zhou, B., Ho, S. S., Zhang, X., Pattni, R., Harak-singh, R. R., and Urban, A. E. (2018) Whole-genome sequencing analysis of CNV using low-coverage and paired-end strategies is efficient and outperforms array-based CNV analysis, *J. Med. Genet.*, **55**, 735-743, doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105272.
108. Shao, X., Lv, N., Liao, J., Long, J., Xue, R., Ai, N., Xu, D., and Fan, X. (2019) Copy number variation is highly correlated with differential gene expression: a pan-cancer study, *BMC Med. Genet.*, **20**, 1-14, doi: 10.1186/s12881-019-0909-5.
109. Fan, J., Lee, H.-O., Lee, S., Ryu, D.-E., Lee, S., Xue, C., Kim, S. J., Kim, K., Barkas, N., Park, P. J., et al. (2018) Linking transcriptional and genetic tumor heterogeneity through allele analysis of single-cell RNA-seq data, *Gen. Res.*, **28**, 1217-1227, doi: 10.1101/gr.228080.117.
110. Serin Harmanci, A., Harmanci, A. O., and Zhou, X. (2020) CaSpER identifies and visualizes CNV events by integrative analysis of single-cell or bulk RNA-sequencing data, *Nat. Commun.*, **11**, 1-16, doi: 10.1038/s41467-019-13779-x.
111. Gao, R., Bai, S., Henderson, Y. C., Lin, Y., Schalck, A., Yan, Y., Kumar, T., Hu, M., Sei, E., Davis, A., et al. (2021) Delineating copy number and clonal substructure in human tumors from single-cell transcriptomes, *Nat. Biotechnol.*, **39**, 599-608, doi: 10.1038/s41587-020-00795-2.
112. Menyailo, M. E., Zainullina, V. R., Tashireva, L. A., Zolotareva, S. Y., Gerashchenko, T. S., Alifanov, V. V., Savelieva, O. E., Grigoryeva, E. S., Tarabanovskaya, N. A., Popova, N. O., Khozyainova, A. A., Choinzonov, E. L., Cherdyntseva, N. V., Perelmutter, V. M., and Denisov, E. V. (2022) Heterogeneity of circulating epithelial cells in breast cancer at single-cell resolution: identifying tumor and hybrid cells, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.11.24.469962.
113. Müller, S., Liu, S. J., Di Lullo, E., Malatesta, M., Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., Kohanbash, G., Aghi, M., Kriegstein, A. R., Lim, D. A., and Diaz, A. (2016) Single-cell sequencing maps gene expression to mutational phylogenies in PDGF- and EGF-driven gliomas, *Mol. Syst. Biol.*, **12**, 889, doi: 10.15252/msb.20166969.
114. McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., and DePristo, M. A. (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data, *Gen. Res.*, **20**, 1297-1303, doi: 10.1101/gr.107524.110.
115. Wu, T. D., Reeder, J., Lawrence, M., Becker, G., and Brauer, M. J. (2016) GMAP and GSNAP for Genomic Sequence Alignment: Enhancements to Speed, Accuracy, and Functionality, in *Statistical Genomics*, Springer, pp. 283-334.
116. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools, *Bioinformatics*, **25**, 2078-2079, doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.
117. Liu, F., Zhang, Y., Zhang, L., Li, Z., Fang, Q., Gao, R., and Zhang, Z. (2019) Systematic comparative analysis of single-nucleotide variant detection methods from single-cell RNA sequencing data, *Gen. Biol.*, **20**, 1-15, doi: 10.1186/s13059-019-1863-4.
118. Ludwig, L. S., Lareau, C. A., Ulirsch, J. C., Christian, E., Muus, C., Li, L. H., Pelka, K., Ge, W., Oren, Y., Brack, A., et al. (2019) Lineage tracing in humans enabled by mitochondrial mutations and single-cell genomics, *Cell*, **176**, 1325-1339. e1322, doi: 10.1016/j.cell.2019.01.022.

119. Wilson, G. W., Derouet, M., Darling, G. E., and Yeung, J. C. (2021) scSNV: accurate dscRNA-seq SNV co-expression analysis using duplicate tag collapsing, *Gen. Biol.*, **22**, 1-27, doi: 10.1186/s13059-021-02364-5.
120. Yao, Y., and Dai, W. (2014) Genomic instability and cancer, *J. Carcinog. Mutagen.*, **5**, 1000163, doi: 10.4172/2157-2518.1000165.
121. Fu, Y., Zhang, F., Zhang, X., Yin, J., Du, M., Jiang, M., Liu, L., Li, J., Huang, Y., and Wang, J. (2019) High-throughput single-cell whole-genome amplification through centrifugal emulsification and eMDA, *Commun. Biol.*, **2**, 1-10, doi: 10.1038/s42003-019-0401-y.
122. Schnepf, P. M., Chen, M., Keller, E. T., and Zhou, X. (2019) SNV identification from single-cell RNA sequencing data, *Hum. Mol. Genet.*, **28**, 3569-3583, doi: 10.1093/hmg/ddz207.
123. Ramazzotti, D., Angaroni, F., Maspero, D., Ascolani, G., Castiglioni, I., Piazza, R., Antoniotti, M., and Graudenzi, A. (2022) Variant calling from scRNA-seq data allows the assessment of cellular identity in patient-derived cell lines, *Nat. Commun.*, **13**, 1-3, doi: 10.1038/s41467-022-30230-w.
124. Zhou, Z., Xu, B., Minn, A., and Zhang, N. R. (2020) DENDRO: genetic heterogeneity profiling and subclone detection by single-cell RNA sequencing, *Genome Biol.*, **21**, 1-15, doi: 10.1186/s13059-019-1922-x.
125. McCarthy, D. J., Rostom, R., Huang, Y., Kunz, D. J., Danecek, P., Bonder, M. J., Hagai, T., Lyu, R., Wang, W., Gaffney, D. J., Simons, B. D., Stegle, O., and Teichmann, S. A. (2020) Cardelino: computational integration of somatic clonal substructure and single-cell transcriptomes, *Nat. Methods*, **17**, 414-421, doi: 10.1038/s41592-020-0766-3.
126. Ciccolella, S., Ricketts, C., Soto Gomez, M., Patterson, M., Silverbush, D., Bonizzoni, P., Hajirasoulis, I., and Della Vedova, G. (2020) Inferring cancer progression from Single-Cell Sequencing while allowing mutation losses, *Bioinformatics*, **37**, 326-333, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa722.
127. Mehrabadi, F. R., Marie, K. L., Pérez-Guijarro, E., Malikić, S., Azer, E. S., Yang, H. H., Kızılkale, C., Gruen, C., Robinson, W., Liu, H., et al. (2021) Profiles of expressed mutations in single cells reveal subclonal expansion patterns and therapeutic impact of intratumor heterogeneity, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.03.26.437185.
128. Ziegenhain, C., Vieth, B., Parekh, S., Reinius, B., Guillaumet-Adkins, A., Smets, M., Leonhardt, H., Heyn, H., Hellmann, I., and Enard, W. (2017) Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods, *Mol. Cell*, **65**, 631-643.e634, doi: 10.1016/j.molcel.2017.01.023.
129. Kim, T.-K., and Shiekhhattar, R. (2015) Architectural and functional commonalities between enhancers and promoters, *Cell*, **162**, 948-959, doi: 10.1016/j.cell.2015.08.008.
130. Shlyueva, D., Stampfel, G., and Stark, A. (2014) Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions, *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 272-286, doi: 10.1038/nrg3682.
131. Wray, G. A. (2007) The evolutionary significance of cis-regulatory mutations, *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 206-216, doi: 10.1038/nrg2063.
132. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., and Greenleaf, W. J. (2013) Transposition of native chromatin for multimodal regulatory analysis and personal epigenomics, *Nat. Methods*, **10**, 1213, doi: 10.1038/nmeth.2688.
133. Wu, S. J., Furlan, S. N., Mihalas, A. B., Kaya-Okur, H. S., Feroze, A. H., Emerson, S. N., Zheng, Y., Carson, K., Cimino, P. J., and Keene, C. D. (2021) Single-cell CUT&Tag analysis of chromatin modifications in differentiation and tumor progression, *Nat. Biotechnol.*, **39**, 819-824, doi: 10.1038/s41587-021-00865-z.
134. Zhou, W., Ji, Z., Fang, W., and Ji, H. (2019) Global prediction of chromatin accessibility using small-cell-number and single-cell RNA-seq, *Nucleic Acids Res.*, **47**, e121-e121, doi: 10.1093/nar/gkz716.
135. Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., and Noble, W. S. (2015) The MEME suite, *Nucleic Acids Res.*, **43**, W39-W49, doi: 10.1093/nar/gkv416.
136. Schep, A. N., Wu, B., Buenrostro, J. D., and Greenleaf, W. J. (2017) chromVAR: inferring transcription-factor-associated accessibility from single-cell epigenomic data, *Nat. Methods*, **14**, 975-978, doi: 10.1038/nmeth.4401.
137. Moody, J., Kouno, T., Suzuki, A., Shibayama, Y., Terao, C., Chang, J.-C., López-Redondo, F., Yip, C. W., Ando, Y., Yamamoto, K., Carninci, P., Shin, J. W., and Hon, C.-C. (2021) Profiling of transcribed cis-regulatory elements in single cells, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.04.04.438388.
138. Pliner, H. A., Packer, J. S., McFaline-Figueroa, J. L., Cusanovich, D. A., Daza, R. M., Aghamirzaie, D., Srivatsan, S., Qiu, X., Jackson, D., and Minkina, A. (2018) Cicero predicts cis-regulatory DNA interactions from single-cell chromatin accessibility data, *Mol. Cell*, **71**, 858-871.e858, doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.044.
139. Oczko-Wojciechowska, M., Pfeifer, A., Jarzab, M., Swierniak, M., Rusinek, D., Tyszkiewicz, T., Kowalska, M., Chmielik, E., Zembala-Nozynska, E., Czarniecka, A., et al. (2020) Impact of the tumor microenvironment on the gene expression profile in papillary thyroid cancer, *Pathobiology*, **87**, 143-154, doi: 10.1159/000507223.
140. Pape, J., Magdeldin, T., Stamati, K., Nyga, A., Loizidou, M., Emberton, M., and Cheema, U. (2020) Cancer-associated fibroblasts mediate cancer progression and remodel the tumour stroma, *Br. J. Cancer*, **123**, 1178-1190, doi: 10.1038/s41416-020-0973-9.

141. Liu, J., Li, P., Wang, L., Li, M., Ge, Z., Noordam, L., Lieshout, R., Verstegen, M. M., Ma, B., and Su, J. (2021) Cancer-associated fibroblasts provide a stromal niche for liver cancer organoids that confers trophic effects and therapy resistance, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **11**, 407-431, doi: 10.1016/j.jcmgh.2020.09.003.
142. Moriel, N., Senel, E., Friedman, N., Rajewsky, N., Karaikos, N., and Nitzan, M. (2021) NovoSpaRc: flexible spatial reconstruction of single-cell gene expression with optimal transport, *Nat. Protocols*, **16**, 4177-4200, doi: 10.1038/s41596-021-00573-7.
143. Ren, X., Zhong, G., Zhang, Q., Zhang, L., Sun, Y., and Zhang, Z. (2020) Reconstruction of cell spatial organization from single-cell RNA sequencing data based on ligand-receptor mediated self-assembly, *Cell Res.*, **30**, 763-778, doi: 10.1038/s41422-020-0353-2.
144. Chen, L., and Flies, D. B. (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition, *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, 227-242, doi: 10.1038/nri3405.
145. Ramilowski, J. A., Goldberg, T., Harshbarger, J., Kloppmann, E., Lizio, M., Satagopam, V. P., Itoh, M., Kawaji, H., Carninci, P., Rost, B., and Forrest, A. R. (2015) A draft network of ligand-receptor-mediated multicellular signalling in human, *Nat. Commun.*, **6**, 7866, doi: 10.1038/ncomms8866.
146. Moses, L., and Pachter, L. (2022) Museum of spatial transcriptomics, *Nat. Methods*, **19**, 534-546, doi: 10.1038/s41592-022-01409-2.
147. Hahaut, V., Pavlinic, D., Carbone, W., Schuierer, S., Balmer, P., Quinodoz, M., Renner, M., Roma, G., Cowan, C. S., and Picelli, S. (2022) Fast and highly sensitive full-length single-cell RNA sequencing using FLASH-seq, *Nat. Biotechnol.*, **40**, 1447-1451, doi: 10.1038/s41587-022-01312-3.
148. Cao, J., Cusanovich, D. A., Ramani, V., Aghamirzaie, D., Pliner, H. A., Hill, A. J., Daza, R. M., McFaline-Figueroa, J. L., Packer, J. S., Christiansen, L., et al. (2018) Joint profiling of chromatin accessibility and gene expression in thousands of single cells, *Science*, **361**, 1380-1385, doi: 10.1126/science.aau0730.
149. Chen, S., Lake, B. B., and Zhang, K. (2019) High-throughput sequencing of the transcriptome and chromatin accessibility in the same cell, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 1452-1457, doi: 10.1038/s41587-019-0290-0.
150. Zachariadis, V., Cheng, H., Andrews, N., and Enge, M. (2020) A highly scalable method for joint whole-genome sequencing and gene-expression profiling of single cells, *Mol Cell*, **80**, 541-553.e545, doi: 10.1016/j.molcel.2020.09.025.

OPPORTUNITIES OF COMPLEX ANALYSIS IN SINGLE-CELL RNA SEQUENCING

Review

**A. A. Khozyainova^{1*}, A. A. Valyaeva², M. S. Arbatsky², S. V. Isaev^{3,4},
P. S. Iamshchikov^{1,5}, E. V. Volchikov⁶, M. S. Sabirov⁷, V. R. Zainullina¹, V. I. Chechekhin²,
R. S. Vorobev¹, M. E. Menyailo¹, P. A. Tyurin-Kuzmin², and E. V. Denisov¹**

¹ Cancer Research Institute Tomsk NRMC,
634050 Tomsk, Russia; e-mail: khozyainova@onco.tnmc.ru

² Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Research Institute of Personalized Medicine,
National Center for Personalized Medicine of Endocrine Diseases,
The National Medical Research Center for Endocrinology, 117036 Moscow, Russia

⁴ Phystech School of Biological and Medical Physics,
Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
115184 Dolgoprudny, Russia

⁵ National Research Tomsk State University, 634050 Tomsk, Russia

⁶ Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
117198 Moscow, Russia

⁷ Koltzov Institute of Developmental Biology, 119334 Moscow, Russia

Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) is a revolutionary tool for studying the physiology of normal and pathologically altered tissues. This approach provides information about the molecular features (gene expression, mutations, chromatin accessibility, etc.) of cells, opens up the possibility to analyze cell differentiation trajectories/phylogeny and cell-cell interactions and allows discovering new cell types and previously unexplored processes. From a clinical point of view, scRNA-seq allows a deeper and more detailed analysis of the molecular mechanisms of various diseases and serves as the basis for the development of new

preventive, diagnostic and therapeutic solutions. This review describes the different approaches to analysis of scRNA-seq data, reviews the strengths and weaknesses of bioinformatic tools, provides recommendations and examples of their successful use and suggests potential directions for improvement. It also emphasizes the need to create new, including multi-omics, protocols for the preparation of DNA/RNA libraries of single cells in order to obtain a more complete and systematic understanding of each cell.

Keywords: single-cell RNA sequencing, cell cycle, clustering, differential expression, cell type, trajectory inference, cell–cell interaction, gene regulatory network, copy number variation, single nucleotide variant, phylogenetics, epigenomics, spatial transcriptomics

рН-ЗАВИСИМЫЕ РЕДОКС-СВОЙСТВА ГАЛЛАТА ЭПИГАЛЛОКАТЕХИНА (EGCG) И ЕГО ДЕЙСТВИЕ НА ДЫХАНИЕ, ФОТОСИНТЕЗ И ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ГОРОХА

© 2023 Д.Б. Киселевский^{1*}, О.В. Самуилова², В.Д. Самуилов¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра иммунологии,
119234 Москва, Россия; электронная почта: dkiselevs@mail.ru

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Институт биодизайна и моделирования сложных систем, кафедра биологической химии,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.11.2022

После доработки 12.01.2023

Принята к публикации 13.01.2023

Исследованы редокс-свойства компонента зеленого чая галлата эпигаллокатехина (EGCG) *in vitro*, и испытано его действие на клетки растений (гороха). EGCG проявлял свойства как про-, так и антиоксиданта. В растворах EGCG окислялся кислородом при физиологических (слабощелочных) значениях pH. Снижение pH замедляло этот процесс. Окисление EGCG сопровождалось образованием O_2^- и H_2O_2 . С другой стороны, EGCG функционировал в качестве донора электронов для пероксидазы и в комбинации с ней утилизировал H_2O_2 . При воздействии на клетки гороха (высечки листьев или эпидермис) EGCG подавлял дыхание, снижал трансмембранную разность электрических потенциалов в митохондриях и ингибировал транспорт электронов в фотосинтетической электронтранспортной цепи. Из участков фотосинтетической редокс-цепи фотосистема II обладала наименьшей чувствительностью к действию EGCG. EGCG снижал скорость образования активных форм кислорода в эпидермисе, которое вызывали обработкой NADH и определяли с помощью диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцина. *In vivo* EGCG в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ подавлял KCN-индуцированную гибель устьичных клеток в эпидермисе, которую регистрировали по разрушению клеточных ядер. В концентрации 10 мМ EGCG вызывал нарушение барьерной функции плазматической мембраны устьичных клеток, увеличивая ее проницаемость для йодида пропидия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: EGCG, пероксидаза, активные формы кислорода, гибель клеток, горох.

DOI: 10.31857/S0320972523020021, **EDN:** QFUCIO

ВВЕДЕНИЕ

Галлат эпигаллокатехина или эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) — соединение из группы катехинов, относящихся к флавоноидам (полифенолам растений). О структуре и свойствах катехинов и EGCG см. обзор М. Farhan [1]. Высушенные чайные листья — основной источник катехинов и EGCG. Листья зеленого чая содержат наибольшее количество EGCG. В заваренном зеленом чае его 20–30 мг на 100 мл (около 0,5 мМ).

Выявлено профилактическое действие зеленого чая на онкологические заболевания. Исследование, проведенное в Японии, показало, что риск возникновения рака уменьшался у лиц, употребляющих более 10 чашек чая в день, особенно у женщин [2]. Этот эффект зеленого чая считают обусловленным EGCG, противоопухолевое действие которого наблюдалось в разных типах опухолей [3, 4].

EGCG обладает разнообразной активностью на молекулярном и клеточном уровнях. Он проявлял свойства антиоксиданта сам

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ПКС — программируемая клеточная смерть; ТМФД — N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин; ЭТЦ — электронтранспортная цепь; Amplex Red — N-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин; DCF — 2',7'-дихлорфлуоресцеин; DCFH-DA — диацетат 2',7'-дихлорфлуоресцина; EGCG — галлат эпигаллокатехина; PI — йодид пропидия; TMRE — этиловый эфир тетраметилродамина; $\Delta\psi$ — трансмембранная разность электрических потенциалов.

* Адресат для корреспонденции.

по себе или в результате активации в клетках ферментов антиоксидантной защиты [3, 5, 6]. Идентифицировано много белков, чувствительных к EGCG. Среди них есть ферменты, которые связаны с развитием опухолей и регулируют: 1) клеточный цикл (циклины, циклин-зависимые и другие регуляторные протеинкиназы, транскрипционные факторы), 2) апоптоз (белки семейства Bcl-2, каспазы, Araf-1, XIAP) и 3) воспаление (цитокины, NO-синтаза). Некоторые белки непосредственно взаимодействуют с EGCG [3, 7]. Так, EGCG напрямую связывается с N-концевым участком опухолевого супрессора p53, препятствуя его контакту с E3-убиквитинлигазой MDM2 и последующему убиквитинированию и деградации p53 [8].

Выявлен терапевтический эффект EGCG в отношении ряда инфекционных заболеваний, вызванных вирусами. Механизмы противовирусного действия EGCG различаются в зависимости от инфекционного агента, но в ряде случаев его мишенью является вирусная оболочка. Антибактериальный эффект EGCG проявляет сам по себе или в сочетании с различными антибиотиками [9]. Имеются сведения об эффективности EGCG против патогенных грибов. У дрожжей и грамотрицательных бактерий EGCG нарушает метаболизм фолиевой кислоты, имитируя действие сульфаниламидов и триметоприма [9]. EGCG обладал противовирусным действием в отношении SARS-CoV-2 (возбудителя COVID-19). Молекулярное моделирование предполагает взаимодействие EGCG с рецептор-связывающим доменом (RBD) S-белка вируса, которое нарушает его связывание с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) на поверхности клеток [10].

У растений флавоноиды, к которым относится EGCG, известны как регуляторы процессов онтогенеза, репродукции, гибели клеток, взаимодействия с симбиотическими микроорганизмами [11]. Они принимают участие в защите растений от патогенов, предохраняют клетки от ультрафиолетового излучения [12]. Однако о белках, с которыми взаимодействуют флавоноиды в клетках растений, известно мало. Сведения о действии EGCG на клетки растений немногочисленны. Есть данные о том, что EGCG повышает устойчивость растений к инфицированию путем активации сигнального пути жасминовой кислоты, обеспечивающего защиту от некротрофных патогенов [13].

EGCG окисляется в растворе с нейтральным или щелочным значениями pH. Его окисление сопровождается образованием активных форм кислорода (АФК) [14]. Таким образом,

это соединение проявляет свойства как антиоксиданта, так и прооксиданта.

Цель работы — исследовать окислительно-восстановительные свойства EGCG *in vitro*, определить, как влияет на них pH и среда инкубации. Учитывая полученные результаты, испытать эффект EGCG на клетки листьев гороха, включая функции, связанные с энергетическим обменом (дыхание, генерацию трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в митохондриях и фотосинтез), образование АФК и программируемую клеточную смерть (ПКС). Про- или антиоксидантные свойства EGCG будут преобладать при его воздействии на клетки растений?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оксиметрия, дыхание и фотосинтез. Содержание O_2 в растворе регистрировали в полярографической ячейке объемом 1,5 мл при помощи закрытого платинового электрода, подключенного к аналого-цифровому преобразователю Record4 (Пушино, Россия), с использованием сопутствующего программного обеспечения. Определяли поглощение O_2 при дыхании и фотосинтетическое выделение O_2 . Состав среды инкубации и добавляемые реагенты представлены в подписях к рисункам.

Образование H_2O_2 . Содержание H_2O_2 в растворе измеряли методом флуориметрии с применением N-ацетил-3,7-дигидроксибензоказина (Amplex Red). Реакция нефлуоресцирующего Amplex Red с H_2O_2 катализируется пероксидазой и ведет к образованию флуоресцирующего резорфина [15, 16]. Использовали пластиковую кювету с 2 мл среды инкубации. Флуоресценцию резорфина детектировали с помощью флуориметра VersaFluor («Bio-Rad», США), возбуждая ее при 505–515 нм и регистрируя при 585–595 нм.

Объект исследования. Проростки гороха (*Pisum sativum* L. сорт Альфа) выращивали 9–17 сут. при периодическом освещении (свет — 16 ч, темнота — 8 ч) металлогалогеновой лампой ДРиЗ, 250 Вт, с интенсивностью света $\sim 100 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Интенсивность света измеряли сенсором Quantitherm PAR/Temp («Hansatech», Великобритания). Высечки листьев получали с помощью пластиковой трубки. Пленки эпидермиса отделяли от нижней поверхности листьев пинцетом.

$\Delta\psi$ в митохондриях клеток оценивали по накоплению в них флуоресцирующего проникающего через мембраны катиона этилового эфира тетраметилродамина (TMRE). Изобра-

жения клеток получали с помощью микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония), пользуясь программным обеспечением NIS-Elements. Флуоресценцию TMRE возбуждали светом лазера 532 нм и регистрировали при 570–620 нм.

Активные формы кислорода. АФК в клетках гороха определяли по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF), образующегося из нефлуоресцирующего диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCFH-DA). В клетках DCFH-DA окисляется АФК, превращаясь во флуоресцирующий DCF. В образование DCF могут быть вовлечены ионы металлов переменной валентности и цитохром *c*, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [17, 18]. Пленку эпидермиса, закрепленную на пластиковой пластинке с помощью силиконового геля, помещали в кювету с 2 мл среды инкубации. В кювету последовательно добавляли DCFH-DA и другие реагенты. Флуоресценцию DCF измеряли с помощью флуориметра VersaFluor («Bio-Rad»), возбуждая ее светом 485–495 нм и регистрируя при 515–525 нм.

Инкубация клеток с реагентами. Для определения действия химических соединений на состояние клеток пленки эпидермиса помещали в ячейки в полистирольных планшетах с 2 мл бидистиллированной воды, добавляли реагенты и инкубировали. Контроль – без добавок реагентов. Условия инкубации представлены в подписях к рисункам.

Мертвые клетки. Гибель клеток гороха регистрировали по разрушению клеточных ядер [19]. После инкубации эпидермис 5 мин обрабатывали фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5/5/1/1), промывали в этиловом спирте и воде в течение 10 и 5 мин соответственно, затем окрашивали ядерным красителем гематоксилином Карацци в течение 1 ч. Окрашенные пленки эпидермиса промывали водой и исследовали на световом микроскопе Primo Star («Carl Zeiss», Германия). Для каждого варианта опыта определяли долю клеток с разрушенными ядрами и лишенных ядер.

Целостность клеточной мембраны. Проницаемость плазматической мембраны клеток выявляли с помощью флуоресцирующего красителя йодида пропидия (PI), связывающегося с ДНК клеточных ядер и не проникающего через неповрежденную мембрану [20]. После инкубации пленки эпидермиса окрашивали (2 мкМ PI) в течение 20 мин и исследовали с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss»). Флуоресцен-

цию PI возбуждали светом 525–565 нм и регистрировали при 575–640 нм. Подсчитывали долю клеток, в ядрах которых флуоресцирует PI, т.е. с проницаемой для PI плазматической мембраной.

Статистика. Для определения количества клеток с разрушенными ядрами или с проницаемой для PI клеточной мембраной в каждом варианте опыта исследовали 300–600 клеток в 2–3 пленках эпидермиса. Эксперименты повторяли 2–3 раза. Приводятся результаты типичных экспериментов. На диаграммах отмечены средние значения $\pm$ 95%-ные доверительные интервалы (уровень значимости $\alpha = 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие EGCG *in vitro*. EGCG окислялся в буферном растворе с pH 7,8 (рис. 1, *а*). Поглощение O_2 , регистрируемое с помощью оксиметра, прекращалось при изменении pH раствора до 7,0 добавкой соляной кислоты и возобновлялось при последующем добавлении щелочи до значения pH 7,8. Скорость окисления EGCG зависела от pH среды инкубации, возрастая при слабощелочных и снижаясь при слабокислых значениях pH (рис. 1, *б*).

Добавка каталазы в процессе окисления EGCG (pH 7,8) вызывала выделение O_2 , свидетельствуя об образовании H_2O_2 (рис. 2, *а*). O_2 выделялся также при последующем внесении H_2O_2 в среду инкубации. Пероксидаза хрена, добавленная перед каталазой, предотвращала выделение O_2 (рис. 2, *б*). Супероксиддисмутаза снижала скорость поглощения O_2 (рис. 2, *в*). Это, по-видимому, обусловлено выделением O_2 в супероксиддисмутазной реакции и свидетельствует об образовании супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot -}$) при окислении EGCG. Инкубация H_2O_2 с пероксидазой без EGCG не отменяла выделения O_2 при добавке каталазы (рис. 2, *г*; сравнить с 2, *б*).

H_2O_2 детектировали с помощью Amplex Red при pH 6,0, когда окисление EGCG подавляется (рис. 1, *б*). H_2O_2 в комбинации с пероксидазой и Amplex Red вызывал образование флуоресцирующего резорубина (рис. 3, *а*). Генерацию H_2O_2 наблюдали после добавок пероксидазы и NADH независимо от их последовательности (рис. 3, *б* и *в*) в результате пероксидазно-оксидазных реакций, сопровождающихся образованием АФК ($O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2) [21–24]. Каталаза подавляла продукцию H_2O_2 (рис. 3, *б*). EGCG в микромолярных концентрациях снижал скорость образования H_2O_2 (рис. 3, *в*).

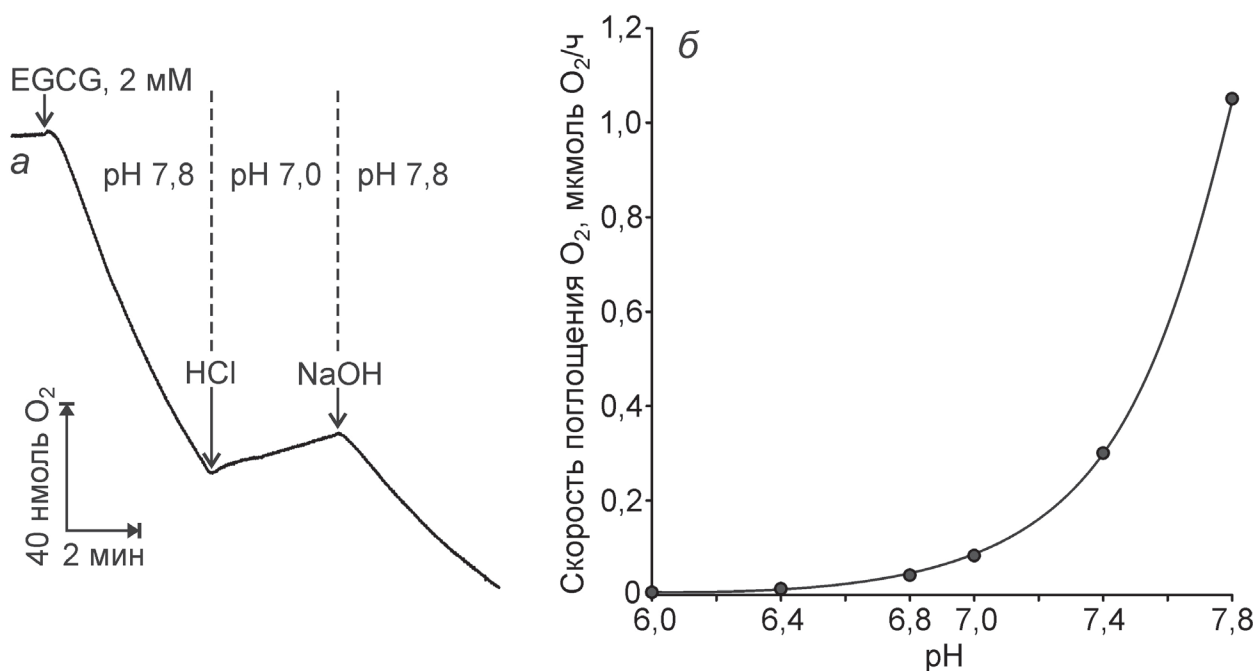


Рис. 1. Окисление EGCG в среде инкубации (а), зависимость скорости его окисления от pH среды инкубации (б). Среда инкубации — буфер 50 мМ Tricine—KOH (pH 7,8) с 35 мМ NaCl и 1 мМ $MgCl_2$ (а) или буфер 50 мМ KH_2PO_4 —NaOH (pH 6—7,8) с 1 мМ $MgCl_2$ (б). pH среды изменяли добавкой HCl или NaOH (а). Добавки: 2 мМ EGCG, HCl, NaOH

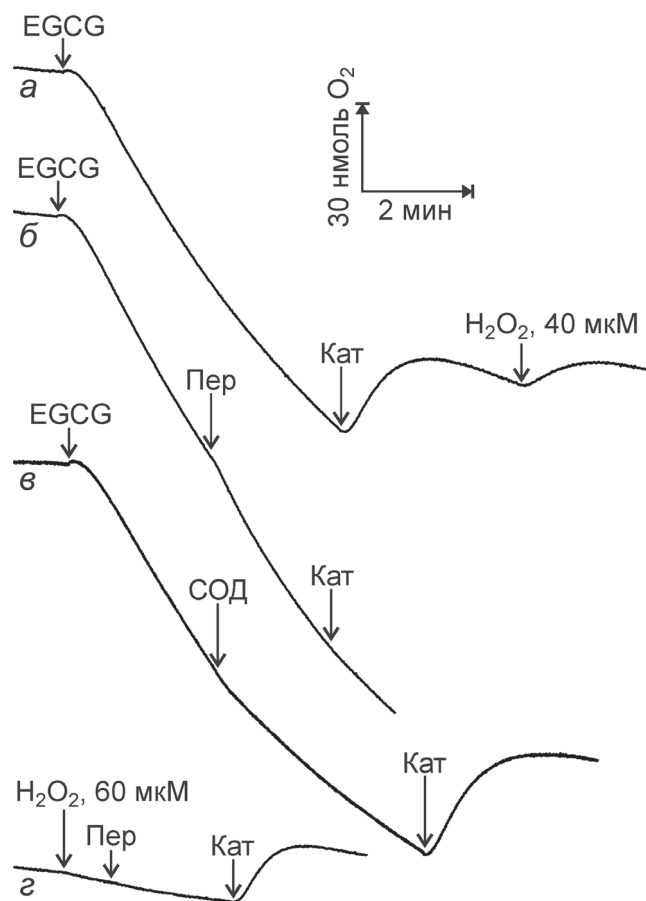


Рис. 2. Действие каталазы (Кат), H_2O_2 , пероксидазы хрена (Пер) и супероксиддисмутазы (СОД) на окисление EGCG. Среда инкубации — буфер 50 мМ Tricine—KOH (pH 7,8) с 35 мМ NaCl и 1 мМ $MgCl_2$. Добавки: 2 мМ EGCG, 40 ед. активности/мл Кат, H_2O_2 , 20 ед. активности/мл Пер, 60 ед. активности/мл СОД

Даже в среде инкубации с pH 7,8, где происходит окисление EGCG (рис. 1), EGCG в комбинации с пероксидазой подавлял генерацию H_2O_2 (рис. 3, з). В растворе с pH 7,8 продукция H_2O_2 была выше, а эффективность EGCG — меньше, чем при pH 6,0. EGCG в концентрации 2 мМ тоже предотвращал образование H_2O_2 (при pH 6,0 и 7,8, данные не представлены).

Полученные результаты показывают, что EGCG не только окисляется в слабощелочном растворе с поглощением O_2 (рис. 1), но и генерирует H_2O_2 (рис. 2, а). Это соответствует данным литературы: EGCG восстанавливает O_2 до $O_2^{\cdot -}$, приводя к накоплению H_2O_2 . При окислении из EGCG формируются его димеры (теасинензины А и D), которые нестабильны и впоследствии образуют ряд других химических соединений, некоторые из них обладают цитотоксичностью [14]. При этом EGCG функционирует в качестве субстрата пероксидазы (рис. 2, б и в). В комбинации с пероксидазой EGCG утилизирует H_2O_2 , образующийся в результате автоокисления (рис. 2) или пероксидазно-оксидантных реакций с NADH (рис. 3). Таким образом, в зависимости от условий (pH, пероксидазная активность) EGCG может действовать как про- или антиоксидант.

Следует отметить, что диапазон значений pH, в котором меняется скорость окисления EGCG (рис. 1, б), близок к физиологическому. Так, в митохондриях клеточной линии эндотелия человека ECV304 были измерены

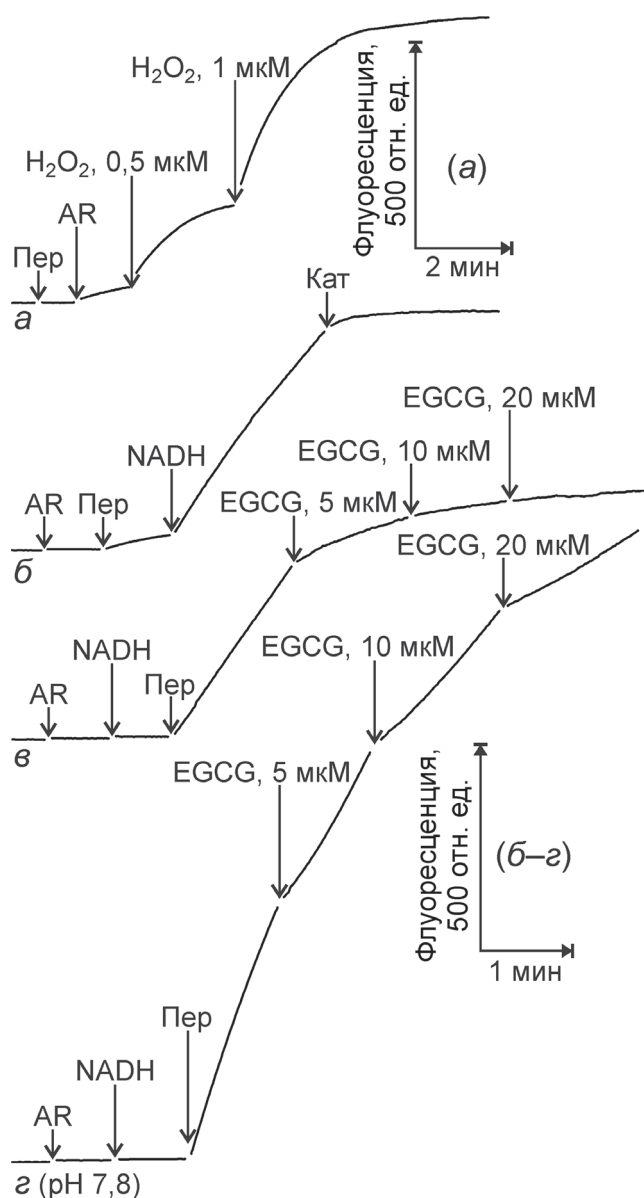


Рис. 3. Действие EGCG на скорость образования флуоресцирующего резорфина при окислении нефлуоресцирующего Amplex Red (AR) пероксидазой хрена (Пер). Среда инкубации – буфер 50 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--NaOH}$ (pH 6,0) с 1 мМ MgCl_2 (а–б) или буфер 50 мМ Tricine–KOH (pH 7,8) с 35 мМ NaCl и 1 мМ MgCl_2 (в). Добавки: 0,1 ед. активности/мл Пер; 5 мМ H_2O_2 ; 0,1 мМ NADH; 40 ед. активности/мл каталазы (Кат); EGCG

значения pH с помощью pH-чувствительного флуоресцирующего белка, введенного в разные компартменты клетки. Они составили: в цитоплазме – 7,6; в матриксе митохондрий – 7,8; в митохондриальном межмембранном пространстве – 6,9 [25]. В разных компартментах клетки скорости окисления EGCG и ассоциированной с этим продукции H_2O_2 должны различаться.

Эффекты EGCG *in vivo*. Испытано действие EGCG на клетки в листьях гороха. В концентрации 0,1–10 мМ он уменьшал скорость

дыхания в высечках листьев гороха (рис. 4), которое определяли оксиметрически по поглощению O_2 . Эксперимент проводили в среде с pH 6,0, когда окисление EGCG тормозится (рис. 1, б).

Данные литературы о действии EGCG на митохондрии противоречивы. В митохондриях, изолированных из печени крыс, наблюдали связывание EGCG с комплексами дыхательной электротранспортной цепи (ЭТЦ). При этом EGCG в концентрации до 0,1 мМ снижал их активность, особенно комплексов II и III (но не более чем на 30%). Действие EGCG усиливалось при индукции Ca^{2+} -зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий, а ее ингибитор циклоспорин А предотвращал этот эффект. По-видимому, липидная мембрана ограничивала проникновение EGCG в митохондрии [26].

Напротив, EGCG восстанавливал активность комплексов I, II и IV дыхательной ЭТЦ, нарушенную цисплатиной в клетках почек мышей. Это объясняют его антиоксидантным действием [27]. EGCG в концентрации 10 мМ ускорял дыхание и повышал активность цитохром *c*-оксидазы в нейронах и астроцитах человека [28]. В клетках костной ткани человека EGCG стимулировал дыхание [29].

Эффект EGCG на дыхание может быть обусловлен подавлением гликолиза. По данным литературы, EGCG снижает активность

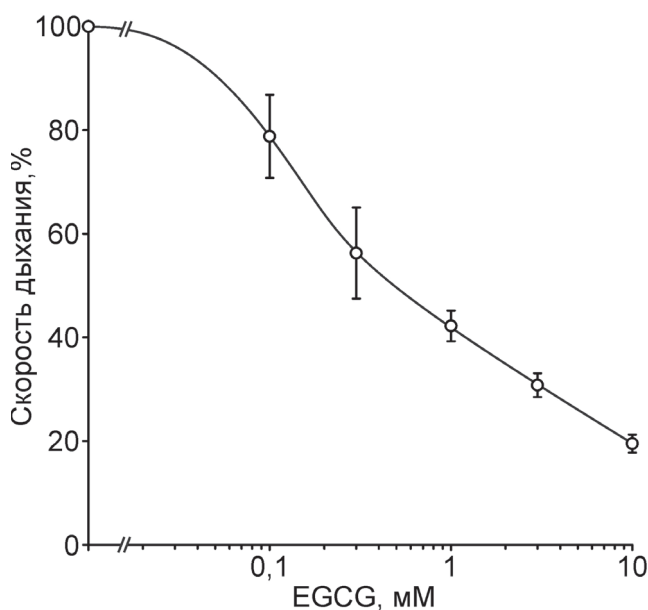


Рис. 4. Действие EGCG на дыхание в высечках листьев (ВЛ) гороха. Среда инкубации – буфер 50 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--NaOH}$ (pH 6,0) с 1 мМ MgCl_2 . За 100% принята исходная скорость дыхания ВЛ (без добавок), она составляла 70 ± 15 мкмоль $\text{O}_2/\text{ч}$ на 1 г сырой массы

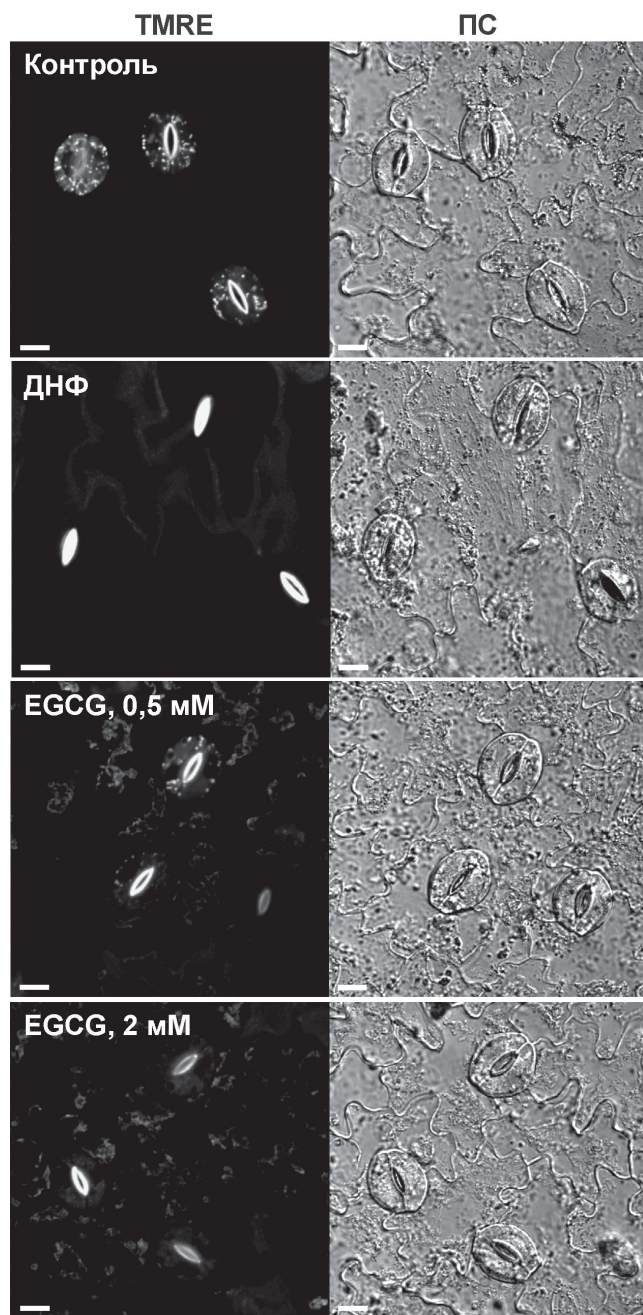


Рис. 5. Действие 2,4-динитрофенола (ДНФ) и EGCG на накопление TMRE в митохондриях устьичных клеток в эпидермисе листьев гороха. Пленки эпидермиса в дистиллированной воде без добавок (контроль), с 0,5 мМ ДНФ или EGCG окрашивали 0,5 мкМ TMRE 30 мин. Масштабная линейка — 10 мкм. Обозначения: TMRE — флуоресценция TMRE, ПС — изображение в проходящем свете

фосфоглицератмутаза [30]. Причем EGCG идентифицирован как наиболее эффективный из известных ингибиторов фосфоглицератмутаза *in vitro* — IC_{50} около 0,5 мкМ. *In vivo* его действующие концентрации возрастали на 2–3 порядка, вероятно, из-за низкой проницаемости мембран для EGCG [30]. EGCG лучше растворяется в DMSO и этаноле, чем

в воде. В клетках EGCG распределен следующим образом: в цитоплазме его 85% (поэтому немембранные ферменты гликолиза для него доступны), в плазматической мембране — около 2%, а остальное — во фракции внутриклеточных мембран [31].

На рис. 5 изображены замыкающие клетки устьиц (устьичные клетки) в эпидермисе, изолированном из листа гороха. Они окружены основными клетками эпидермиса (см. изображение в проходящем свете). Эпидермис инкубировали с флуоресцирующим TMRE, который аккумулируется в митохондриях устьичных клеток (митохондрии эпидермальных клеток не видны, так как они находятся в другой фокальной плоскости). Протонофорный разобщитель 2,4-динитрофенол препятствовал накоплению TMRE в митохондриях. Сходным эффектом обладал EGCG в концентрации 2 мМ. Обработка 0,5 мМ EGCG подавляла накопление TMRE в митохондриях устьичных клеток лишь частично (рис. 5).

Прекращение аккумуляции TMRE в митохондриях, вызванное EGCG (рис. 5), может быть связано с торможением дыхания (рис. 4). Альтернативное объяснение — EGCG, подобно 2,4-динитрофенолу, проявляет свойства разобщителя. Показано, что EGCG может разобщать окислительное фосфорилирование в митохондриях гепатоцитов крысы [32]. Полифенолы, к которым относится и EGCG, обладают свойствами слабых протонофорных разобщителей [33].

Исследовали действие EGCG на фотосинтетический транспорт электронов в высечках листьев гороха в среде инкубации с pH 6,0. В темноте происходит поглощение O_2 в результате дыхания (рис. 6). Феррицианид и *n*-бензохинон — акцепторы электронов. *n*-Бензохинон проходит через липидные мембраны, восстанавливая феррицианид снаружи клетки и окисляя в хлоропластах пластохинон, а также редокс-центры фотосистемы II и b_6f -цитохромного комплекса, которые восстанавливают пластохинон. После включения света на фоне добавленных акцепторов электронов происходит выделение O_2 , которое подавляется добавкой 1 мМ EGCG (рис. 6, а). Последующее добавление EGCG в концентрации 2 мМ полностью прекращает фотосинтетическое выделение O_2 . После этого выключение света не оказывает эффекта.

На рис. 6, б на свету осуществляется транспорт электронов от H_2O (с выделением кислорода) через редокс-центры фотосистемы II на кремнемолибдат. Диурон, ингибитор переноса электронов с Q_A на Q_B , лишь частично

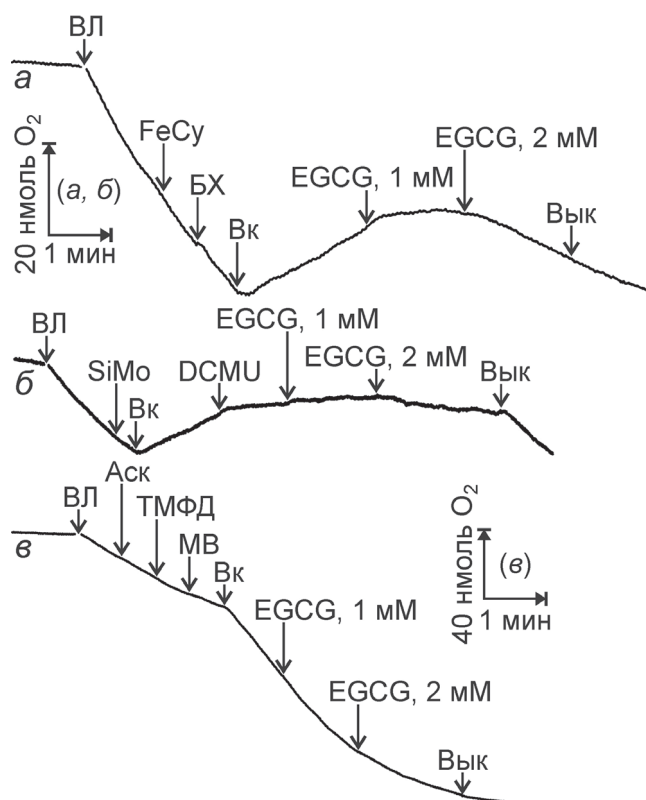


Рис. 6. Действие EGCG на выделение O_2 при переносе электронов от H_2O на n -бензохинон (БХ) и феррицианид (FeCu) (а) или на кремнемолибдат (SiMo) в фотосистеме II (б) и на поглощение O_2 при переносе электронов от аскорбата (Аск) и N,N,N',N'-тетраметил- n -фенилендиамин (ТМФД) на метилвиологен (МВ) в фотосистеме I (в) в высечках листьев (ВЛ) гороха на свету. Среда инкубации — буфер 50 мМ KH_2PO_4 —NaOH (pH 6,0) с 1 мМ $MgCl_2$. Добавки: 20 мМ ВЛ; 1 мМ FeCu; 0,1 мМ БХ; EGCG; 0,2 мМ SiMo; 10 мМ диурина (DCMU); 1 мМ Аск; 0,1 мМ ТМФД; 1 мМ МВ. Вк и Вык — включение и выключение света

подавляет выделение O_2 , поскольку кремнемолибдат восстанавливается преимущественно Q_A [34]. На этом участке ЭТЦ хлоропластов EGCG менее эффективен, транспорт электронов ингибируется не полностью: 1 мМ EGCG не оказывает эффекта; добавка еще 2 мМ EGCG меняет медленное выделение O_2 на его медленное поглощение; выключение света значительно ускоряет поглощение O_2 (рис. 6, б).

На рис. 6, в освещение включает следующий путь переноса электронов: аскорбат → N,N,N',N'-тетраметил- n -фенилендиамин (ТМФД, $E_0' = 0,26$ В) → P700 ($E_0' = 0,45$ В) → редокс-центры фотосистемы I → Fe_4S_4 -центр F_B → метилвиологен → O_2 . ТМФД может также восстанавливать пластоцианин ($E_0' = 0,37$ В), но не взаимодействует с b_6f -цитохромным комплексом [35, 36]. Кислород расходуется на образование O_2^- , поэтому включение света усиливает его поглощение. Эффект

EGCG в концентрации 1 мМ незначителен. Последующая добавка 2 мМ EGCG ингибирует поглощение кислорода (рис. 6, в).

Полученные результаты (рис. 6) демонстрируют, что EGCG подавляет перенос электронов в фотосинтетической ЭТЦ хлоропластов. В мировой научной литературе нет сведений о его действии на фотосинтез у растений, однако показано, что EGCG ингибирует реакции фотосинтеза у цианобактерии *Microcystis aeruginosa* [37]. Эффективность EGCG менялась в зависимости от задействованных участков ЭТЦ: фотосистема II → пул пластохинона → b_6f -цитохромный комплекс (n -бензохинон) > фотосистема I (ТМФД и метилвиологен) > фотосистема II (кремнемолибдат).

Величины E_0' допускают, что EGCG с E_0' 0,1–0,15 В [38] может восстанавливать FeS-белок Риске (0,3–0,32 В) и цитохром f (0,35–0,38 В) в b_6f -цитохромном комплексе [39] и окислять FeS-центры (от –0,7 до –0,55 В) фотосистемы I. Менее вероятно восстановление им хлоропластного пластохинона (от –0,13 до 0,1 В), особенно хинонов в фотосистеме II: Q_A (–0,13 В) и Q_B (–0,01 В). Возможно, ингибирующее действие EGCG на фотосинтез обусловлено редокс-реакциями с компонентами фотосинтетической ЭТЦ. Это предположение согласуется с полученными результатами: большей эффективностью EGCG в подавлении переноса электронов в b_6f -цитохромном комплексе и фотосистеме I и меньшим эффектом — в отношении фотосистемы II (рис. 6).

В эпидермисе из листьев гороха определяли содержание АФК по флуоресценции DCF, образующегося из нефлуоресцирующего DCFH-DA. Добавка NADH вызывала образование АФК, усиливая выход флуоресценции DCF (рис. 7). Эта генерация АФК, очевидно, обусловлена пероксидазно-оксидазной активностью в апопласте, поскольку клеточная мембрана непроницаема для NADH. Антиоксидант пропилгаллат и KCN, ингибитор гемовых ферментов (в том числе пероксидаз), снижали выход флуоресценции (рис. 7, а). EGCG проявлял антиоксидантные свойства: в концентрации 20 мМ EGCG снижал скорость образования DCF на 30%, а при добавке 2 мМ — на 70% (рис. 7, б).

KCN, индуктор ПКС, вызывал гибель устьичных клеток гороха, которую регистрировали по разрушению клеточных ядер (рис. 8, а). На свету KCN действовал эффективнее, чем в темноте — хлоропласты вносят вклад в ПКС у растений [19]. EGCG в концентрации 1 мМ не влиял на разрушение ядер устьичных клеток. EGCG в концентрации от 10 мМ

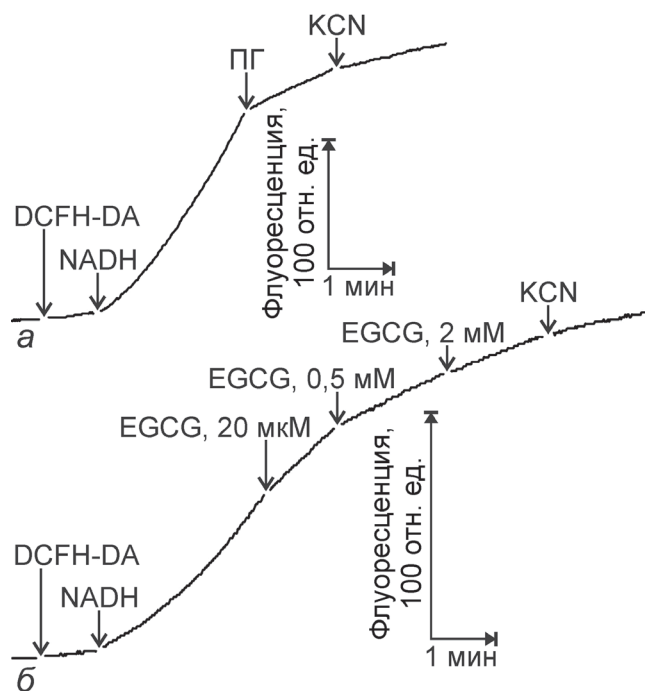


Рис. 7. Действие EGCG на скорость образования флуоресцирующего DCF из нефлуоресцирующего DCFH-DA в пленке эпидермиса из листа гороха. Пленку эпидермиса помещали в кювету со средой инкубации – буфер 50 мМ KH_2PO_4 –NaOH (pH 6,0) с 1 мМ MgCl_2 . Добавки: 20 мкМ DCFH-DA; 1 мМ NADH; 0,5 мМ пропилгаллата (ПГ); 2,5 мМ KCN; EGCG

до 10 мМ снижал KCN-индуцированное разрушение ядер в темноте и на свету (рис. 8, а). Этот эффект EGCG вряд ли можно объяснить его действием на пероксидазу или на дыхание и фотосинтез, поскольку KCN сам по себе является эффективным ингибитором пероксидазы, а также дыхания и фотосинтеза. Однако гибель устьичных клеток, вызванная обработкой KCN, чувствительна к антиоксидантам [19], а EGCG может обладать антиоксидантной активностью не только в сочетании с пероксидазой, но и за счет остатков галловой кислоты в своем составе [24].

Подавление разрушения ядер устьичных клеток, вызванное KCN, может происходить в результате переключения типа клеточной гибели с ПКС на непрототипируемый некроз, например, при использовании детергентов или увеличения концентрации индукторов ПКС [40]. Поэтому было испытано действие EGCG на барьерную функцию плазматической мембраны. EGCG в концентрации 0,5–3 мМ не оказывал эффекта, а в концентрации 10 мМ увеличивал проницаемость плазматической мембраны для PI (рис. 8, б). Таким образом, снижение CN^- -индуцированного разрушения ядер в результате обработки

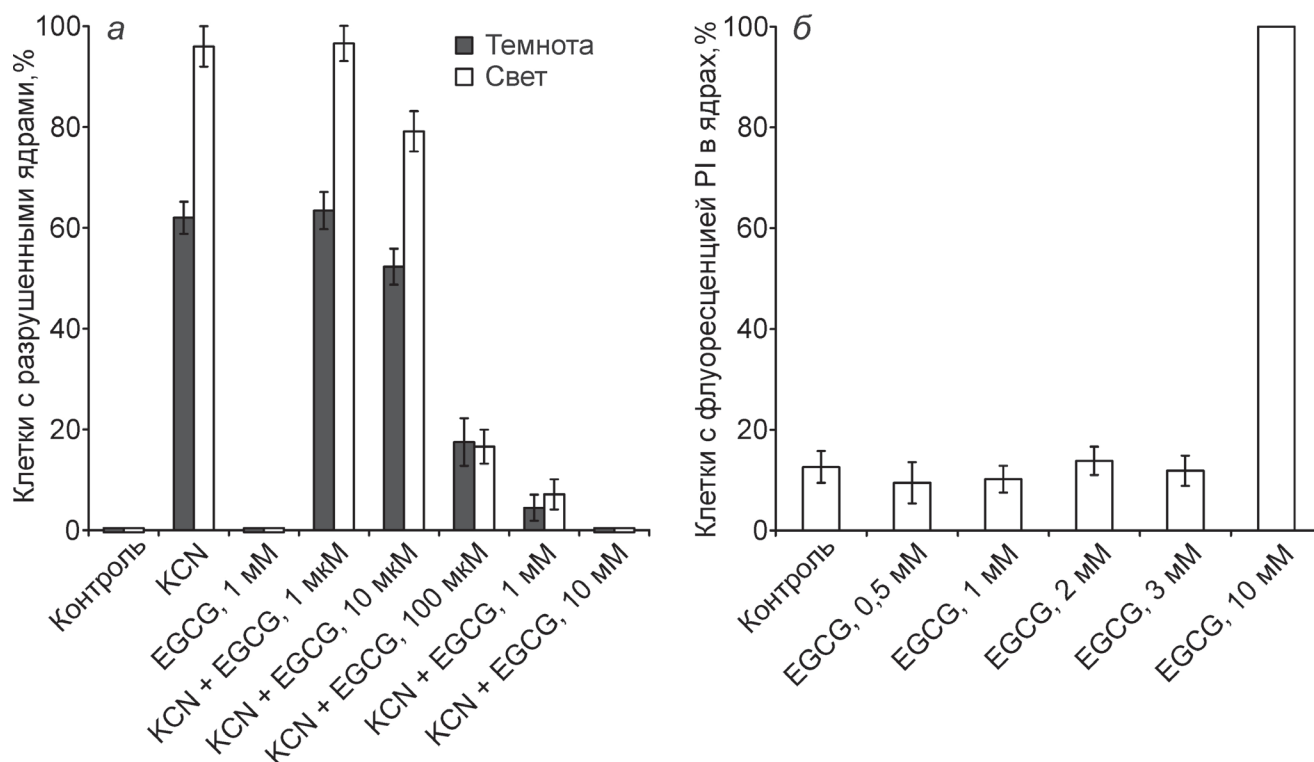


Рис. 8. Действие EGCG на KCN-индуцированное разрушение ядер (а) и проницаемость для PI плазматической мембраны (б) устьичных клеток в пленках эпидермиса из листьев гороха. а – К пленкам эпидермиса добавляли 2,5 мМ KCN и EGCG; инкубировали 20 ч в темноте или на свету; окрашивали гематоксилином и определяли количество клеток с разрушенными ядрами. б – К пленкам эпидермиса добавляли EGCG; инкубировали 2 ч в темноте; окрашивали PI и определяли количество клеток с флуоресценцией PI в клеточных ядрах

EGCG (рис. 8, а) может быть связано с повреждением плазматической мембраны клеток лишь при высокой его концентрации (10 мМ), но не в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ.

Повреждение клеточной мембраны, диссипацию $\Delta\psi$ в митохондриях, подавление дыхания и фотосинтеза можно объяснить прооксидантным действием EGCG. Внутри клеток, при слабощелочных pH, EGCG окисляется с образованием H_2O_2 . Наиболее высокую скорость окисления EGCG следует ожидать в строме хлоропластов на свету, где pH достигает значения 8,0 [41], а также в матриксе митохондрий – pH 7,8 [25]. H_2O_2 способен изменять физико-химические свойства клеточных мембран, вызывать деполяризацию митохондриальной мембраны, приводить к перекисному окислению липидов и нарушению мембранного барьера проницаемости [42–44].

В целом, исследованы редокс-свойства EGCG в растворе и его действие на клетки растений. EGCG *in vitro* окислялся кислородом при физиологических значениях pH. Снижение pH замедляло его окисление. Окисление EGCG сопровождалось образованием O_2^- и H_2O_2 . Вместе с тем EGCG функционировал в качестве донора электронов для пероксидазы, утилизируя H_2O_2 в комбинации с пероксидазой. В работе впервые исследовано действие EGCG на энергообмен и гибель клеток растений. В клетках гороха EGCG в концентрациях 0,5–3 мМ подавлял дыхание, снижал $\Delta\psi$ в митохондриях и ингибировал транспорт электронов в фотосинтетической ЭТЦ. EGCG уменьшал образование АФК, вызванное добавкой к клеткам NADH. В концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ EGCG препятствовал ПКС, вызванной обработкой клеток KCN. В более высоких концентрациях (10 мМ) EGCG индуцировал проницаемость плазматической мембраны клеток для PI. В целом, несмотря на прооксидантные свойства EGCG, в концентрациях до 1 мМ вклю-

чительно проявляется его цитопротекторное действие.

Данные показывают, что при воздействии EGCG на клетки растений преобладает его антиоксидантный эффект. Сходное действие EGCG отмечается в большинстве исследований на животных моделях. Это соединение обладает интересными свойствами, включающими его анти- и прооксидантную активность. Предположительно, EGCG окисляется в различных клеточных компартментах с разной скоростью, зависящей от величины pH. EGCG может быть перспективным для использования в биологических исследованиях и защите растений, однако следует учитывать его ингибирующее действие на дыхание и фотосинтез, а также ограничение в использовании высоких концентраций, при которых повреждается клеточная мембрана.

Вклад авторов. В.Д. Самуилов – концепция и руководство работой, редактирование текста статьи; О.В. Самуилова – обсуждение и редактирование текста статьи; Д.Б. Киселевский – проведение экспериментов и написание текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121042600047-9, а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». В работе использовали оборудование, приобретенное в рамках «Программы развития Московского университета», и оборудование ЦКП МГУ имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящее исследование проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farhan, M. (2022) Green tea catechins: Nature's way of preventing and treating cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10713, doi: 10.3390/ijms231810713.
2. Imai, K., Suga, K., and Nakachi, K. (1997) Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population, *Prev. Med.*, **26**, 769-775, doi: 10.1006/pmed.1997.0242.
3. Singh, B. N., Shankar, S., and Srivastava, R. K. (2011) Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications, *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 1807-1821, doi: 10.1016/j.bcp.2011.07.093.
4. Gan, R. Y., Li, H. B., Sui, Z. Q., and Corke, H. (2018) Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **58**, 924-941, doi: 10.1080/10408398.2016.1231168.

5. Hu, J., Zhou, D., and Chen, Y. (2009) Preparation and antioxidant activity of green tea extract enriched in epigallocatechin (EGC) and epigallocatechin gallate (EGCG), *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1349-1353, doi: 10.1021/jf803143n.
6. Nain, C. W., Mignolet, E., Herent, M. F., Quetin-Leclercq, J., Debier, C., Page, M. M., and Laron-delle, Y. (2022) The catechins profile of green tea extracts affects the antioxidant activity and degradation of catechins in DHA-rich oil, *Antioxidants*, **11**, 1844, doi: 10.3390/antiox11091844.
7. Negri, A., Naponelli, V., Rizzi, F., and Bettuzzi, S. (2018) Molecular targets of epigallocatechin-gallate (EGCG): a special focus on signal transduction and cancer, *Nutrients*, **10**, 1936, doi: 10.3390/nu10121936.
8. Zhao, J., Blayney, A., Liu, X., Gandy, L., Jin, W., Yan, L., Ha, J.-H., Canning, A.J., Connelly, M., Yang, C., Liu, X., Xiao, Y., Cosgrove, M. S., Solmaz, S. R., Zhang, Y., Ban, D., Chen, J., Loh, S. N., and Wang, C. (2021) EGCG binds intrinsically disordered N-terminal domain of p53 and disrupts p53-MDM2 interaction, *Nat. Commun.*, **12**, 986, doi: 10.1038/s41467-021-21258-5.
9. Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T., and Steinmann, E. (2013) Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea, *Br. J. Pharmacol.*, **168**, 1059-1073, doi: 10.1111/bph.12009.
10. Tsvetkov, V., Varizhuk, A., Kozlovskaya, L., Shtro, A., Lebedeva, O., Komissarov, A., Vedekhina, T., Manuvera, V., Zubkova, O., Eremeev, A., Shustova, E., Pozmogova, G., Lioznov, D., Ishmukhametov, A., Lazarev, V., and Lagarkova, M. (2021) EGCG as an anti-SARS-CoV-2 agent: Preventive versus therapeutic potential against original and mutant virus, *Biochimie*, **191**, 27-32, doi: 10.1016/j.biochi.2021.08.003.
11. Taylor, L. P., and Grotewold, E. (2005) Flavonoids as developmental regulators, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 317-323, doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.005.
12. Treutter, D. (2005) Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis, *Plant Biol. (Stuttg)*, **7**, 581-591, doi: 10.1055/s-2005-873009.
13. Hong, G., Wang, J., Hochstetter, D., Gao, Y., Xu, P., and Wang, Y. (2015) Epigallocatechin-3-gallate functions as a physiological regulator by modulating the jasmonic acid pathway, *Physiol. Plant.*, **153**, 432-439, doi: 10.1111/pp1.12256.
14. Wei, Y., Chen, P., Ling, T., Wang, Y., Dong, R., Zhang, C., Zhang, L., Han, M., Wang, D., Wan, X., and Zhang, J. (2016) Certain (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) auto-oxidation products (EAOPs) retain the cytotoxic activities of EGCG, *Food Chem.*, **204**, 218-226, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.134.
15. Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J. L. F. C. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **65**, 45-80, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003.
16. Rhee, S. G., Chang, T. S., Jeong, W., and Kang, D. (2010) Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells, *Mol. Cells*, **29**, 539-549, doi: 10.1007/s10059-010-0082-3.
17. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 227-231, doi: 10.1021/tx00026a012.
18. Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., and Frennesson, C. I. (2010) What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem. J.*, **428**, 183-190, doi: 10.1042/BJ20100208.
19. Samuilov, V. D., Lagunova, E. M., Kiselevsky, D. B., Dzyubinskaya, E. V., Makarova, Y. V., and Gusev, M. V. (2003) Participation of chloroplasts in plant apoptosis, *Biosci. Rep.*, **23**, 103-117, doi: 10.1023/a:1025576307912.
20. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry*, **13**, 795-808, doi: 10.1002/cyto.990130802.
21. Yamazaki, I., and Yokota, K. (1973) Oxidation states of peroxidase, *Mol. Cell. Biochem.*, **2**, 39-52, doi: 10.1007/BF01738677.
22. Yokota, K., and Yamazaki, I. (1977) Analysis and computer simulation of aerobic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide catalyzed by horseradish peroxidase, *Biochemistry*, **16**, 1913-1920, doi: 10.1021/bi00628a024.
23. Votyakova, T. V., and Reynolds, I. J. (2004) Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **431**, 138-144, doi: 10.1016/j.abb.2004.07.025.
24. Kiselevsky, D. B., Il'ina, A. V., Lunkov, A. P., Varlamov, V. P., Samuilov, V. D. (2022) Investigation of the antioxidant properties of the quaternized chitosan modified with a gallic acid residue using peroxidase, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 141-149, doi: 10.1134/S0006297922020067.
25. Porcelli, A. M., Ghelli, A., Zanna, C., Pinton, P., Rizzuto, R., and Rugolo, M. (2005) pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 799-804, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.105.
26. Weng, Z., Zhou, P., Salminen, W. F., Yang, X., Harrill, A. H., Cao, Z., Mattes, W. B., Mendrick, D. L., and Shi, Q. (2014) Green tea epigallocatechin gallate binds to and inhibits respiratory complexes in swelling but not normal rat hepatic mitochondria, *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, **443**, 1097-1104, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.110.
27. Pan, H., Chen, J., Shen, K., Wang, X., Wang, P., Fu, G., Meng, H., Wang, Y., and Jin, B. (2015) Mitochondrial modulation by epigallocatechin 3-gallate ameliorates cisplatin induced renal injury through decreasing oxidative/nitrative stress, inflammation and NF- κ B in mice, *PLoS One*, **10**, e0124775, doi: 10.1371/journal.pone.0124775.
 28. Castellano-González, G., Pichaud, N., Ballard, J. W., Bessede, A., Marcal, H., and Guillemin, G. J. (2016) Epigallocatechin-3-gallate induces oxidative phosphorylation by activating cytochrome *c* oxidase in human cultured neurons and astrocytes, *Oncotarget*, **7**, 7426-7440, doi: 10.18632/oncotarget.6863.
 29. Pal, S., Porwal, K., Rajak, S., Sinha, R. A., and Chattopadhyay, N. (2020) Selective dietary polyphenols induce differentiation of human osteoblasts by adiponectin receptor 1-mediated reprogramming of mitochondrial energy metabolism, *Biomed. Pharmacother.*, **127**, 110207, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110207.
 30. Li, X., Tang, S., Wang, Q.-Q., Leung, E. L.-H., Jin, H., Huang, Y., Liu, J., Geng, M., Huang, M., Yuan, S., Yao, X.-J., and Ding, J. (2017) Identification of epigallocatechin-3-gallate as an inhibitor of phosphoglycerate mutase 1, *Front. Pharmacol.*, **8**, 325, doi: 10.3389/fphar.2017.00325.
 31. Weber, A. A., Neuhaus, T., Skach, R. A., Hescheler, J., Ahn, H. Y., Schrör, K., Ko, Y., and Sachinidis, A. (2004) Mechanisms of the inhibitory effects of epigallocatechin-3 gallate on platelet-derived growth factor-BB-induced cell signaling and mitogenesis, *FASEB J.*, **18**, 128-130, doi: 10.1096/fj.03-0007fje.
 32. Kucera, O., Mezera, V., Moravcova, A., Endlicher, R., Lotkova, H., Drahotka, Z., and Cervinkova, Z. (2015) *In vitro* toxicity of epigallocatechin gallate in rat liver mitochondria and hepatocytes, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 476180, doi: 10.1155/2015/476180.
 33. Stevens, J. F., Revel, J. S., and Maier, C. S. (2018) Mitochondria-centric review of polyphenol bioactivity in cancer models, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1589-1611, doi: 10.1089/ars.2017.7404.
 34. Schansker, G., and van Rensen, J. J. (1993) Characterization of the complex interaction between the electron acceptor silicomolybdate and Photosystem II, *Photosynth. Res.*, **37**, 165-175, doi: 10.1007/BF02187475.
 35. Petrova, A., Mamedov, M., Ivanov, B., Semenov, A., and Kozuleva, M. (2018) Effect of artificial redox mediators on the photoinduced oxygen reduction by photosystem I complexes, *Photosynth. Res.*, **137**, 421-429, doi: 10.1007/s11120-018-0514-z.
 36. Calzadilla, P. I., Zhan, J., Sétif, P., Lemaire, C., Solymosi, D., Battchikova, N., Wang, Q., and Kirilovsky, D. (2019) The cytochrome *b₆f* complex is not involved in cyanobacterial state transitions, *Plant Cell*, **31**, 911-931, doi: 10.1105/tpc.18.00916.
 37. Lu, Y., Wang, J., Yu, Y., Shi, L., and Kong, F. (2014) Changes in the physiology and gene expression of *Microcystis aeruginosa* under EGCG stress, *Chemosphere*, **117**, 164-169, doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.06.040.
 38. Baranowska, M., Suliborska, K., Chrzanowski, W., Kusznierevich, B., Namieśnik, J., and Bartoszek, A. (2018) The relationship between standard reduction potentials of catechins and biological activities involved in redox control, *Redox Biol.*, **17**, 355-366, doi: 10.1016/j.redox.2018.05.005.
 39. Saif Hasan, S., Yamashita, E., and Cramer, W. A. (2013) Transmembrane signaling and assembly of the cytochrome *b₆f*-lipidic charge transfer complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1295-1308, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.03.002.
 40. Киселевский Д. Б., Самуилов В. Д. (2019) Проницаемость плазматической мембраны для йодида пропидия и разрушение ядер клеток в эпидермисе листьев гороха: действие полиэлектролитов и детергентов, *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*, **74**, 188-194, doi: 10.3103/S0096392519030052.
 41. Trinh, M. D. L., and Masuda, S. (2022) Chloroplast pH homeostasis for the regulation of photosynthesis, *Front. Plant Sci.*, **13**, 919896, doi: 10.3389/fpls.2022.919896.
 42. Kunitomo, M., Inoue, K., and Nojima, S. (1981) Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **646**, 169-178, doi: 10.1016/0005-2736(81)90284-4.
 43. Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A. C., Lopes, S. C., Antunes, F., Cyrne, L., and Marinho, H. S. (2008) H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1141-1147, doi: 10.1016/j.bbamem.2007.12.008.
 44. Garrido-Bazán, V., and Aguirre, J. (2022) H₂O₂ induces calcium and ERMES complex-dependent mitochondrial constriction and division as well as mitochondrial outer membrane remodeling in *Aspergillus nidulans*, *J. Fungi*, **8**, 829, doi: 10.3390/jof8080829.

**pH-DEPENDENT REDOX PROPERTIES
OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG) AND ITS EFFECT
ON RESPIRATION, PHOTOSYNTHESIS AND CELL DEATH IN PEA**

D. B. Kiselevsky^{1*}, O. V. Samuilova², and V. D. Samuilov¹

¹ *Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: dkiselevs@mail.ru*

² *Department of Biological Chemistry, Institute of Biodesign and Modeling of Complex Systems,
Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

The redox properties of the green tea component epigallocatechin gallate (EGCG) *in vitro* were studied and its effect on plant (pea) cells was tested. EGCG exhibited both pro- and antioxidant properties. In solutions, EGCG was oxidized by oxygen at physiological (slightly alkaline) pH values. Lowering the pH slowed down this process. Oxidation of EGCG was accompanied by the formation of O_2^- and H_2O_2 . In addition, EGCG functioned as an electron donor for peroxidase and, in combination with it, utilized H_2O_2 . Exposure of EGCG to pea cells (leaf cuts or epidermis) suppressed respiration, reduced the transmembrane electric potential difference ($\Delta\psi$) in mitochondria, and inhibited electron transfer in the photosynthetic electron transfer chain. Among the sites of the photosynthetic redox chain, Photosystem II was the least sensitive to the action of EGCG. EGCG reduced the rate of formation of reactive oxygen species in the epidermis, which was induced by NADH treatment and was registered using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. *In vivo*, EGCG at concentrations from 10 μ M to 1 mM suppressed KCN-induced death of guard cells in the epidermis, which was determined from the destruction of cell nuclei. EGCG at a concentration of 10 mM disrupted the barrier function of the guard cell plasma membrane, increasing its permeability to propidium iodide.

Keywords: EGCG, peroxidase, reactive oxygen species, cell death, pea

НОВЫЙ ГИБРИД ДОНЕПЕЗИЛ–КОФЕЙНАЯ КИСЛОТА: СИНТЕЗ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ

© 2023 D. Kılıçaslan^{1*}, A. H. Kurt², M. Köse³,
M. Çeşme³, Ö. Güngör³, C. K. Oztabag⁴, A. Doganer⁵

¹ Afsin Vocational School, Department of Chemistry and Chemical Processing Technologies,
Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Kahramanmaraş, Turkey; E-mail: deryatrnc@ksu.edu.tr

² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Bolu Abant İzzet Baysal University, Bolu, Turkey

³ Department of Chemistry, Faculty of Art and Sciences, Kahramanmaraş Sutcu Imam University,
Kahramanmaraş, Turkey

⁴ Department of Interdisciplinary Neuroscience, Bolu Abant İzzet Baysal University, Institute of Health Sciences,
Bolu, Turkey

⁵ Department Biostatistics and Medical Informatics, Faculty of Medicine, Kahramanmaraş Sutcu Imam University,
Kahramanmaraş, Turkey

Поступила в редакцию 10.07.2022

После доработки 30.12.2022

Принята к публикации 04.01.2023

Была разработана, синтезирована и исследована с помощью молекулярного моделирования новая гибридная молекула донепезил–кофейная кислота (DP–CA). Биологическая активность этого соединения и его защитный эффект исследовали методами ИК-спектроскопии, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Было показано, что молекула DP–CA высоко активна против ацетилхолинэстеразы и ингибировала активность этого фермента в микромолярных концентрациях. С помощью методов флуоресцентной спектроскопии и спектрофотометрии в видимом свете и ближнем ультрафиолете было показано сильное связывание молекулы DP–CA с ДНК. Более того, DP–CA проявляла защитный эффект от индуцированной H₂O₂ токсичности в клетках глиобластомы U-118 MG. Наконец, молекулярный докинг показал высокое сродство к DP–CA во всех концентрациях, а в активном центре 4EY7 были обнаружены незаменимые аминокислотные остатки с полярными и неполярными контактами. В совокупности эти данные указывают на то, что DP–CA может быть перспективным многофункциональным агентом для лечения нейродегенеративных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: донепезил, кофейная кислота, гибридная молекула, ацетилхолинэстераза, молекулярный докинг, защитный эффект.

DOI: 10.31857/S0320972523020033, EDN: QFWADC

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) признана наиболее частой причиной деменции [1]. Текущие клинические испытания лекарственных препаратов сфокусированы на различных патологических путях, участвующих в развитии этого нейродегенеративного расстройства. Симптомы деменции у больных БА могут быть связаны с отсутствием нейротрансмиттеров ацетилхолина [2] в результате снижения синтеза и высвобождения ацетилхолина из-за гибели нейронов.

Поэтому считается, что когнитивные функции больных БА могут быть улучшены за счет повышения уровня ацетилхолина или торможения его катаболизма [3]. Используемые в настоящее время лекарства, одобренные Федеральным управлением по лекарственным средствам (FDA) в США, только облегчают симптомы. Они не препятствуют прогрессированию болезни, а просто в некоторой степени улучшают дефицит памяти у пациентов с БА [4], что побудило исследователей разработать новые методы лечения, влияющие на развитие этой болезни.

Принятые сокращения: АХЭ – ацетилхолинэстераза; БА – болезнь Альцгеймера; ДТНБ – 5,5-дителиобис-(2-нитробензойная кислота); ЭБ – этидиумбромид; СА – кофейная кислота; DP – донепезил; DP–CA – донепезил–кофейная кислота; U-118 MG – клетки глиобластомы.

* Адресат для корреспонденции.

В последние годы разработка методов лечения БА связана с поиском новых, более эффективных ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ), обладающих защитной и терапевтической активностью, а также меньшим количеством побочных эффектов. Одним из новых подходов является разработка, синтез и использование гибридных молекул лекарственных препаратов, состоящих из двух хорошо зарекомендовавших себя химических каркасов и обладающих сочетанием необходимых биологических активностей в одной молекуле. Для этого препараты, используемые для лечения БА, комбинируются с активными поддерживающими молекулами. Полученные соединения, которые облегчают лечение многофакторных заболеваний, считаются очень перспективными терапевтическими агентами, поскольку они снижают риск межлекарственных взаимодействий и стимулируют исследования фармакодинамики и фармакокинетики лекарств [5]. Так, в работах Minarini et al. [6], Galdeano et al. [7], Fernandez-Bachiller et al. [8] и Chen et al. [9] была подробно исследована новая гибридная молекула с ингибирующей активностью АХЭ и антиоксидантными свойствами. Установлено, что молекулы, сочетающие два и более различных фармакологических свойства, включая антиоксидантную активность, демонстрируют большую эффективность в лечении БА, чем препараты с одной мишенью, так как они воздействуют и на другие мишени нейродегенеративного процесса [10–13].

Mohsi и Ahmad [14] разработали новую серию многофункциональных гибридных молекул на основе каркаса донепезила и протестировали их в качестве потенциальных агентов против болезни Альцгеймера. Конъюгаты природных соединений, таких как феруловая кислота, куркумин и флавоноиды, с донепезилом ингибировали АХЭ, а также проявляли антиоксидантную активность [15–17]. В другом исследовании сообщалось об ингибировании бутирилхолинэстеразы и АХЭ гибридными молекулами, полученными в результате присоединения донепезила и такрина [18, 19]. Молекулы, образованные путем соединения донепезила и природных соединений, таких как флавоноиды, куркумин и кумарины, проявляют антиоксидантные свойства и ингибирующую активность в отношении моноаминоксидазы и холинэстеразы [17, 20–22].

Кофейная кислота (СА, 3,4-гидроксикоричная кислота) представляет собой фенольную кислоту, которая в избытке содержится во фруктах, овощах и отдельных растительных, включая чай и кофе [23, 24]. Недавние иссле-

дования выявили многочисленные фармакологические свойства СА, такие как противораковая, антитромботическая, антигипертензивная, противовоспалительная, противовирусная и антифибротическая активности [25–28]. Однако в нескольких исследованиях изучалось потенциальное нейропротекторное действие СА против $A\beta$ -индуцированной клеточной токсичности [29, 30]. Сравнение СА с препаратом Тролокс [31] показало, что кофейная кислота более эффективна против окислительного стресса за счет удаления пероксильного радикала.

Целью данного исследования было создание новой гибридной молекулы, сочетающей антиоксидантные и нейропротекторные свойства с ингибирующей активностью в отношении АХЭ, и проверка ее эффективности *in vitro* при лечении болезни Альцгеймера. Нами был разработан и синтезирован новый гибридный ингибитор АХЭ с улучшенным фармакологическим профилем с перспективой создания нового класса гибридных химических соединений в качестве многоцелевых продуктов для лечения неврологических заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и оборудование. В работе использовали следующие реактивы: кофейная кислота (СА), тионилхлорид, дихлорометан, тетрагидрофуран, триэтиламин, 5,6-диметокси(пиперидин-4-илметил)-2,3-дигидро-1Н-инден-1-он (DP) и растворители («Sigma-Aldrich», США) без дополнительной очистки (если не указано иное). Для мониторинга протекания реакции и оценки чистоты синтезированных продуктов реакции использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на алюминевых пластинках, покрытых силикагелем 60 F254. Для визуализации пятен использовали УФ-лампу ($\lambda = 254$ нм). ИК-спектры соединений получали с помощью метода полного ослабления отражения (ATR, attenuated total reflectance) на инфракрасном спектрофотометре Perkin Elmer Spectrum 100 («Perkin Elmer», США) с Фурье-преобразованием (FT-IR). ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры с использованием изотопов ^1H и ^{13}C регистрировали на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III 400 МГц («Bruker», США) в $\text{DMSO}-d_6$. Значения химического сдвига (ppm) оценивали по шкале δ , используя в качестве контроля пик растворителя. Константы взаимодействия были представлены в герцах (Hz). Масс-спектры регистрировали на спектрометре Agilent LC/MS-TOF («Agilent Technologies», США) в метаноле (ч.д.а.).

Синтез хлорида кофейной кислоты. Для получения хлорида кофейной кислоты препарат кофейной кислоты (5,55 ммоль) в дихлорметане смешивали с 20 мл тионилхлорида и перемешивали в колбе с обратным холодильником в течение 8 ч [32]. Для осуществления контроля реакции использовали ТСХ. Чистоту полученного продукта определяли с помощью ИК- и УФ-освещения. Наблюдался сдвиг пика реакционной смеси от 1641 (карбоксильная группа) к 1715 (гидрохлорид). Выход продукта составлял 70%; температура плавления (т. пл.): 155–157 °С.

Синтез гибридов донепезила и кофейной кислоты (DP–CA). 5,6-Диметокси-(пиперидин-4-илметил)-2,3-дигидро-1H-инден-1-он (0,1 ммоль) растворяли в тетрагидрофуране (THF) и добавляли к препарату синтезированного гидрохлорида кофейной кислоты (0,1 ммоль) в щелочном триэтилаmine. Гибридную молекулу донепезила и кофейной кислоты (DP–CA) получали при перемешивании реакционной смеси с обратным холодильником в течение 8 ч. Течение реакции контролировали с помощью ТСХ. Органический слой отделяли, промывали и высушивали. Затем раствор упаривали, получая неочищенный продукт.

DP–CA. $C_{26}H_{29}NO_6$ MW: коричневая окраска (451,52 г/моль, выход – 86%). FT-IR (ATR cm^{-1}):

- 3357 (O–H),
- 2938 (C–H),
- 1677 (C=O),
- 1630 (C=O),
- 1394–1588 (C=C)
- 1032 (C–O).

1H -ЯМР (DMSO- d_6 , ppm):

- 9,27–9,13 (O–H);
- 9,88 ($CH_{ароматич.}$, 1H, s);
- 7,09–7,04 ($CH_{ароматич.}$, 2H, s);
- 6,79 ($CH_{ароматич.}$, 1H, d);
- 6,27 ($CH_{ароматич.}$, 1H, d);
- 5,34 ($C_{алифатич.}$, 1H, s);
- 3,85 (OCH_3 , 3H, s);
- 3,77 (OCH_3 , 3H, s);
- 3,67–1,70 ($C_{алифатич.}$, 14H, m).

^{13}C ЯМР (DMSO- d_6 , ppm):

- 8 206,7 ($C=O_{индол}$);
- 155,78 ($C=O_{амид}$);
- 149–104,45 ($C_{ароматич.}$);
- 56,45 и 56,13 (OCH_3);
- 52,54–28,25 ($C_{алифатич.}$).

HRMS (ESI) (m/z) $[M + H]^+$: аналитически рассчитано для $[C_{26}H_{27}NO_6]$ как 451,5; обнаружено 452,20.

Определение связывания с ДНК. Двухцепочечную ДНК спермы рыб («Sigma-Aldrich») использовали без дополнительной очистки.

Для приготовления маточного раствора ДНК растворяли в 20 mM Tris-HCl-буфере (pH 7,0), содержащем 20 mM NaCl. Концентрацию ДНК определяли по поглощению раствора при 260 нм (коэффициент молярной экстинкции = $6600 M^{-1} cm^{-1}$) [33]. Исходный раствор DP–CA ($1 \times 10^{-3} M$) готовили и хранили в DMSO, и перед использованием в экспериментах его разводили буфером. Связывание DP–CA с ДНК исследовали методом электронного абсорбционного титрования путем добавления ДНК возрастающих концентраций к постоянной концентрации CA и DP–CA ($4,0 \times 10^{-5}$ и $1,0 \times 10^{-6} M$ соответственно).

Флуоресцентный анализ. Для изучения относительной способности новой гибридной молекулы связываться с двухцепочечной молекулой ДНК рыбы использовали регистрацию связывания этидиумбромид (ЭБ) с помощью метода флуоресцентной спектроскопии. Интенсивность флуоресценции связанного с ДНК этидиумбромида определяли при длине волны 610 нм после возбуждения при 526 нм в присутствии или при отсутствии CA и DP–CA (10–100 мкМ) в буфере Tris-HCl. ДНК-связывающую способность CA и DP–CA определяли по изменению флуоресценции ЭБ, связанного с ДНК. Константы связывания рассчитывали по углу наклона кривой зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации CA и DP–CA. Способность соединений тушить флуоресценцию определяли с использованием констант Штерна–Вольмера, как показано в уравнении (1):

$$F_0/F = K_{sv} [Q] + 1, \quad (1)$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции при отсутствии тушителя; F – интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя; K_{sv} – константа тушения; и $[Q]$ – концентрация тушителя.

Значение K_{sv} определяли по углу наклона кривой зависимости значений F от $[Q]$. Для определения K (константа связывания) и n (количество сайтов связывания CA и DP–CA на молекуле ДНК) использовали уравнение (2) [33]:

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K + n \log[Q], \quad (2)$$

где K и n представляют константу связывания и количество точек связывания (п.н.). Для расчета значений K_{sv} использовали графики зависимости $\log[(F_0 - F)/F]$ от $\log[Q]$.

Ингибирование активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ). В работе использовали препараты ацетилхолинэстеразы (AChE, EC 3.1.1.7,

тип V-S, лиофилизированный порошок, из электрического угря; 1000 Ед.), ацетилтиохолениодида (ATCI) и 5,5-дитиобис-(2-нитробензойная кислоты (ДТНБ) («Sigma-Aldrich»). Активность АХЭ *in vitro* измеряли с использованием модифицированного метода Ellman et al. [34] на 96-луночном планшетном ридере BioTek EL × 808 («BioTek Instruments», США). Концентрация используемого раствора фермента была равна 0,22 Ед./мл. Растворы СА и DP-СА (1×10^{-3} и 1×10^{-7} М соответственно) готовили в смеси DMSO/метанол (1 : 1; v/v). В каждую из 96 лунок планшета добавляли по 100 мкл фосфатного буфера (pH 6,7). Затем в ячейки добавляли различные концентрации тестируемых соединений (20 мкл) и АХЭ (20 мкл/ячейка), и планшеты инкубировали при 25 °С в течение 10 мин. К смеси фермента и ингибитора добавляли хроматографический реагент ДТНБ (3 мМ, 50 мкл/ячейка) и субстрат ATCI (3 мМ, 50 мкл/ячейка) и инкубировали в течение 10 мин. По поглощению при 412 нм регистрировали образование желтого продукта реакции (анион 2-нитро-5-тиобензойной кислоты). В качестве контроля использовали лунки, не содержащие фермент. Каждое измерение проводили 3 раза. Линейный регрессионный анализ концентрации образца и IC_{50} (концентрация ингибитора, вызывающая 50%-ное ингибирование деградации субстрата, ацетилхолина) был выполнен с использованием программы Excel. Контрольные реакции проводили в тех же условиях в реакционных смесях, содержащих ДТНБ, буфер, воду и субстрат, но без ингибитора [35].

Молекулярный докинг. Трехмерная структура DP-СА была создана с помощью программного обеспечения ChemDraw 20.0. Минимизацию энергии осуществляли с помощью программы Chem3D 20, используя алгоритм MM2. Картирование молекулярного электростатического потенциала и визуализацию соединений осуществляли с помощью программы Schrödinger Maestro Release 2021-1 [36]. Рентгеновские (X-ray) кристаллические структуры высокого разрешения рекомбинантного белка АХЭ человека в комплексе с донепезилом (PDB: 4EY7; 2,35 Å) и ДНК (PDB: 1BNA; 1,90 Å) были получены из базы данных RCSB. В экспериментах по молекулярному докингу *in silico* соединения стыковались с 4EY7 и 1BNA, а функция оценки стыковки выполнялась с помощью программного обеспечения для стыковки PyRx (Autodock Vina) (версия с академической лицензией 0.9.8). Гибкий лиганд: для анализа был выбран докинг жестких рецепторов [37, 38]. Сетка на лиганд-связывающем кармане распо-

лагалась в месте связывания 4EY7 с X: -14,108, Y: -43,832 и Z: 27,669 (размеры сетки: $25 \times 25 \times 25 \text{ Å}^3$ с $0,375 \text{ Å}$ соответственно) или 1BNA (X: 15, Y: 21 и Z: 10; размеры сетки $30 \times 25 \times 47 \text{ Å}^3$ с $0,375 \text{ Å}$ соответственно). Величину истощения (exhaustiveness) белков принимали за 100. Для каждого комплекса лиганд-белок оценивали десять различных поз. Последующие взаимодействия анализировали после того, как был проведен докинг синтетического соединения в активные центры белка, чтобы определить энергии связывания комплексов белок-лиганд. Энергии связывания и взаимодействия десяти связанных с белком структур соединения были записаны и проанализированы с помощью программного обеспечения Discovery Studio 2021 для дополнительной оценки и визуализации. Программное обеспечение определило и проанализировало оптимальные позиции стыковки и близость взаимодействий. Аффинности связывания (ккал/моль), полученные для докинговых структур, оценивали по комплексу наилучшего сопряжения белок-лиганд [39]. Материалы по валидации протокола молекулярного докинга приведены в Приложении.

Жизнеспособность и защита клеток. Клетки глиобластомы U-118 MG были получены из Американской коллекции типовых культур («АТСС», США). Клетки культивировали в стандартной среде, дополненной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS, «Gibco/BRL», США). Клетки инкубировали при 37 °С в 5%-ной модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM, «Gibco/BRL»), содержащей 1% пенициллина и 1% L-глутамин («Sigma-Aldrich»), в увлажненном инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 . Смену среды проводили каждые 2–3 дня. Ежедневный контроль роста клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа; клетки пересевают, когда они достигали 70–80% слияния. В работе использовали препарат кофейной кислоты (HPLC, «Sigma-Aldrich») без дополнительной очистки.

Создание модели окислительного повреждения в клеточной линии глиобластомы U-118 MG. Оценку влияния H_2O_2 («Sigma-Aldrich») на жизнеспособность клеток U-118 MG проводили с использованием ХТТ (2,3-бис(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксианилид, внутренняя соль) («Sigma-Aldrich»). Клетки U-118 MG высевали в 96-луночные планшеты (1×10^4 клеток на лунку), культивировали в течение 24 ч, а затем в течение 20 ч инкубировали с различными концентрациями (62,5–1000 мкМ) H_2O_2 . Свежие растворы различных концентраций H_2O_2

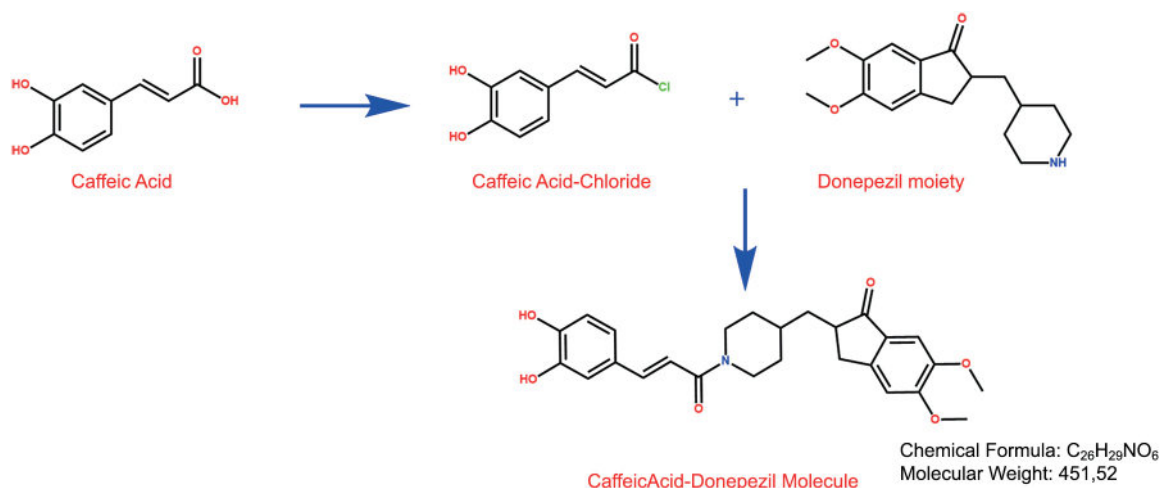


Схема 1. Схема синтеза молекулы DP–CA

готовили перед проведением каждого эксперимента путем разведения маточного 30%-ного раствора H_2O_2 в среде, не содержащей красный фенол («Sigma-Aldrich»). Клетки контрольной группы инкубировали при отсутствии H_2O_2 [40].

Влияние DP–CA на H_2O_2 -индуцированное повреждение клеток U-118 MG. Оценивали влияние различных концентраций (1, 3 и 9 мкМ) DP–CA и CA в отдельности и в сочетании с 250 мкМ H_2O_2 . Клетки U-118 MG высевали в 96-луночные планшеты (1×10^4 клеток на лунку) и культивировали в течение 24 ч в среде DMEM, дополненной 10%-ной FBS. Затем клетки предварительно обрабатывали 250 мкМ H_2O_2 в течение 1 ч и подвергали воздействию с 1, 3 и 9 мкМ DP–CA и CA в течение 20 ч. После инкубации клетки обрабатывали раствором ХТТ (Cell Proliferation Kit II – ХТТ) в течение 4 ч и затем измеряли поглощение образцов при 450 нм с использованием ридера микропланшет. Величину поглощения в лунках, содержащих CA или DP–CA (контроли), принимали за 100%, и выживаемость клеток оценивали по величине поглощения в других образцах. При оценке данных переменные проверялись с точки зрения их соответствия или отклонения от нормального распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Различия в жизнеспособности клеток между группами изучали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и множественных сравнений с использованием теста Тамхейна T2, теста Тьюки и теста Даннета (статистическая значимость, $p < 0,05$; статистические параметры, среднее $\pm$ стандартное отклонение (mean $\pm$ SD)). Данные оценивали с помощью пакета программ SPSS версии 22 для Windows («IBM Corp.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химия. Гибридную молекулу DP–CA синтезировали по стратегии, представленной на схеме 1. Химическое строение всех синтезированных соединений подтверждено методами ИК-, ^{13}C -ЯМР-, 1H -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. На первом этапе был синтезирован хлорид кофейной кислоты (промежуточный продукт). Для этого раствор CA в диэтиловом эфире смешивали с тионилхлоридом и затем кипятили с обратным холодильником при перемешивании при 80 °C в течение 1–4 ч. Для контроля полноты реакции проводили ТСХ под контролем ИК- и УФ-освещения. Сдвиг пика от 1641 (карбоновая кислота) до 1715 (хлорангидрид) подтверждает образование хлорида кофейной кислоты. Спектральные данные CA и хлорида кофейной кислоты представлены на рис. S1 в Приложении. Затем был разработан и синтезирован другой гибрид DP–CA, отличающийся только связью между двумя единицами. В итоговой гибридной структуре сохранены инданоновый и пиперидиновый фрагменты, а бензильная группа заменена фрагментом кофейной кислоты.

Синтезированный DP–CA содержал 1-инданоновое кольцо, характерное для молекулы донепезила. В ИК-спектрах соединения видна полоса, соответствующая карбонильной группе ($C=O$) этого кольца при 1677 cm^{-1} . Помимо карбонильной полосы 1-инданона, в спектре присутствует полоса при 1588 cm^{-1} , соответствующая карбонилу группы $-NCOH$. Полосы, соответствующие группам $C=C$ ароматической системы колец в DP–CA, наблюдаются в диапазоне 1394–1588 cm^{-1} . Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными [41, 42]. Полоса, соответствующая $C-O$

в синтезированном DP-CA, была обнаружена при 1032 см^{-1} (спектральные характеристики синтезированных соединений см. на рис. S2 в Приложении).

Как и ожидалось, алифатические и ароматические протоны в DP-CA дают пики в спектрах ^1H -ЯМР. Нами проанализированы спектры ^1H -ЯМР синтезированных соединений, содержащих метоксикарбонил в 5-м положении инданового кольца. Сигналы метоксипроtons, наблюдаемые при $3,85\text{ ppm}$ в исходных соединениях, существенно не изменились в электронном окружении из-за удаленности от модифицированных заместителей и достигли максимума при $3,85$ или $3,77\text{ ppm}$. Обнаружены синглетные, дублетные и в некоторых случаях мультиплетные ароматические протоны. Их значения химических сдвигов составили $9,88$, $7,09$ – $7,04$, $6,79$ и $6,27\text{ ppm}$ соответственно (рис. S3 в Приложении).

Общие для синтезированных соединений структурные фрагменты имеют ожидаемое количество пиков в ^{13}C -ЯМР-спектрах. Общее число атомов углерода определяли, рассматривая идентичные атомы углерода в соответствии с их электронным окружением. Сигналы карбонила индола и амида ($\text{C}=\text{O}$) от конкретных функциональных групп обнаружены при $206,7$ и $155,78\text{ ppm}$ соответственно. Алифатические углероды, отличные от тех, которые

дают пики в диапазоне $52,54$ – $28,25\text{ ppm}$, и ароматические углероды дают пики в диапазоне $149,59$ – $104,45\text{ ppm}$, что согласуется с литературными данными [16, 17]. Синтезированное соединение содержало дизамещенную метоксигруппу в 5-м и 6-м положениях десятичольцевой системы 1-инданового кольца. Атомы углерода, принадлежащие к этой функциональной группе, обнаруживаются в виде сигналов при $56,45$ – $56,13\text{ ppm}$ (рис. S4 в Приложении).

Масс-спектр DP-CA определяли методом положительной ионизации с использованием спектрометра LC/MS-TOF. Исследование спектра показало, что пик M^{+1} , полученный с молекулярной массой DP-CA, был совместим, как и ожидалось (рис. S5 в Приложении).

Связывание с ДНК. Изучение спектров поглощения УФ-видимой области (UV-Vis) является одним из самых основных методов, используемых для изучения взаимодействия различных соединений с ДНК. Мы записывали спектры поглощения UV-Vis в диапазоне 200 – 400 nm для растворов с постоянными концентрациями DP-CA или CA (4×10^{-5} и $1 \times 10^{-5}\text{ M}$ соответственно), которые также содержали различные количества ДНК ($4,3 \times 10^{-5}$ – $4,7 \times 10^{-6}\text{ M}$), и регистрировали изменения поглощения при 274 nm и 316 nm

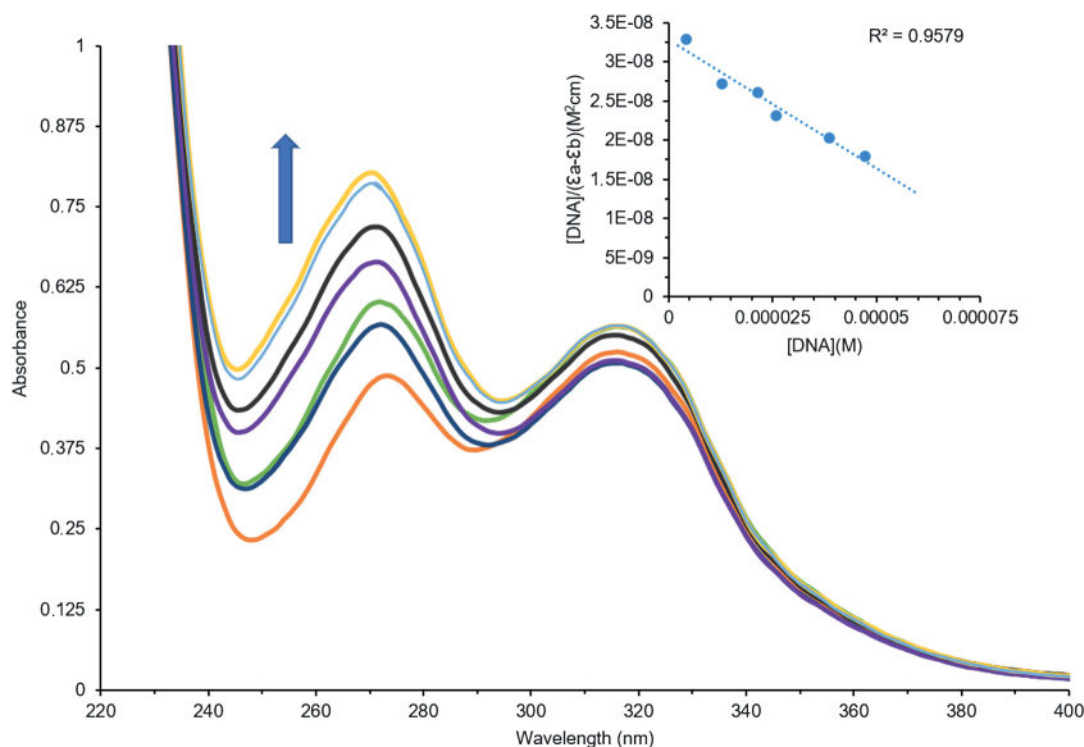


Рис. 1. УФ-спектры растворов DP-CA ($4 \times 10^{-5}\text{ M}$), содержащих различные количества двухцепочечной ДНК рыбы (изменения обозначены стрелкой). Вставка: $[\text{ДНК}/(\epsilon_a - \epsilon_b)]$ против $[\text{ДНК}]$.

(DP–CA) и при 282 нм и 315 нм (CA). Константы связывания (K_b) ДНК–соединений рассчитывали по уравнению (3) [43]:

$$\frac{[\text{ДНК}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)}{= [\text{ДНК}]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}, \quad (3)$$

где [ДНК] – концентрация ДНК; ε_a – кажущийся коэффициент экстинкции, рассчитанный на основе $A_{\text{obs}}/[\text{соединение}]$; ε_f – коэффициент экстинкции соединения в его свободной форме; ε_b соответствует коэффициенту экстинкции химического соединения в связанной форме; и K_b – константа связывания.

Зарегистрированные спектры поглощения показаны на рис. 1. Взаимодействия ДНК с другими молекулами могут вызывать изменения в спиральной структуре и приводить к гиперхромным или гипохромным эффектам в спектре поглощения ДНК (соответственно увеличению или уменьшению интенсивности полосы поглощения при увеличении концентрации ДНК). Гипохромный эффект обусловлен сжатием или укорочением ДНК вдоль оси спирали, тогда как гиперхромный эффект вызван изгибом спирали ДНК.

В некоторых случаях соединение может вызывать красный или синий сдвиг полосы поглощения ДНК в дополнение к гипер- или гипохромному эффекту. Гиперхромный эффект и красное смещение в спектрах поглощения свидетельствуют об устойчивости комплекса соединение–ДНК [44]. Изменения в полосах поглощения при 316 нм в случае DP–CA (рис. 1) и при 315 нм – для CA были минимальными и поэтому не учитывались. Мы также наблюдали гиперхромный эффект и синее смещение на 3 нм (гипсохромный эффект) для растворов DP–CA и CA. Взаимодействие молекулы ДНК с DP–CA и CA приводило как к гиперхромному, так и гипсохромному

эффектам, что в какой-то мере отражало взаимодействие и частичное связывание DP–CA и CA с бороздкой ДНК [45] (см. спектральные данные для CA на рис. S1 в Приложении).

Флуоресцентная спектроскопия. Вытеснение ЭБ, контролируемое с помощью флуоресцентной спектроскопии, представляет собой спектроскопический метод, используемый для исследования взаимодействия различных соединений с ДНК. Двумерные плоские молекулы ЭБ интеркалируют между парами оснований ДНК [46]. Хотя сам по себе ЭБ проявляет слабую флуоресценцию, интенсивность его излучения значительно возрастает, когда ЭБ связывается с ДНК. Измерения флуоресценции показали, что увеличение количества интеркалирующих соединений, добавляемых к растворам ДНК, приводило к значительному снижению интенсивности излучения [47]. Если соединения интеркалируют между парами оснований в молекуле ДНК, то они могут конкурировать с ЭБ. Это снижает интенсивность излучения комплексов ЭБ–ДНК, уменьшение сигнала флуоресценции, отражающее силу взаимодействия химического соединения с ДНК (соединение заменяет ЭБ в его комплексе с ДНК). Такие соединения называются гасителями эмиссии. На рис. 2 показано снижение интенсивности эмиссии, вызванное взаимодействием DP–CA с комплексами ЭБ–ДНК. Графики Штерна–Фольмера, представленные на рис. 2, были получены с использованием соответствующих данных по интенсивности флуоресценции. Значение K_{sv} DP–CA, рассчитанное по наклону графиков, составило $0,19 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (табл. 1). Значение K_{sv} , рассчитанное в случае добавления DP–CA к комплексу ЭБ–ДНК, составило $0,19 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, что указывает на то, что соединение было заменено бромистым этидием, локализованным в ДНК (рис. S1 в Приложении).

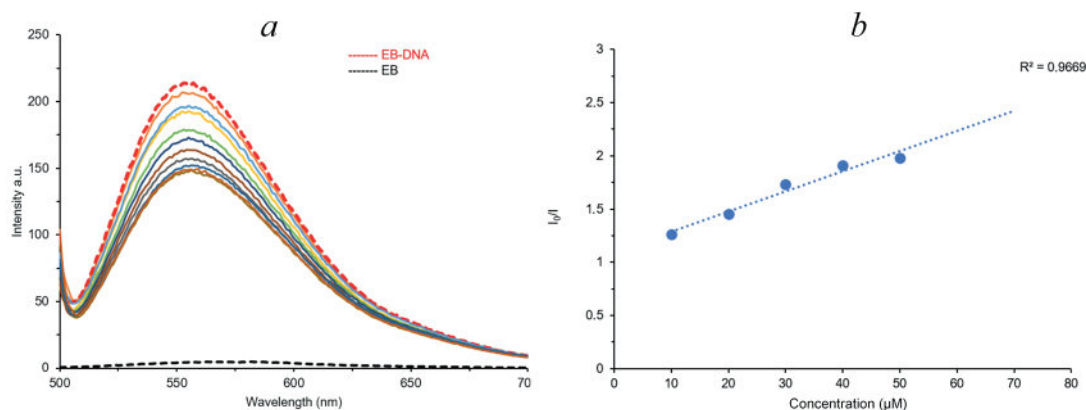


Рис. 2. Влияние DP–CA (30–90 мкМ) на интенсивность эмиссии (a) связанного с ДНК ЭБ (75 мкМ) в 2 мМ Tris–HCl-буфере (pH 7,1); b – график Штерна–Фольмера, показывающий флуоресцентное титрование комплексов ЭБ с ДНК

Таблица 1. Параметры взаимодействия DP–CA и CA с ДНК и комплексами ЭБ–ДНК

Соединение	$K_b \times 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$K_{sv} \times 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$K_q \times 10^{11} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$\log K_a$	$K_a \times 10^2 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	n	$K_{app} \times 10^5 \text{ (M}^{-1}\text{)}$
CA	1	6,9	69,1	7,31	0,86	1,86	0,83
DP–CA	1	0,19	1,9	2,66	4,57	0,646	1

Примечание. K_b – константа связывания в УФ-видимом свете; K_{sv} – константы тушения Штерна–Фольмера; $\log K_a$ – логарифм константы связывания с ЭБ–ДНК; n – количество сайтов связывания; K_{app} – кажущаяся константа связывания.

Ингибирование ацетилхолинэстеразы препаратом DP–CA исследовали с помощью колориметрического метода, разработанного Ellman et al. [34] в 1961 г. Согласно этому методу, АХЭ гидролизует иодид ацетилтиохолина с образованием ацетата и тиохолина. Тиохоллин превращает специфический хромогенный субстрат ДТНБ в нитробензоат, который поглощает при 412 нм. Полученные результаты свидетельствуют о том, что DP–CA ингибирует АХЭ более эффективно, чем только DP или CA (табл. 2).

Защита клеток от повреждений, индуцируемых H_2O_2 . Известно, что окислительный стресс, связанный с нейротоксичностью, влияет на патогенез и прогрессирование нейродегенеративных заболеваний. Поэтому мы оценили защитный эффект DP–CA против индуцированного перекисью водорода (H_2O_2) окислительного повреждения в клетках глиобластомы U-118 MG. Так как мы использовали несколько экспериментальных серий, наши исследования требовали большого количества клеток. Как правило, количество доступных первичных нейронов недостаточно для использования в моделях с высоким уровнем клеточной гибели (например, модели окислительного стресса), поэтому в исследованиях такого типа используют нейрональные раковые клеточные линии, и поэтому мы остановили выбор на клеточной линии глиобластомы U-118 MG.

Создание модели H_2O_2 -индуцированного повреждения клеток на основе клеточной линии

глиобластомы U-118 MG. В предыдущем исследовании было показано, что H_2O_2 (62,5–1000 мкМ) значительно увеличивала гибель клеток U-118 MG в зависимости от концентрации. H_2O_2 в концентрации 250 мкМ снижала жизнеспособность клеток на 50–60%. Поэтому мы использовали 250 мкМ H_2O_2 , чтобы индуцировать повреждения клеток в нашем эксперименте ($p < 0,001$).

Влияние DP–CA и CA на жизнеспособность клеток U-118 MG. Различия жизнеспособности клеток, обработанных 3 мкМ и 9 мкМ DP–CA, и контрольных клеток были незначительны, но статистически достоверны (рис. 3). В сравнении с контрольной группой, высокие концентрации CA существенно снижали жизнеспособность клеток U-118 MG.

Защитный эффект DP–CA против окислительных повреждений клеток U-118 MG. Клетки U-118 MG предварительно обрабатывали H_2O_2 в течение 1 ч. Затем, к этим клеткам добавляли DP–CA и инкубировали в течение 20 ч. Жизнеспособность клеток, инкубированных с различными концентрациями DP–CA, сравнивали с жизнеспособностью клеток, обработанных только перекисью водорода. Различия между группами сравнения оказались статистически достоверными ($p < 0,001$) (рис. 4).

Когда к клеткам U-118 MG добавляли или CA, или DP–CA не наблюдалось снижения жизнеспособности клеток по сравнению с контрольной группой. Однако введение DP–CA во всех испытанных концентрациях клеткам, подвергшимся H_2O_2 -индуцированному окислительному повреждению, значительно повышало жизнеспособность клеток по сравнению с группой, получавшей H_2O_2 .

Молекулярный докинг. Чтобы проверить результаты молекулярного докинга, мы использовали позиции связывания лиганда в кристаллической структуре белка 4EY7 (комплекс рекомбинантной АХЭ человека с донепезилом в качестве лиганда; E20-604). Позиция донепезила в структуре АХЭ была повторно состыкована в активный сайт АХЭ, чтобы проверить корректность использования

Таблица 2. Значения IC_{50} для ингибирования АХЭ анализируемыми соединениями

Соединение	$\text{IC}_{50} \text{ (мкМ)}^*$
DP	$248,19 \pm 7,3$
CA	$150,41 \pm 5,2$
DP–CA	$25,84 \pm 2,1$

Примечание. * – IC_{50} , концентрация ингибитора, при которой достигается 50%-ная инактивация АХЭ. Полученные данные представлены в виде среднего значения $\pm$ среднее квадратичное отклонение для трех независимых экспериментов.

для докинга программы AutoDock Vina для АХЭ. Десять новых конформаций сравнивали путем наложения позиций в кристалле. Рецепторная сетка была ограничена остатками, образующими взаимодействия в области, заполненной донепезилом. Мы обнаружили, что структуры лиганда и повторно стыкованного лиганда в кристаллической структуре АХЭ практически перекрываются. Более того, при повторном докинге лиганд имел такую же ориентацию и конформационное положение, как и в кристаллической структуре сайта связывания АХЭ. Результат докинга считался приемлемым, если среднее значение среднеквадратичного отклонения (RMSD) для позиций докинга было меньше порогового значения 2,0 Å. Между позами стыковки и конформацией кристалла среднее среднеквадратичное отклонение для донепезила в нашем исследовании составляло 0,9521 Å. Таким образом, мы продемонстрировали, что программное обеспечение AutoDock Vina правильно воспроизвела паттерны связывания в кристаллической структуре АХЭ.

Молекулярный электростатический потенциал (МЭП). Перед запуском процесса докинга необходимо определить первоначальную интерпретацию взаимодействия функциональных групп и атомов с белком-мишенью, что требует изучения электрофильных и нуклеофильных доменов соединения. Для подтверждения ингибирующего средства препаратов важно продемонстрировать существование молекулярного электростатического потенциала [48–50]. Мы использовали метод адаптивного растворителя Пуассона–Больцмана (APBS) для оценки карты МЭП синтезированного соединения (рис. 5). На рис. 5 большие области с отрицательным значением МЭП (красный цвет) являются предпочтительными областями для электрофильной атаки, поскольку отрицательно заряженные области притягивают электрофилы. Напротив, синие области будут насыщены в противоположном направлении [51]. Небольшие области перехода от красного цвета к синему внутри обширной зеленой области, представляющей большую часть поверхности

	Mean±SD	F	p
DP-CA 9 µM	97,385±1.971 ^c	4.765	0.008*
DP-CA 3 µM	96,645±2.127 ^c		
DP-CA 1 µM	98,065±2.346		
Control	100,000±0.000 ^{a,b}		

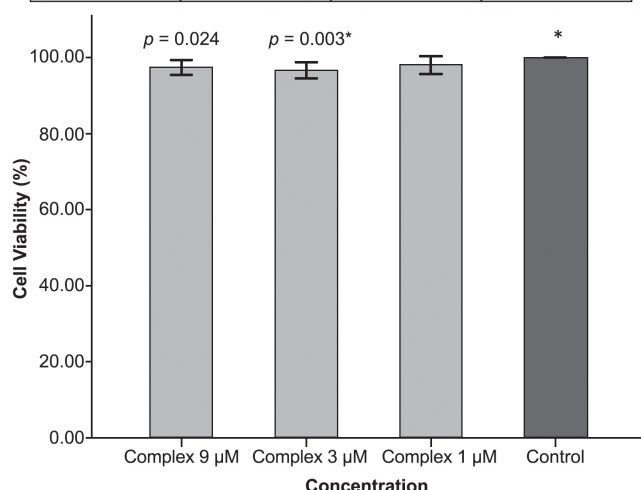


Рис. 3. Влияние DP–CA на жизнеспособность клеток U-118 MG. Таблица-вставка: статистические данные о влиянии DP–CA на жизнеспособность клеток. Метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA): $\alpha = 0,05$; *post-hoc*: тест Даннета, тест среднего взвешенного Тьюки, тест Тамхейна Т2. * Значительные статистические различия с: ^a – группа 9 мкМ DP–CA; ^b – группа 3 мкМ DP–CA; ^c – контрольная группа

	Mean±SD	F	p
H ₂ O ₂ +CA9 µM	55,267±3.025 ^{d,e}	292,875	p<0.001*
H ₂ O ₂ +CA3 µM	50,963±5.678 ^{d,e}		
H ₂ O ₂ +CA1 µM	52,687±4.041 ^{d,e}		
H ₂ O ₂	42,720±3.531 ^{a,b,c,e}		
Control	100,000±0.000 ^{a,b,c,d}		

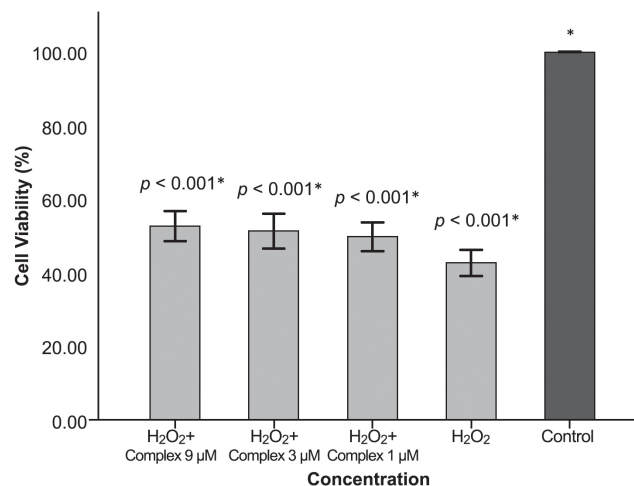


Рис. 4. Влияние DP–CA на жизнеспособность клеток U-118 MG, подвергшихся окислительным повреждениям в результате действия H₂O₂ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA: $\alpha = 0,05$; *post-hoc*: тест Даннета, тест среднего взвешенного Тьюки; тест Тамхейна Т2. * Значительные статистические различия с: ^a – H₂O₂ + 9 мкМ DP–CA; ^b – H₂O₂ + 3 мкМ DP–CA; ^c – H₂O₂ + 1 мкМ DP–CA; ^d – H₂O₂ и ^e – контрольные клетки

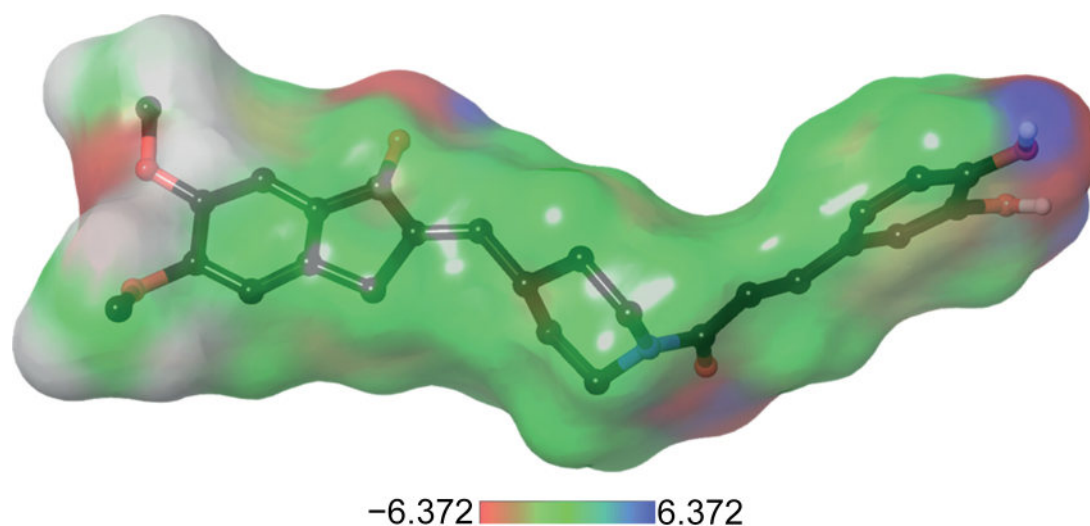


Рис. 5. Молекулярный электростатический потенциал поверхности молекулы DP-CA

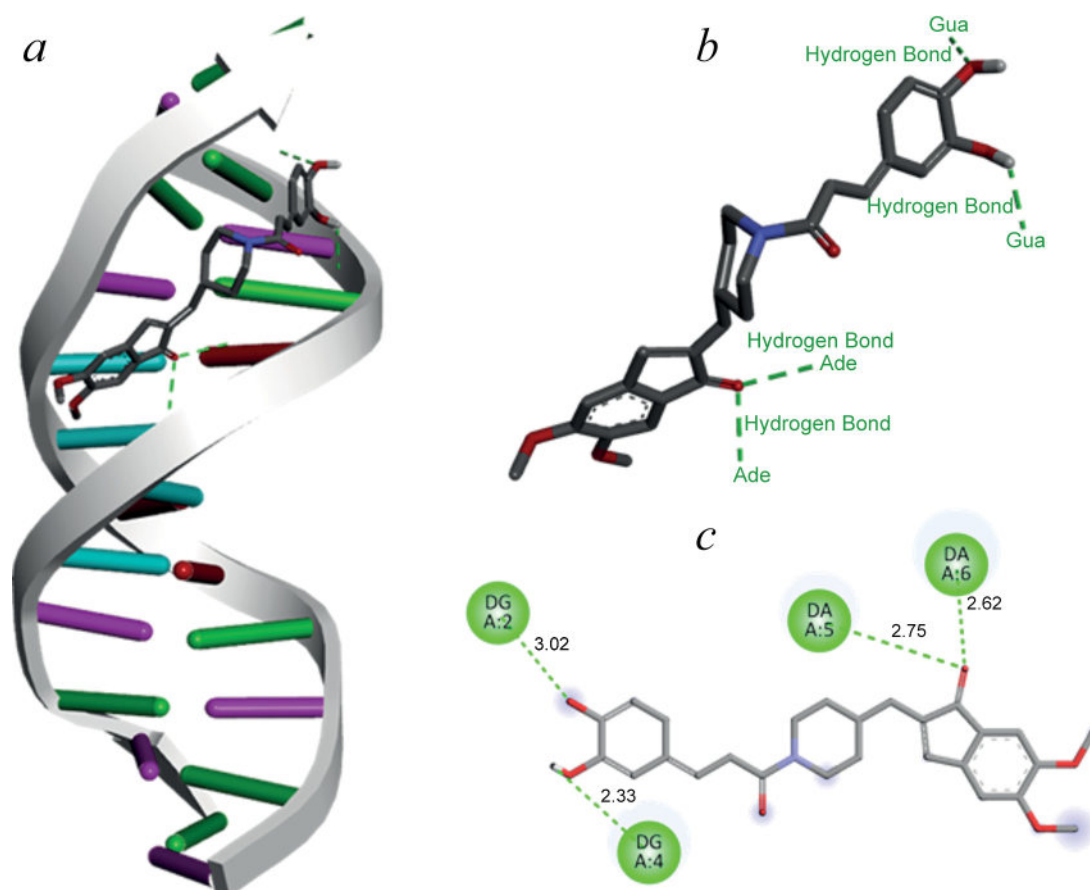


Рис. 6. Изображение взаимодействия IBNA и DP-CA в наилучшем ракурсе: 3D-изображение (a), типы связей (b), 2D-изображение (c)

молекулы, уравнивают гидрофильные и гидрофобные участки, необходимые для оптимального взаимодействия между белком и лигандом. Поскольку узнавание между рецепторами и лигандами происходит через поверхности их молекул, связывание лигандов с рецептором определяется в основном электростатическим потенциалом. Рассчитанный электростатиче-

ский потенциал DP-CA находится в диапазоне от $-6,372$ до $6,372$.

Результаты молекулярного докинга. Компьютерное моделирование, основанное на молекулярном докинге, является важным инструментом для предсказания аффинности связывания наиболее стабильных комплексов белок–лиганд и способа взаимодействия. Кроме

Табл. 3. Нуклеотидные основания, типы связей и длины связей в комплексе DP–CA с молекулой ДНК

	Показатель (ккал/моль)	Взаимодействия	Длина (Å)	Тип связи	От	До
DP–CA–ДНК	–9,2	:DPCA:H – A:DG4:O4'	2,33315	водородная связь	:DPCA:H	A:DG4:O4'
		A:DG2:H21 – :DPCA:O	3,0209	водородная связь	A:DG2:H21	:DPCA:O
		A:DA5:H3 – :DPCA:O	2,74616	водородная связь	A:DA5:H3	:DPCA:O
		A:DA6:H3 – :DPCA:O	2,61946	водородная связь	A:DA6:H3	:DPCA:O

того, молекулярный докинг может помочь в разработке новых эффективных соединений, обеспечивая информацией о механизме связывания лекарств и кандидатов в лекарства [37]. В настоящей работе мы провели молекулярный докинг, чтобы получить подробные данные о взаимодействиях в комплексах DP–CA–1BNA и DP–CA–4EY7. В соответствии с аффинностью связывания, полученной по результатам молекулярного докинга, DP–CA проявлял высокое сродство к 1BNA (–9,2 ккал/моль). На рис. 6 графически представлены взаимодействия между ДНК и DP–CA. Типы связей и взаимодействующие атомы и нуклеотидные основания показаны в табл. 3.

Изучение структуры, образованной DP–CA и ДНК, показало преобладание в этом комплексе водородных связей. Длина четырех водородных связей не превышала 3 Å. Три из них

образовались между адениновыми и гуаниновыми основаниями в А-цепи ДНК и атомами кислорода в функциональных группах DP–CA (табл. 3). Четвертая водородная связь образована с атомом кислорода карбонильной группы в бензилпиперидиновой области молекулы DP–CA. Отсутствие взаимодействий между образованными водородными связями и парами оснований ДНК указывает на то, что молекула DP–CA связывается в бороздке ДНК.

Второе исследование молекулярного докинга для DP–CA было проведено с АХЭ. Двумя основными сайтами связывания в кристаллической структуре АХЭ являются каталитический активный центр (CAS) и периферический анионный центр (PAS), при этом карман активного центра образован промежутком между этими двумя центрами (рис. 7). Если считать эту область воротами, то CAS располагается

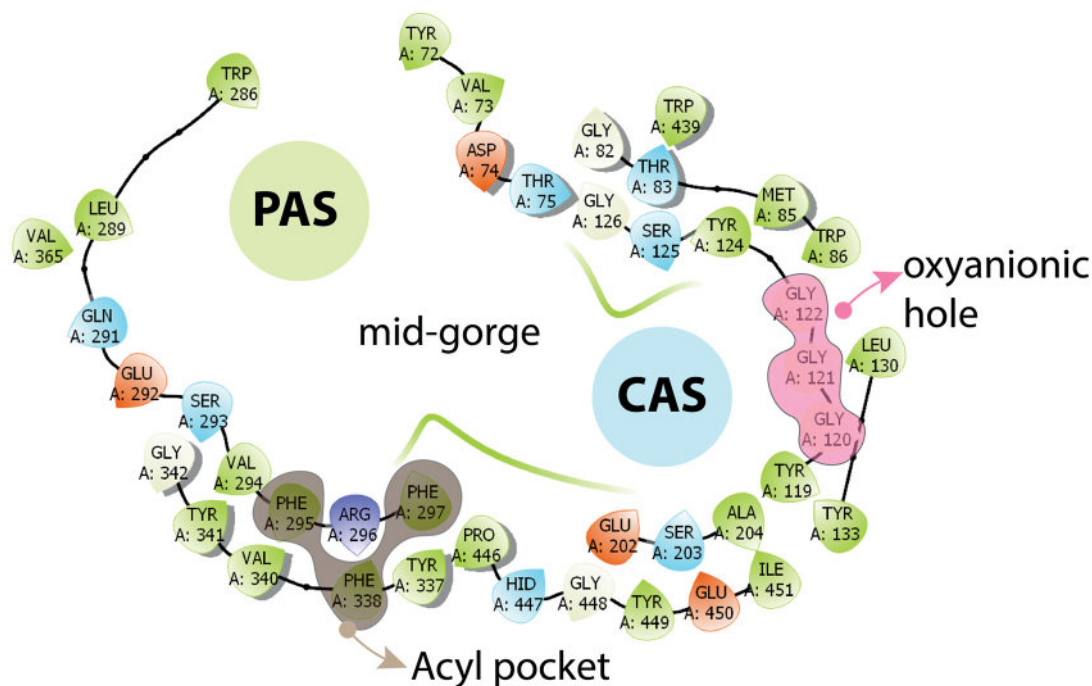


Рис. 7. PAS, CAS и расположенный между ними карман 4EY7

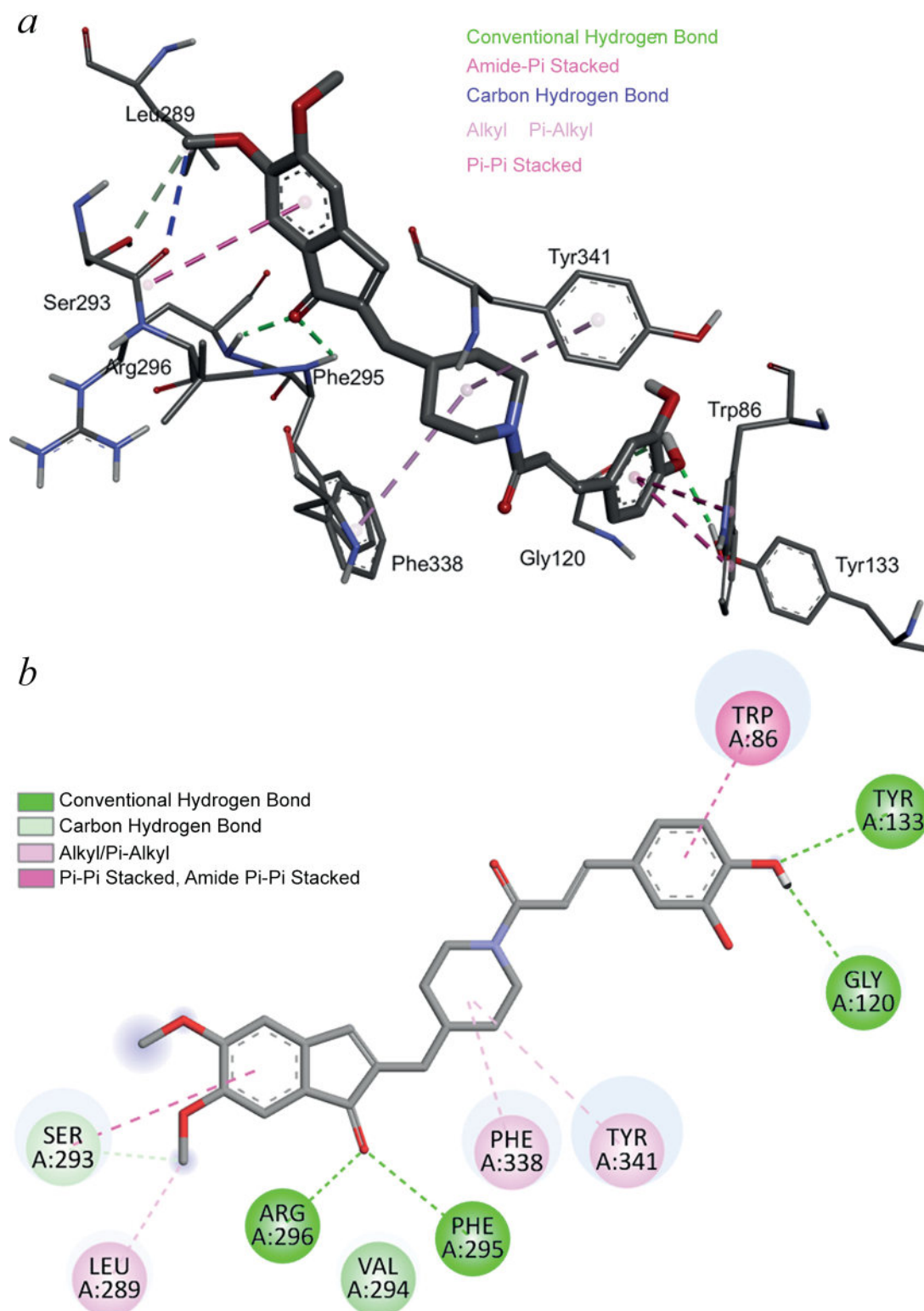


Рис. 8. Изображение взаимодействия между 4EY7 и DP-CA в наилучшем ракурсе: 3D-структура (a), 2D-структура (b)

в нижней части ворот, а PAS находится вблизи входа в ворота и на расстоянии примерно в 15 Å от CAS [52]. CAS-область содержит а.о. Trp86, Tyr133, Glu202, Ser203, Tyr337, Phe338 и His447. В PAS-области были идентифицированы следующие значимые а.о.: Tyr72, Asp74, Tyr124,

Trp286, Phe295 и Tyr341 [53]. В целом ингибиторы, взаимодействующие с а.о. в любой из этих областей, могут подавлять активность АХЭ. В кристаллической структуре 4EY7 ингибитор донепезил (E20-604) гармонично расположился на этом участке благодаря его взаимодействию

Табл. 4. Взаимодействия и аминокислотные остатки, задействованные в ингибировании 4EY7

	Показатель (ккал/моль)	Взаимодействия	Длина (Å)	Тип связи	От	До
DP-CA-4EY7	–11,6	A:TYR133:HN – :DPCA:O32	2,34646	водородная связь	A:TYR133:HN	:DPCA:O32
		A:PHE295:HN – :DPCA:O10	2,24204	водородная связь	A:PHE295:HN	:DPCA:O10
		A:ARG296:HN – :DPCA:O10	2,14378	водородная связь	A:ARG296:HN	:DPCA:O10
		:DPCA:H59 – A:GLY120:O	2,42199	водородная связь	:DPCA:H59	A:GLY120:O
		:DPCA:C19 – A:SER293:O	3,58661	водородная связь	:DPCA:C19	A:SER293:O
		:DPCA:C19 – A:SER293:OG	3,52283	водородная связь	:DPCA:C19	A:SER293:OG
		A:TRP86 – :DPCA	4,5967	гидрофобная	A:TRP86	:DPCA
		A:TRP86 – :DPCA	4,30224	гидрофобная	A:TRP86	:DPCA
		A:SER293:C,O;VAL294:N :DPCA	4,89815	гидрофобная	A:SER293:C,O; VAL294:N	:DPCA
		:DPCA:C19 – A:LEU289	4,80823	гидрофобная	:DPCA:C19	A:LEU289
		A:TRP286 – :DPCA:C21	4,50955	гидрофобная	A:TRP286	:DPCA:C21
		A:TRP286 – :DPCA:C21	4,94636	гидрофобная	A:TRP286	:DPCA:C21
		A:PHE338 – :DPCA	5,02035	гидрофобная	A:PHE338	:DPCA
		A:TYR341 – :DPCA	3,69428	гидрофобная	A:TYR341	:DPCA

с а.о., расположенными в областях CAS и PAS. При изучении взаимодействий в комплексе донепезил–АХЭ (три основных компонента донепезила вместе с активным центром АХЭ и бензильной группой) было показано, что пиперидин взаимодействует через азотные диметоксииндановые фрагменты. Аминокислоты, образующие области PAS, CAS, среднего ущелья и их окружение также образуют несколько небольших субобластей, включая оксианионную дырку, ацильный карман и каталитическую триаду (серин, гистидин и глутаминовая кислота). Аминокислоты в этих областях ответственны за субстратную селективность и стабильное связывание ингибитора в активном центре [52].

Молекулярное моделирование взаимодействий между DP-CA и 4EY7 показало, что в них в основном задействованы водородные связи и гидрофобные взаимодействия. Кроме того, атомы кислорода в функциональных группах гибридной молекулы DP-CA образуют

Н-связи с а.о. Tyr133, Phe295 и Arg296 активного центра 4EY7. С другой стороны, а.о. Gly120 и Ser293 взаимодействовали через гидроксильную группу, связанную с бензольным кольцом и метоксигруппой, и через бензольное кольцо, к которому эта группа была прикреплена соответственно. В гидрофобных взаимодействиях между DP-CA и белком участвуют а.о. Trp286, Phe338, Tyr341, Ser293, Val264 и Leu289. Поскольку образующиеся при докинге Н-связи и гидрофобные взаимодействия происходят по ароматическим кольцам лиганда и взаимодействующим аминокислотам, было высказано предположение, что молекула лиганда прочно расположена в активном центре 4EY7 (для получения подробной информации об этом взаимодействии см. табл. 4 и рис. 8).

В заключение, мы разработали и синтезировали новый многоцелевой лиганд против болезни Альцгеймера путем слияния фармакофоров донепезила и кофейной кислоты и провели

его предварительную биологическую оценку. Исследования связывания синтезированного DP–CA с молекулой ДНК, проведенные с использованием методов УФ-видимой и флуоресцентной спектроскопии, показали, что DP–CA прочно и нековалентно связывается с ДНК (путем интеркаляции и связывания с бороздкой ДНК). Исследования *in vitro* показали защитный эффект DP–CA при нейротоксичности, вызванной H₂O₂. Данные о ДНК/белок-связывающей активности DP–CA были подтверждены молекулярным докингом, который показал, что DP–CA обладает высокой аффинностью и образует как полярные, так и неполярные контакты с незаменимыми а.о. в активном центре 4EY7.

Наши результаты подтверждают идею о том, что использование стратегии направленных многоцелевых лигандов может быть альтернативой высокоэффективной терапии при лечении нейродегенеративных заболеваний, благодаря меньшему количеству побочных эффектов. Наблюдаемый защитный эффект может быть связан с ингибированием ключевого фермента холинергической системы, связанного с функцией памяти. Наши результаты могут быть полезны при изучении синтеза соединений с двумя разными каркасами, исследовании более широких взаимосвязей структура–активность, изучении кинетики ингибирования ацетилхолинэстеразы, изучении перехода через гематоэнцефалический барьер *in vivo* и т.д. В наших будущих работах будет проверено действие DP–CA на животных моделях.

Вклад авторов. D. Kiliçaslan – концептуализация, написание, исходная идея, руководство, ресурсы; A. N. Kurt – визуализация, работа с клеточными культурами, написание, обзор, редактирование; M. Köse – визуализация, изучение, написание, обзор, редактирование; M. Çeşme – выполнение работ по молекулярному докингу, обзор, редактирование; Ö. Güngör – эксперименты по ингибированию фермента; C. K. Oztabag – эксперименты с клеточными культурами; A. Doganer – статистическая обработка результатов культивирования клеток.

Финансирование. Авторы выражают благодарность научному отделу университета Кахраманмараш Сютчу Имам (Kahramanmaraş Sutcu Imam University Research Unit) (проект № 2019/3-21 М) за оказанную финансовую поддержку.

Благодарности. Авторы выражают благодарность отделу координации научно-исследовательских проектов университета Кахраманмараш Сютчу Имам за представленную Ö. Güngör стажировку в качестве постдока (DOSAP).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте: <https://www.springer.com/journal/10541>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abeysinghe, A. A. D. T., Deshapriya, R. D. U. S., and Udawatte, C. (2020) Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions, *Life Sci.*, **256**, 117996, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117996.
2. Davies, P., and Maloney, A. J. F. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease, *Lancet*, **308**, 1403, doi: 10.1016/S0140-6736(76)91936-X.
3. Corkin, S. (1981) Acetylcholine, aging and Alzheimer's disease. Implications for treatment, *Trends Neurosci.*, **4**, 287-290, doi: 10.1016/0166-2236(81)90090-4.
4. Seltzer, B. (2007) Is long-term treatment of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitor therapy justified? *Drugs Aging*, **24**, 881-890, doi: 10.2165/00002512-200724110-00001.
5. Schmitt, B., Bernhardt, T., Moeller, H. J., Heuser, I., and Frolich, L. (2004) Combination therapy in Alzheimer's disease: a review of current evidence, *CNS Drugs*, **18**, 827-844, doi: 10.2165/00023210-200418130-00001.
6. Minarini, A., Milelli, A., Tumiatti, V., Rosini, M., Simoni, E., Bolognesi, M. L., Andrisano, V., Bartolini, M., Motori, E., Angeloni, C., and Hrelia, S. (2012) Cystamine-tacrine dimer: a new multi-target-directed ligand as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease treatment, *Neuropharmacology*, **62**, 997-1003, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.10.007.
7. Galdeano, C., Viayna, E., Sola, I., Formosa, X., Camps, P., Badia, A., Clos, M. V., Relat, J., Ratia, M., Bartolini, M., Mancini, F., Andrisano, V., Salmona, M., Minguillon, C., Gonzalez-Munoz, G. C., Rodriguez Franco, M. I., Bidon-Chanal, A., Luque, F. J., and Munoz-Torrero, D. J. (2012) Huprine-tacrine heterodimers as anti-amyloidogenic compounds of potential interest against Alzheimer's and prion diseases, *Med. Chem.*, **55**, 661-669, doi: 10.1021/jm200840c.

8. Fernandez-Bachiller, M. I., Perez, C., Gonzalez-Munoz, G. C., Conde, S., Lopez, M. G., Villarroja, M., Garcia, A. G., and Rodriguez-Franco, M. I. (2010) Novel tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids as multi-functional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties, *Med. Chem.*, **53**, 4927-4937, doi: 10.1021/jm100329q.
9. Chen, Y., Sun, J., Fang, L., Liu, M., Peng, S., Liao, H., Lehmann, J., and Zhang, Y. J. (2012) Tacrine-ferulic acid-nitric oxide (NO) donor trihybrids as potent, multifunctional acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors, *Med. Chem.*, **55**, 4309-4321, doi: 10.1021/jm300106z.
10. Bolognesi, M. L., Banzi, R., Bartolini, M., Cavalli, A., Tarozzi, A., Andrisano, V., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., Bergamini, C., Fato, R., Lenaz, G., Hrelia, P., Cattaneo, A., Recanatini, M., and Melchiorre, C. (2007) Novel class of quinone-bearing polyamines as multi-target-directed ligands to combat Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.*, **50**, 4882-4897, doi: 10.1021/jm070559a.
11. Bajda, M., Guzior, N., Ignasik, M., and Malawska, B. (2011) Multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease treatment, *Curr. Med. Chem.*, **18**, 4949-4975, doi: 10.2174/092986711797535245.
12. Bolognesi, M. L., Simoni, E., Rosini, M., Minarini, A., Tumiatti, V., and Melchiorre, C. (2011) Multi-target-directed ligands: innovative chemical probes and therapeutic tools against Alzheimer's disease, *Curr. Top Med. Chem.*, **11**, 2797-2806, doi: 10.2174/156802611798184373.
13. Bolognesi, M. L., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., and Melchiorre, C. (2008) From dual binding site acetylcholinesterase inhibitors to multi-target-directed ligands (MTDLs): a step forward in the treatment of Alzheimer's disease, *Mini Rev. Med. Chem.*, **8**, 960-967, doi: 10.2174/138955708785740652.
14. Mohsi, N. A., and Ahmad, M. (2020) Donepezil: a review of the recent structural modifications and their impact on anti-Alzheimer activity, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **56**, 1-16, doi: 10.1590/s2175-97902019000418325.
15. Benchekroun, M., Ismaili, L., Pudlo, M., Luzet, V., Gharbi, T., Refouvelet, B., and Marcj-Contelles, J. (2015) Donepezil-ferulic acid hybrids as anti-Alzheimer drugs, *Fut. Med. Chem.*, **7**, 15-21, doi: 10.4155/fmc.14.148.
16. Dias, K. S. T., de Paula, C. T., dos Santos, T., Souza, I. N., Boni, M. S., Guimarães, M. J., da Silva, F. M. R., Castro, N. G., Neves, G. A., Veloso, C. C., Coelho, M. M., de Melo, I. S. F., Giusti, F. C. V., Giusti-Paiva, A., da Silva, M. L., Dardenne, L. E., Guedes, I. A., Pruccoli, L., Morroni, F., Tarozzi, A., and Viegas, C. Jr. (2017) Design, synthesis and evaluation of novel feruloyl-donepezil hybrids as potential multitarget drugs for the treatment of Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.*, **130**, 440-457, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.02.043.
17. Yan, J., Hu, J., Liu, A., He, L., Li, X., and Wei, H. (2017), Design, synthesis, and evaluation of multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease based on the fusion of donepezil and curcumin, *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 2946-2955, doi: 10.1016/j.bmc.2017.02.048.
18. Alonso, D., Dorronsoro, I., Rubio, L., Munoz, P., García-Palomero, E., Del Monte, M., Bidon-Chanal, A., Orozco, M., Luque, F. J., Castro, A., Medina, M., and Martínez, A. (2005) Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 6588-6597, doi: 10.1016/j.bmc.2005.09.029.
19. Sepsova, V., Karasova, J. Z., Tobin, G., Jun, D., Korabecny, J., Cabelova, P., Janska, K., Krusek, J., Skrenkova, K., Kuca, K., and Soukup, O. (2015) Cholinergic properties of new 7-methoxytacrine-donepezil derivatives, *Gen. Physiol. Biophys.*, **34**, 189-200, doi: 10.4149/gpb_2014036.
20. Xie, S. S., Lan, J. S., Wang, X., Wang, Z. M., Jiang, N., Li, F., Wu, J.-J., Wang, J., and Kong, L.-Yi (2016) Design, synthesis and biological evaluation of novel donepezil-coumarin hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 1528-1539, doi: 10.1016/j.bmc.2016.02.023.
21. Shen, Y., Zhang, J., Sheng, Dong, R. X., He, Q., Yang, B., and Hu, Y. (2009) Synthesis and biological evaluation of novel flavonoid derivatives as dual binding acetylcholinesterase inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **24**, 372-380, doi: 10.1080/14756360802187885.
22. Rodríguez-Franco, M. I., Fernández-Bachiller, M. I., Pérez, C., Castro, A., and Martínez, A. (2005) Design and synthesis of N-benzylpiperidine-purine derivatives as new dual inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 6795-6802, doi: 10.1016/j.bmc.2005.07.019.
23. Moridani, M. Y., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., Salehi, P., and O'Brien, P. J. (2001) Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation, *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1432-1439.
24. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45**, 287-306, doi: 10.1080/1040869059096.
25. Touaibia, M., Jean-François, J., and Doiron, J. (2011) Caffeic acid, a versatile pharmacophore: an overview, *Mini Rev. Med. Chem.*, **11**, 695-713, doi: 10.2174/138955711796268750.
26. Rehman, U. M., and Sultana, S. (2011) Attenuation of oxidative stress, inflammation and early markers of tumor promotion by caffeic acid in Fe-NTA exposed kidneys of Wistar rats, *Mol. Cell Biochem.*, **357**, 115-124, doi: 10.1007/s11010-011-0881-7.
27. Roos, T. U., Heiss, E. H., Schwaiberger, A. V., Schachner, D., Sroka, I. M., Oberan, T., Vollmar, A. M., and Dirsch, V. M. (2011) Caffeic acid phenethyl ester

- inhibits PDGF-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of p38 MAPK, HIF-1 α , and heme oxygenase-1, *J. Nat. Prod.*, **74**, 352-356, doi: 10.1021/np100724f.
28. Scapagnini, G., Vasto, S., Abraham, N. G., Caruso, C., Zella, D., and Fabio, G. (2011) Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders, *Mol. Neurobiol.*, **44**, 192-201, doi: 10.1007/s12035-011-8181-5.
 29. Eom, T. K., Ryu, B., Lee, J. K., Byun, H. G., Park, S. J., and Kim, S. K. (2013) β -secretase inhibitory activity of phenolic acid conjugated chitoooligosaccharides, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **28**, 214-217, doi: 10.3109/14756366.2011.629197.
 30. Sul, D., Kim, H. S., Lee, D., Joo, S. S., Hwang, K. W., and Park, S. Y. (2009) Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation, *Life Sci.*, **84**, 257-262, doi: 10.1016/j.lfs.2008.12.001.
 31. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **39**, 44-84, doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
 32. Zhang, P., Tang, Y., Li, N. G., Zhu, Y., and Duan, J. A. (2014) Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives, *Molecules*, **19**, 16458-16476, doi: 10.3390/molecules191016458.
 33. Turgut, E., Gungor, O., Kirpik, H., Kose, A., Gungor, S. A., and Kose, M. (2021) Benzimidazole ligands with allyl, propargyl or allene groups, DNA binding properties, and molecular docking studies, *Appl. Organometallic Chem.*, **35**, e6323, doi: 10.1002/aoc.6323.
 34. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, Jr. V., and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95, doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
 35. Mohammadi-Khanaposhtani, M., Saeedi, M., Zafarghandi, N. S., Mahdavi, M., Sabourian, R., Razkenari, E. K., and Akbarzadeh, T. (2015) Potent acetylcholinesterase inhibitors: Design, synthesis, biological evaluation, and docking study of acridone linked to 1,2,3-triazole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, **92**, 799-806, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.01.044.
 36. Schrödinger Release 2021-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
 37. Isika, D., Çeşme, M., Osonga, F. J., and Sadik, O. A. (2020) Novel quercetin and apigenin-acetamide derivatives: Design, synthesis, characterization, biological evaluation and molecular docking studies, *RSC Adv.*, **10**, 25046-25058, doi: 10.1039/d0ra04559d.
 38. Adımcılar, V., Çeşme, M., Şenel, P., Danış, İ., Ünal, D., and Gölcü, A. (2021) Comparative study of cytotoxic activities, DNA binding and molecular docking interactions of anti-cancer agent epirubicin and its novel copper complex, *J. Mol. Struct.*, **1232**, 130072, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.130072.
 39. Onur, S., Çeşme, M., Köse, M., and Tümer, F. (2022) New imino-methoxy derivatives: design, synthesis, characterization, antimicrobial activity, DNA interaction and molecular docking studies, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **40**, 11082-11094, doi: 10.1080/07391102.2021.1955741.
 40. Ebru, U., Derya, K., Hakan, K. A., Bilge, A., and Adem, D. (2021) Melatonin metabolites protect human retinal pigment epithelial cells from death caused by oxidative stress, *Pharmaceut. Chem. J.*, **55**, 762-768, doi: 10.1016/j.exer.2004.02.003.
 41. Zurek, E., Szymanski, P., and Mikiciuk-Olasik, E. (2013) Synthesis and biological activity of new donepezil-hydrazinonicotinamide hybrids, *Drug Res.*, **63**, 137-144, doi: 10.1055/s-0033-1333735.
 42. Sugumaran, M., and Yokesk, K. M. (2012) Synthesis and biological activity of novel 2, 5-disubstituted benzimidazole derivatives, *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, **4**, 80-83.
 43. Pyle, A. M., Rehmann, J. P., Meshoyrer, R., Kumar, C. V., Turro, N. J., and Barton, J. K. (1989) Mixed-ligand complexes of ruthenium(II): factors governing binding to DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3051-3058, doi: 10.1021/ja00190a046.
 44. İçsel, C. (2013) Synthesis, crystal structures, spectroscopic, thermal and DNA binding properties of palladium (II) and platinum (II) complexes containing 2-(hydroxymethyl) pyridine and 2-(2-hydroxyethyl) pyridine ligands. PhD Thesis. Bursa Uludag University (Turkey).
 45. Rafique, B., Khalid, A. M., Akhtar, K., and Jabbar, A. (2013) Interaction of anti-cancer drug methotrexate with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Biosensors Bioelectronics*, **44**, 21-26, doi: 10.1016/j.bios.2012.12.028.
 46. Meyer-Almes, F. J., and Porschke, D. (1993) Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium, *Biochemistry*, **32**, 4246-4253, doi: 10.1021/bi00067a012.
 47. Baguley, B. C., and LeBret, M. (1984) Quenching of DNA-ethidium fluorescence by amsacrine and other antitumor agents: a possible electron-transfer effect, *Biochemistry*, **23**, 937-943, doi: 10.1021/bi00300a022.
 48. Sagaama, A., and Issaoui, N. (2020) Design, molecular docking analysis of an anti-inflammatory drug, computational analysis and intermolecular interactions energy studies of 1-benzothiophene-2-carboxylic acid, *Comput. Biol. Chem.*, **88**, 107348, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2020.107348.
 49. Şahin, I., Çeşme, M., Özgeriş, F. B., Güngör, Ö., and Tümer, F. (2022) Design and synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles: biological evaluation, *in silico* molecular docking and ADME screening, *J. Mol. Struct.*, **1247**, 131344, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.131344.

50. Raghi, K. R., Sherin, D. R., Saumya, M. J., Arun, P. S., Sobha, V. N., and Manojkumar, T. K. (2018) Computational study of molecular electrostatic potential, docking and dynamics simulations of gallic acid derivatives as ABL inhibitors, *Comput. Biol. Chem.*, **74**, 239-246, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.04.001.
51. Sepay, N., Sepay, N., Al Hoque, A., Mondal, R., Halder, U. C., and Muddassir, M. (2020) *In silico* fight against novel coronavirus by finding chromone derivatives as inhibitor of coronavirus main proteases enzyme, *Struct. Chem.*, **31**, 1831-1840, doi: 10.1007/s11224-020-01537-5.
52. Akhoun, B. A., Choudhary, S., Tiwari, H., Kumar, A., Barik, M. R., Rathor, L., Pandey, R. and Nargotra, A. (2020) Discovery of a new donepezil-like acetylcholinesterase inhibitor for targeting Alzheimer's disease: computational studies with biological validation, *J. Chem. Inf. Model.*, **60**, 4717-4729, doi: 10.1021/acs.jcim.0c00496.
53. Sağlık, B. N., Osmaniye, D., Çevik, U. A., Levent, S., Çavuşoğlu, B. K., Özkay, Y., and Kaplancıklı, Z. A. (2020) Design, Synthesis, and structure–activity relationships of thiazole analogs as anticholinesterase agents for Alzheimer's disease, *Molecules*, **25**, 312, doi: 10.3390/molecules25184312.

A NOVEL DONEPEZIL–CAFFEIC ACID HYBRID: SYNTHESIS, BIOLOGICAL EVALUATION, AND MOLECULAR DOCKING STUDIES

D. Kılıçaslan^{1*}, A. H. Kurt², M. Köse³,
M. Çeşme³, Ö. Güngör³, C. K. Oztabag⁴, A. Doganer⁵

¹ Afsin Vocational School, Department of Chemistry and Chemical Processing Technologies,
Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Kahramanmaraş, Turkey; E-mail: deryatrnc@ksu.edu.tr

² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Bolu Abant İzzet Baysal University, Bolu, Turkey

³ Department of Chemistry, Faculty of Art and Sciences, Kahramanmaraş Sutcu Imam University,
Kahramanmaraş, Turkey

⁴ Department of Interdisciplinary Neuroscience, Bolu Abant İzzet Baysal University, Institute of Health Sciences,
Bolu, Turkey

⁵ Department Biostatistics and Medical Informatics, Faculty of Medicine, Kahramanmaraş Sutcu Imam University,
Kahramanmaraş, Turkey

A novel donepezil–caffeic acid (DP-CA) hybrid molecule was designed, synthesis, and investigated by molecular modeling. Its biological activity and protective effect were investigated by the IR spectroscopy, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, and mass spectrometry. DP-CA was highly active against acetylcholine esterase and inhibited it at the micromolar concentrations. Fluorescence and UV-Vis spectroscopy studies showed strong binding of DP-CA to DNA. Moreover, DP-CA exhibited protective effects against H₂O₂-induced toxicity in U-118 MG glioblastoma cells. Finally, molecular docking showed a high affinity of DP-CA in all concentrations, and the active 4EY7 site exhibited essential residues with polar and apolar contacts. Taken together, these findings indicate that DP-CA could be a prospective multifunctional agent for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: donepezil, caffeic acid, hybrid molecule, acetylcholinesterase, molecular docking, protective effect

УДК 577.352.4

ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОГО K^+ -КАНАЛА NS1619 НА ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В СЕРДЦЕ ДИСТРОФИН-ДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ

© 2023 М.В. Дубинин^{1*}, В.С. Старинец², Ю.А. Челядникова¹, Н.В. Белослудцева²,
И.Б. Михеева², Д.К. Пенкина¹, А.Д. Игошкина¹, Е.Ю. Таланов²,
И.И. Киреев³, Д.Б. Зоров³, К.Н. Белослудцев^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»,
424000 Республика Марий Эл, Йошкар-Ола; электронная почта: dubinin1989@gmail.com

² ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
192290 Пушкино, Московская обл., Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.11.2022

После доработки 15.01.2023

Принята к публикации 15.01.2023

Дистрофин-дефицитная врожденная мышечная дистрофия (дистрофия Дюшенна) характеризуется нарушением ионного гомеостаза, важную роль в котором играют митохондрии. В настоящей работе на модели дистрофин-дефицитных *mdx*-мышей выявлено снижение эффективности транспорта ионов калия и общего содержания этого иона в митохондриях сердца. Оценено влияние на структуру и функцию органелл и состояние сердечной мышцы хронического введения производного бензимидазола NS1619, являющегося активатором Ca^{2+} -активируемого K^+ -канала большой проводимости (mitoBK_{Ca}). Показано, что NS1619 способствует улучшению транспорта K^+ и увеличению содержания иона в митохондриях сердца *mdx*-мышей, однако это не связано с изменением уровня белка mitoBK_{Ca} и экспрессии кодирующего его гена. Действие NS1619 сопровождается снижением интенсивности окислительного стресса, оцененного по уровню продуктов перекисного окисления липидов (МДА-продуктов), и нормализацией ультраструктуры митохондрий в сердце *mdx*-мышей. Кроме того, нами выявлены положительные изменения в ткани, выражающиеся в снижении уровня фиброза в сердце дистрофин-дефицитных животных, получавших NS1619. Отмечено, что NS1619 не оказывал существенного влияния на структуру и функцию митохондрий сердца животных «дикого типа». Обсуждаются механизмы влияния NS1619 на функцию митохондрий сердца мышей в условиях мышечной дистрофии Дюшенна и перспективы применения подхода для коррекции данной патологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дистрофия Дюшенна, сердце, митохондрии, NS1619, кальций-активируемый калиевый канал, BK_{Ca}.

DOI: 10.31857/S0320972523020045, EDN: QFYBNW

ВВЕДЕНИЕ

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — наиболее распространенная среди 9 типов наследственных мышечных дистрофий. Эта рецессивная, сцепленная с X-хромосомой, нервно-мышечная патология встречается в среднем у 1 из 3500 новорожденных мальчи-

ков, крайне редко клинические проявления обнаруживаются у гетерозиготных девочек [1, 2]. Отличительной чертой этого заболевания является прогрессирующая мышечная слабость, которая характерна уже для ранних этапов развития патологии. С возрастом развивается дыхательная недостаточность, когнитивная дисфункция, а также кардиомиопатия [3].

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ДНФ — 2,4-динитрофенол; МДА — малоновый диальдегид; МДД — мышечная дистрофия Дюшенна; мтДНК — митохондриальная ДНК; яДНК — ядерная ДНК; МРТ-пора — переходная пора проницаемости митохондрий; mitoBK_{Ca} — митохондриальный, активируемый ионами Ca^{2+} , калиевый канал.

* Адресат для корреспонденции.

Более чем у 90% пациентов мужского пола, страдающих МДД, в возрасте 18 лет наблюдаются признаки сердечной недостаточности [4], которая на поздних этапах чаще всего становится основной причиной смерти [4–6].

Известно, что мутации в одном из самых больших и сложно организованных генов человека, дистрофине, являются причиной МДД. Кодированный этим геном одноименный белок играет ключевую роль в обеспечении связи цитоскелета мышечных клеток с внеклеточным матриксом, поддерживая структурную целостность ткани и ее функциональную активность, и его отсутствие сопровождается прогрессирующей дестабилизацией мышечного волокна [3]. Это проявляется в многочисленных вторичных нарушениях и, прежде всего, в развитии окислительного стресса, нарушениях гомеостаза Ca^{2+} и продукции АТФ [7]. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что важную роль в развитии этих процессов играет митохондриальная дисфункция. Действительно, известно, что при дистрофии Дюшенна для митохондрий скелетных мышц характерно снижение активности окислительного фосфорилирования, гиперпродукция активных форм кислорода (АФК), а также нарушение способности аккумулировать большое количество ионов кальция в матриксе вследствие снижения устойчивости органелл к индукции МРТ-поры (переходной поры проницаемости митохондрий) и перестройки кальций-транспортующих систем [8–14]. Подобные изменения наблюдаются и в митохондриях сердца [15–17]. В то же время на ранних этапах развития МДД, когда дисфункция биоэнергетического аппарата скелетных мышц уже ярко выражена, в митохондриях сердца, напротив, отмечаются адаптационные явления, которые проявляются в увеличении эффективности окислительного фосфорилирования и улучшении способности транспортировать и удерживать ионы кальция в матриксе органелл [18–21]. Тем не менее это сопровождается гипертрофией сердца и электрофизиологическими нарушениями [21]. При этом нами было показано, что модуляция митохондриальной функции с помощью ингибитора МРТ-поры алиспоривира (неиммуносупрессорный аналог циклоспорина А) приводит к некоторому улучшению показателей функции сердечной мышцы и устранению гипертрофии [21].

Одной из возможных терапевтических мишеней для коррекции митохондриальных дисфункций является гомеостаз ионов калия. Нарушение функционирования K^+ -каналов митохондрий играет важную роль в разви-

тии миопатий и, в частности, дилатационной кардиомиопатии различной этиологии [22–24], которая характерна также для мышечной дистрофии Дюшенна. Более того, недавно нами выявлено снижение эффективности транспорта ионов калия и общего уровня этого иона в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей [25, 26]. Известно, что внутренняя мембрана митохондрий содержит целый ряд переносчиков K^+ [27]. Более того, согласно последним представлениям, транспорт ионов калия в митохондриях может осуществляться с участием АТФ-синтазы [28–30]. Учитывая значительное нарушение функционирования кальций-зависимых процессов, в настоящей работе мы уделили внимание митохондриальному, активируемому ионами кальция, калиевому каналу ($\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$), чья активация обладает кардиопротекторным эффектом и защищает клетки от избыточного производства АФК и митохондриальной дисфункции [31]. Действительно, ранее было показано, что активация $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, вызванная производным бензимидазола NS1619, защищает клетки сердца при ишемии/реперфузии [32]. В настоящей работе мы оценили влияние этого агента на состояние сердечной мускулатуры дистрофин-дефицитных *mdx*-мышей и функциональную активность митохондрий сердца, включая интенсивность окислительного фосфорилирования, скорость транспорта и уровень ионов калия, устойчивость к индукции кальций-зависимой МРТ-поры, интенсивность окислительного стресса и ультраструктуру органелл. Ранее нами было показано, что NS1619 улучшает структуру и функционирование митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей и смягчает развитие деструктивных процессов в ткани [26]. Результаты настоящей работы подтверждают положительное влияние этого агента и на сердечную патологию при МДД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с использованием животных. В работе использованы 8-недельные дистрофин-дефицитные мыши линии C57BL/10ScSn-Dmdmdx и мыши линии C57BL/10 дикого типа. Животные были приобретены в НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино). Мыши были разделены на 4 группы ($n = 10$ в каждой группе): 1) мыши дикого типа (контроль); 2) контроль + NS1619; 3) *mdx*-мыши и 4) *mdx*-мыши, получавшие NS1619 (*mdx* + NS1619). NS1619 (5 мг/мл,

«Sigma-Aldrich», США) растворяли в смеси этанола и стерильного физиологического раствора (7,4 : 92,6 (v/v)) и вводили в объеме 150–200 мкл (0,5 мг/кг массы тела) на мышь внутривенно ежедневно в течение 4 недель. Контрольные группы получали инъекции растворителя в те же сроки и в том же объеме.

Гистологическое исследование. Для изучения степени выраженности гистологических изменений образцы ткани сердца (по 3 образца в каждой экспериментальной группе) фиксировали в нейтральном забуференном 10%-ном формалине и пропитывали в парафине. Парафиновые блоки разрезали на микротоме МС-2 («Точмедприбор», Украина) на серийные срезы толщиной 5 мкм. Предметные стекла, полученные из каждого образца, окрашивали гематоксилином по Ван-Гизону (HvG) [26]. Исследования препаратов проводили с использованием системы визуализации EVOS M5000 («Thermo Fisher Scientific», США). Все гистологические изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения ImageJ. Уровень фиброза в сердцах мышей оценивали как процентную долю участков, окрашенных HvG (розовые), которые содержали коллаген и другие элементы соединительной ткани в общей области ткани на гистологических предметных стеклах; при этом анализировали не менее 10 срезов для каждого образца органа.

Электронная микроскопия. Для электронной микроскопии отбирали кусочки сердца (левый желудочек, два образца в каждой группе). Образцы фиксировали в течение 2 ч в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида в 0,1 М PBS (pH 7,4) и 4 ч – в 2%-ном растворе тетраоксида осмия, обезвоживали в возрастающих концентрациях спирта и ацетона и заливали в эпоновую смолу. Из полученных эпоновых блоков получали ультратонкие срезы (60–70 нм), используя ультрамикротом Leica EM UC6 («Leica», Германия), которые впоследствии контрастировали раствором уранилацетата и цитратом свинца. Электронно-микроскопическую визуализацию проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1400 («JEOL», Япония) на базе ЦКП «Субдифракционная микроскопия» НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. Для каждой группы животных фотографировали не менее 40 непересекающихся полей зрения при увеличении 5000×. В результате получали электронно-микроскопические образцы (файл с расширением tif, 2808 × 2264 пикселей, 16 бит), которые анализировали с помощью программ-

ного обеспечения Image Tool 3.0. Для морфометрического анализа выбирали только такие митохондрии, через которые срез проходил по их короткой оси. Использовали рутинный способ измерения, требующий ручного контурирования поперечных сечений митохондрий по их наружной мембране [33]. Всего для анализа было отобрано до 200 профилей поперечных сечений митохондрий для каждой группы животных. Статистический анализ результатов проводили с помощью стандартного пакета программ GraphPad Prism 7.

Выделение митохондрий и оценка функциональных параметров. Сразу после извлечения сердца и отбора образцов для вышеуказанных исследований проводили выделение митохондрий общепринятым методом дифференциального центрифугирования, детальная методика и состав сред выделения приведены в предыдущих работах [19, 21]. Полученная суспензия митохондрий содержала 15–20 мг/мл митохондриального белка, концентрацию которого определяли по Бредфорду [34]. Скорость потребления O_2 митохондриями оценивали с помощью респирометра высокого разрешения Oxygraph-2k («Oroboros Instruments», Австрия) [35]. Среда инкубации содержала 120 мМ KCl, 5 мМ NaH_2PO_4 , 2,5 мМ малата калия, 2,5 мМ глутамата калия и 10 мМ Hepes/КОН (pH 7,4). Уровень липидных перекисей оценивали по взаимодействию с тиобарбитуровой кислотой [36]. Транспорт K^+ в митохондриях определяли по скорости 2,4-динитрофенол (ДНФ)-индуцированного выхода K^+ из органелл с помощью K^+ -селективного электрода, а общее содержание K^+ в митохондриях определялось путем последующей солиubilизации 0,1%-ным (w/v) Triton X-100 [26]. Среда инкубации содержала 180 мМ сахарозы, 70 мМ маннита, 5 мМ NaH_2PO_4 , 1 мкг/мл олигомицина и 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4). Концентрация митохондриального белка составляла 0,25 мг/мл. Поглощение Ca^{2+} митохондриями регистрировали с помощью колориметрического индикатора арсеназо III и планшетного спектрофотометра Tecan Spark 10M («Tecan», Швейцария) [12]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннита, 70 мМ сахарозы, 1 мМ KH_2PO_4 , 2,5 мМ малата, 2,5 мМ глутамата, 10 мМ ЭГТА, 50 мкМ арсеназо III и 10 мМ Hepes/КОН (pH 7,4). Суммарное количество добавленных ионов Ca^{2+} (пульсовые добавки 5 мкМ $CaCl_2$ каждые 90 с), вызывающее их спонтанное высвобождение из митохондрий вследствие индукции МРТ-поры, отражало кальциевую емкость органелл.

ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии гена, кодирующего mitoBK_{Ca}, определяли

методом ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции [26]. Тотальную РНК получали из 100 мг ткани сердца с помощью реактива ExtractRNA («Евроген», Россия), согласно протоколу производителя. ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора QuantStudio 1 («Thermo Fisher Scientific») с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген»), где в качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя используется SYBR Green II. Выбор и анализ ген-специфичных праймеров проводили с использованием Primer-BLAST [37] (последовательность олигонуклеотидов представлена в табл. 1). Нормирование проводили относительно гена *Rplp2*. Проводили вычисление параметра $2^{-\Delta Ct}$, где значение ΔCt рассчитывали по формуле $\Delta Ct = Ct$ (исследуемый ген) – Ct (*Rplp2*) [38].

Количественная оценка митохондриальной ДНК. Тотальную ДНК (ядерную (ядДНК) и митохондриальную (мтДНК)) выделяли из 10 мг ткани сердца с использованием набора ДНК-Экстран 2 («Синтол», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для проведения реакции использовали 1 нг общей ДНК. Оценку содержания мтДНК в ткани сердца проводили методом ПЦР, как описано ранее [39], и выражали как отношение мтДНК/ядДНК. В анализе оценивали уровни транскрипции гена *ND4*, кодируемого митохондриальным геномом, и гена *GAPDH*, кодируемого ядерным геномом (последовательность олигонуклеотидов представлена в табл. 1), что дает возможность оценить отношение количества копий мтДНК к количеству копий яДНК.

Иммуноблоттинг. Экстракты общего белка готовили из 10 мг замороженной сердечной мышцы. Для недопущения деградации белков использовали коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз («Sigma-Aldrich», США) в концентрациях 100 мкл/мл, а также PMSF (1 мМ), Na_3VO_4 (1 мМ), ЭГТА (1 мМ) и ЭДТА (1 мМ). Белки выделяли с использованием буфера RIPA («Millipore», США). Quick Start Bradford Protein Assay («Bio-Rad», США) использовали

для количественного определения содержания белка. Образцы разводили в буфере Лэммли («Bio-Rad») с последующим электрофоретическим разделением в 12,5%-ном SDS-ПААГ (10 мкг белка на дорожку) и переносом на нитроцеллюлозную мембрану («Amersham», Германия). После блокирования обезжиренным молоком мембраны инкубировали с соответствующими первичными антителами. Использовали поликлональные антитела anti-KCNMA1 («Thermo Fisher Scientific») и anti-COX IV («Abcam», США). Вторичные антитела были конъюгированы с пероксидазой хрена («Cell Signaling technology Inc.», США). Активность пероксидазы определяли с помощью хемилюминесцентных реагентов ECL («Pierce», США). Относительные уровни обнаруженных белков визуализировали с помощью системы LI-COR («LI-COR», США) с последующей нормализацией на уровень COX IV. Измерения оптической плотности проводили с помощью программного обеспечения LI-COR Image Studio.

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью GraphPad Prism 8.0.1 и однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Для последующего сравнения средних дисперсионного комплекса использовали тест Tukey. Результаты представляли в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

NS1619 улучшает транспорт ионов калия и увеличивает содержания K^+ в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных мышей. Недавно нами было показано, что в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей отмечается снижение эффективности транспорта ионов калия и общего содержания ионов калия в матриксе [25, 26]. В настоящей работе подобная картина выявлена и в случае

Таблица 1. Список ген-специфичных праймеров

Ген	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>BK_{Ca}-DEC</i>	GGTTTACAGATGAGCCGGATA	CATCTTCAACTTCTCTGATTGG
<i>Rplp2</i>	CGGCTCAACAAGGTCATCAGTGA	AGCAGAAACAGCCACAGCCCCAC
<i>Nd4</i>	ATTATTATTACCCGATGAGGGAACC	ATTAAGATGAGGGCAATTAGCAGT
<i>Gapdh</i>	GTGAGGGAGATGCYCAGTGT	CTGGCATTGCTCTCAATGAC

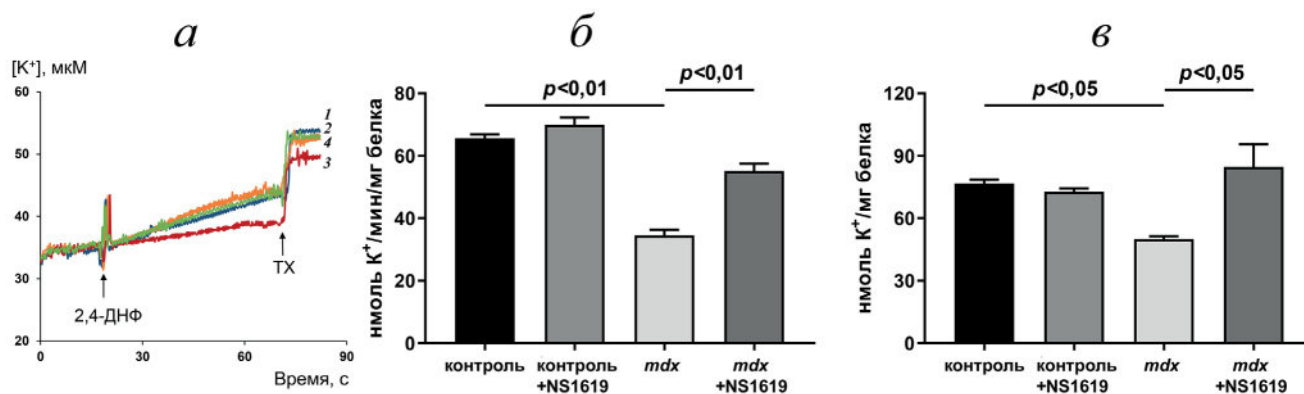


Рис. 1. Влияние NS1619 на скорость транспорта и уровень K^+ в митохондриях сердца экспериментальных групп мышей. *a* – ДНФ-индуцированный выход K^+ из митохондрий сердца мышей группы контроль (кривая 1), контроль + NS1619 (кривая 2), *mdx* (кривая 3) и *mdx* + NS1619 (кривая 4), измеренный при помощи K^+ -селективного электрода. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах. Максимальный выход K^+ из митохондрий индуцирован внесением Triton X-100 (TX). Скорость ДНФ-индуцированного выхода ионов калия из митохондрий сердца мышей (*б*) и общий уровень иона (*в*). Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$)

митохондрий сердца (рис. 1, *a*). Можно видеть, что в митохондриях, выделенных из сердца *mdx*-мышей, обнаруживается достоверное (в 1,9 раза) снижение скорости выхода K^+ в ответ на добавление ДНФ (рис. 1, *б*) по сравнению с митохондриями сердца мышей дикого типа. В этом случае общий уровень K^+ снижался в 1,5 раза по сравнению с контролем, и это снижение также было статистически значимым (рис. 1, *в*). Мы оценили влияние активатора mitoBK_{Ca} NS1619 на скорость транспорта и содержание ионов калия в митохондриях двух групп мышей. Установлено, что этот агент не влияет на скорость транспорта и общий уровень K^+ в митохондриях мышей дикого типа. В то же время в митохондриях сердца мышей группы *mdx* + NS1619 наблюдается достоверное увеличение как скорости транспорта K^+ , так и общего уровня этого иона.

NS1619 в микромолярных концентрациях является активатором mitoBK_{Ca} [40]. Мы оценили, связано ли влияние этого агента на скорость транспорта и содержание ионов калия с изменением уровня mitoBK_{Ca} в митохондриях сердца и экспрессии кодирующего его гена. Известно, что митохондриальный BK-канал в сердце кодируется сплайс-вариантом (VEDEC) гена *Kcnma1*, содержащего информацию о структуре цитоплазматического BK_{Ca} -канала [41]. Из рис. 2, *a* видно, что уровень экспрессии гена VEDEC не различается в сердечной мускулатуре *mdx*-животных и мышей дикого типа, при этом NS1619 не оказывает влияния на этот параметр. Эти результаты подтверждаются данными иммуноблоттинга – уровень mitoBK_{Ca} , оцененный в изолированных митохондриях (вследствие наличия BK-каналов цитоплазма-

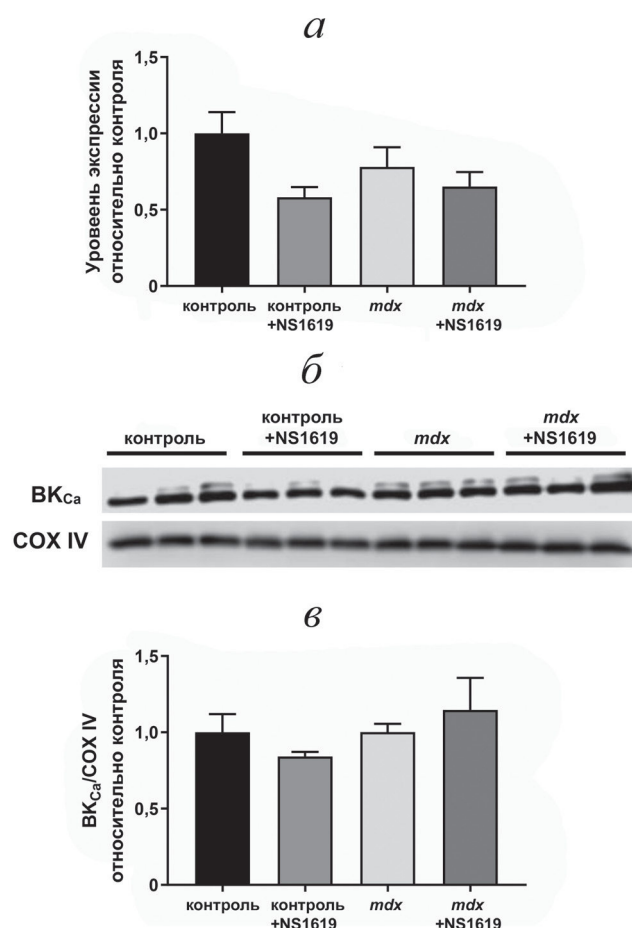


Рис. 2. Влияние NS1619 на уровень mitoBK_{Ca} в сердце мышей. *a* – Относительный уровень мРНК $BK\text{-}VEDEC$ (кодирует mitoBK_{Ca}) в сердце экспериментальных животных. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). *б* – Данные иммуноблоттинга mitoBK_{Ca} и COX IV, полученные на изолированных митохондриях сердца мышей. *в* – Относительное содержание mitoBK_{Ca} в митохондриях сердца мышей. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$)

тической и ядерной мембран в гомогенате ткани), также не различается между экспериментальными группами животных (рис. 2, б и в). Таким образом, снижение эффективности транспорта K^+ и общего уровня иона в митохондриях сердца *mdx*-мышей не связано с изменением уровня mitoBK_{Ca} в органеллах; и увеличение скорости транспорта и уровня этого иона в митохондриях под действием NS1619 также не является следствием изменения уровня белка.

NS1619 не влияет на дыхание митохондрий сердца *mdx*-мышей и кальцевую емкость, но снижает уровень перекисного окисления липидов. В следующей части работы мы оценили влияние NS1619 на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий сердца экспериментальных групп мышей. Ранее нами было показано, что митохондрии сердца молодых *mdx*-мышей возрастом до 12 недель характеризуются увеличением параметров дыхания и окислительного фосфорилирования [21]. Такая же картина обнаруживается и в настоящей работе (табл. 2). Можно видеть, что в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных животных, окисляющих субстраты комплекса I дыхательной цепи — 2,5 мМ глутамат и 2,5 мМ малат, наблюдается увеличение скорости ADP-стимулированного дыхания (состояние 3) в 1,9 раза, а также максимальной скорости дыхания в присутствии разобщителя ДНФ (состояние 3U_{днф}) в 1,8 раза по сравнению с митохондриями из животных дикого типа. Это также сопровождается увеличением параметров дыхательного контроля и ADP/O в 1,3 раза. При этом NS1619 не оказывает влияния на изучаемые параметры дыхания органелл как в группе дистрофин-дефицитных животных, так и у мышей дикого типа.

Ранее было показано, что кардиопротекторное действие NS1619, обусловленное активацией mitoBK_{Ca} , может быть связано с увеличением устойчивости митохондрий сердца к индукции кальций-зависимой МРТ-поры, а также снижением интенсивности окислительного стресса [41, 42]. Митохондрии сердца *mdx*-мышей обладают большей кальцевой емкостью, что позволяет сделать вывод о большей устойчивости митохондрий этих животных к открытию МРТ-поры (рис. 3, а). Это, как предположено нами ранее, может способствовать адаптации тканей сердца к перегрузке ионами кальция, наблюдаемой вследствие дисфункции саркоплазматического ретикула — основного депо ионов кальция в кардиомиоцитах [19]. С другой стороны, ранее нами была отмечена гиперпродукция АФК и продуктов перекисного окисления липидов в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных животных [19, 21]. В настоящей работе мы также выявили достоверное увеличение продукции одного из маркеров окислительного стресса, малонового диальдегида (МДА), в митохондриях сердца *mdx*-мышей по сравнению с животными дикого типа (рис 3, б). В этом случае в митохондриях сердца мышей, получавших NS1619, наблюдается тенденция к снижению кальцевой емкости, а в митохондриях контрольных животных этот показатель, напротив, достоверно увеличивается. При этом нами выявлено достоверное снижение уровня МДА-продуктов в митохондриях сердца мышей группы *mdx* + NS1619, что говорит об антиоксидантном влиянии этого агента.

NS1619 нормализует ультраструктуру митохондрий сердца *mdx*-мышей. Известно, что нарушение функционирования митохондрий при

Таблица 2. Влияние NS1619 на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий сердца экспериментальных животных

Животные (<i>n</i> = 4)	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{днф}	ДК, отн.ед.	ADP/O, отн.ед.
	нмоль O ₂ /мин/мг белка митохондрий				
Контроль	41,0 ± 4,4	17,0 ± 2,1	41,2 ± 3,7	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Контроль+NS1619	48,6 ± 4,3	19,0 ± 1,8	41,6 ± 2,6	2,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1
<i>mdx</i>	78,2 ± 8,5*	24,3 ± 2,7	72,7 ± 10,4*	3,2 ± 0,1*	2,1 ± 0,1*
<i>mdx</i> + NS1619	75,6 ± 9,9*	23,7 ± 3,5	70,8 ± 8,9*	3,3 ± 0,1*	2,3 ± 0,1*

Примечание. Состав среды инкубации: 120 мМ KCl, 5 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Hepes/KOH (pH 7,4). В качестве субстрата использовали 2,5 мМ глутамат и 2,5 мМ малат. Дыхание митохондрий в состоянии 3 инициировалось добавлением 200 мкМ ADP. Митохондриальное дыхание в состоянии 3U_{днф} инициировалось 50 мкМ ДНФ. ДК — дыхательный контроль, оцененный как соотношение дыхания в состояниях 3 и 4. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего. * $p < 0,05$ против контрольных животных.

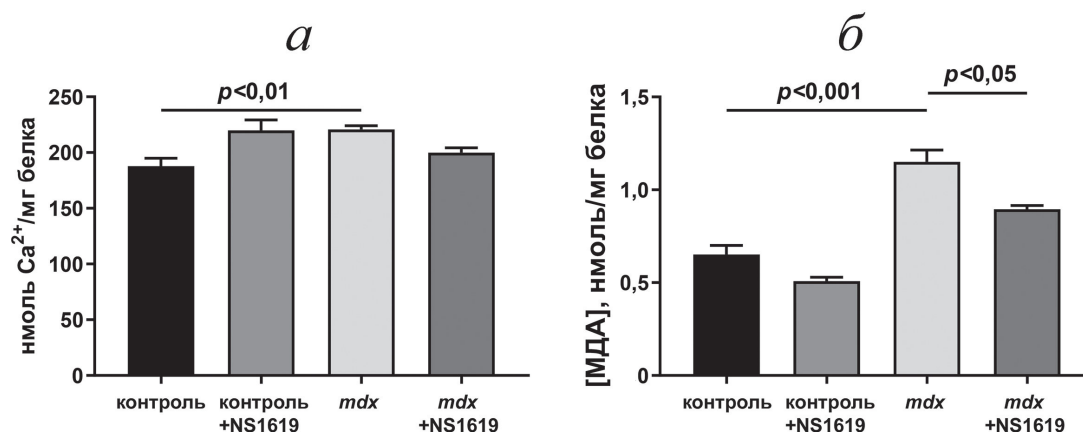


Рис. 3. Влияние NS1619 на кальциевую емкость, $n = 4$ (а) и уровень МДА-продуктов, $n = 3$ (б) в митохондриях сердца мышей. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего

дистрофии Дюшенна также сопровождается изменением их ультраструктуры, что характерно как для тканей скелетных мышц, так и для сердца [19, 21]. На рис. 4 представлены микрофотографии кардиомиоцитов четырех экспериментальных групп животных при малом и большом увеличении. В контрольной группе большая часть митохондрий имела продолговатую или овальную форму. Они были ориентированы вдоль продольной оси клетки и располагались между миофибриллами. Основная часть митохондрий имела четко очерченную наружную мембрану, электронно-плотный матрикс и многочисленные параллельно ориентированные плотно упакованные кристы (рис. 4, б и рис. П1, а в Приложении). Между собой митохондрии соединялись хорошо выраженными межмитохондриальными контактными структурами. Структура межфибриллярных митохондриальных компартментов группы контроль + NS1619 была сходна с группой контроля (рис. 4, г и рис. П1, б в Приложении). В кардиомиоцитах группы *mdx* обнаруживались митохондрии со значительным разнообразием ультраструктурной организации. В этих клетках митохондрии с электронно-плотным матриксом отсутствовали. Митохондрии характеризовались нерегулярной организацией митохондриальных крист и локальными зонами просветленного матрикса (рис. 4, е и рис. П1, в в Приложении). В области соединения митохондрий межмитохондриальные контакты были слабо выражены.

В свою очередь, межфибриллярные митохондрии в группе *mdx* + NS1619 имели структуру, приближающуюся к структуре митохондрий контрольной группы (рис. 4, з и рис. П1, г в Приложении). Можно отметить, что количество митохондрий в исследуемых полях зрения изменяется лишь в группе *mdx* + NS1619, в этом случае нами отмечено достоверное увеличение

их числа по сравнению с другими группами животных (рис. 5, а). В то же время содержание мтДНК в сердце не различается между всеми экспериментальными группами (рис. 5, в). Мы также оценили влияние NS1619 на размер митохондрий сердца мышей (рис. 5, б). Можно видеть, что животные контрольной группы и мыши *mdx* не различаются по периметру органелл. При этом NS1619 оказывает противоположное влияние на этот параметр, увеличивая его в сердце мышей дикого типа и, напротив, снижая в кардиомиоцитах *mdx*-мышей.

NS1619 снижает уровень фиброза в сердце *mdx*-мышей. Известно, что при МДД функциональная мышечная ткань замещается соединительной тканью — развивается фиброз, что характерно как для скелетной мускулатуры, так и для сердца [43]. Действительно, гистологический анализ по окрашиванию гематоксилином по Ван-Гизону показывает (рис. 6), что для сердца *mdx*-мышей характерно достоверное увеличение площади соединительной ткани по сравнению с животными дикого типа, что свидетельствует о более интенсивном развитии фиброза. Мы оценили, влияют ли митохондриальные эффекты NS1619 на состояние ткани сердца дистрофин-дефицитных мышей. Результаты показывают, что для *mdx*-мышей, получавших NS1619, характерно достоверное снижение площади фиброза до уровня контрольных животных (рис. 6). Таким образом NS1619 может смягчать развитие патологии, способствуя снижению интенсивности фиброза в сердце *mdx*-мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мышечная дистрофия Дюшенна является одной из наиболее распространенных нейромышечных патологий, которая характеризуется

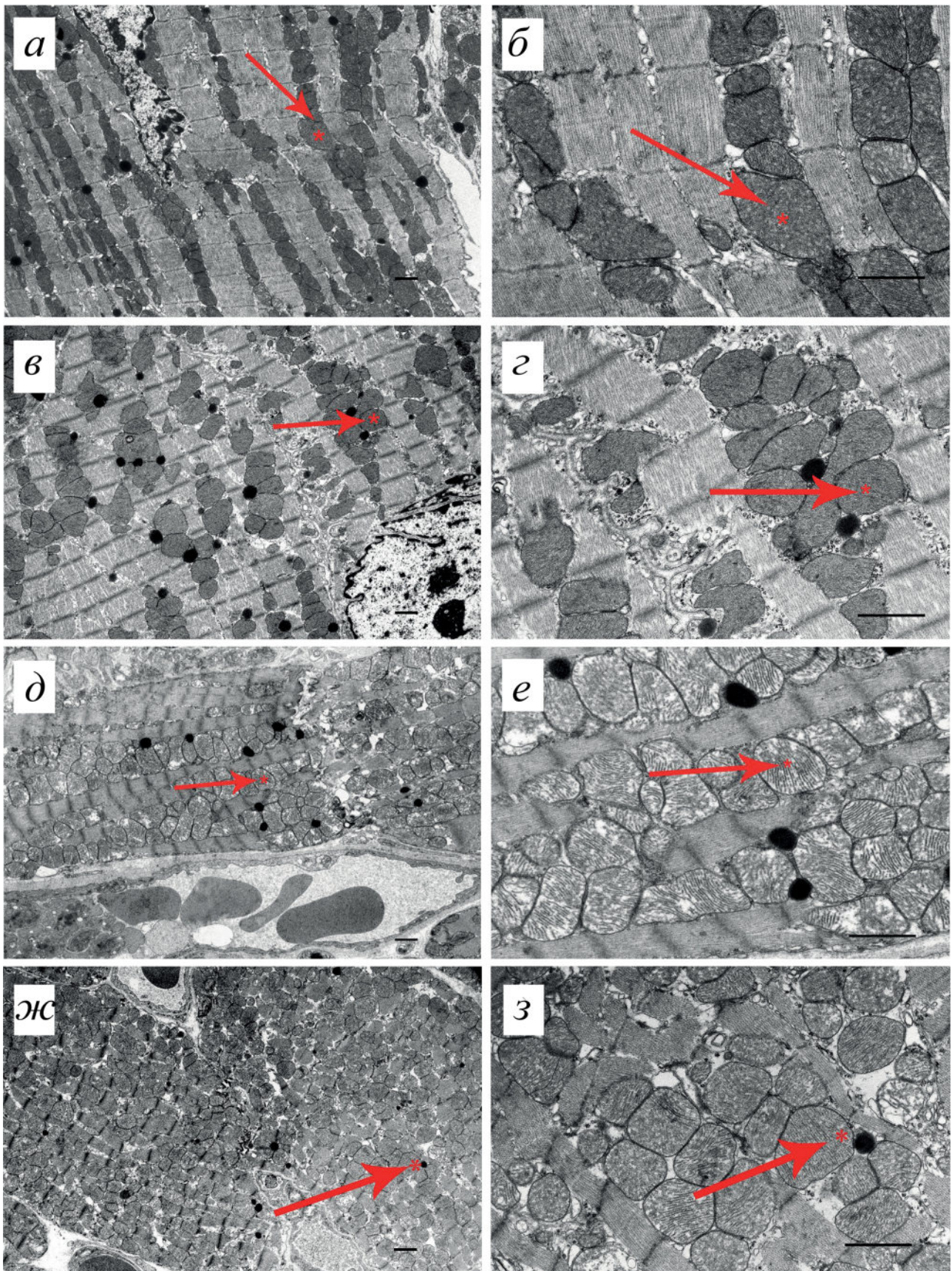


Рис. 4. Типичные электронные микрофотографии (при малом и большом увеличении) митохондриального аппарата кардиомиоцитов мышей группы контроль (а и б), контроль + NS1619 (в и г), *mdx* (д и е) и *mdx* + NS1619 (ж и з). Стрелками отмечена межфибриллярная популяция митохондрий. Звездочкой отмечены одни и те же митохондрии при малом и большом увеличении. Шкала – 1 мкм

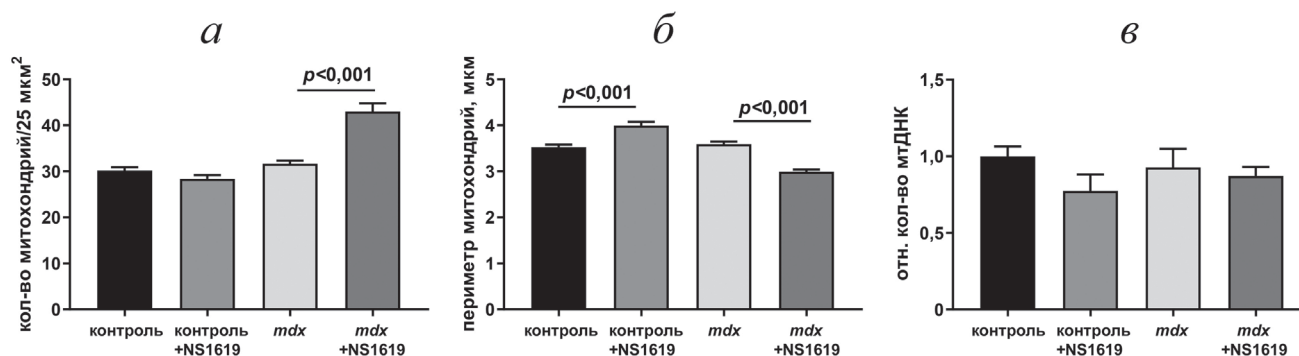


Рис. 5. Влияние NS1619 на количество митохондрий (а), периметр органелл (б) и уровень мтДНК относительно яДНК (в) в сердце экспериментальных групп мышей. Количество исследуемых полей зрения в группах — не менее 40 (а и б). Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$)

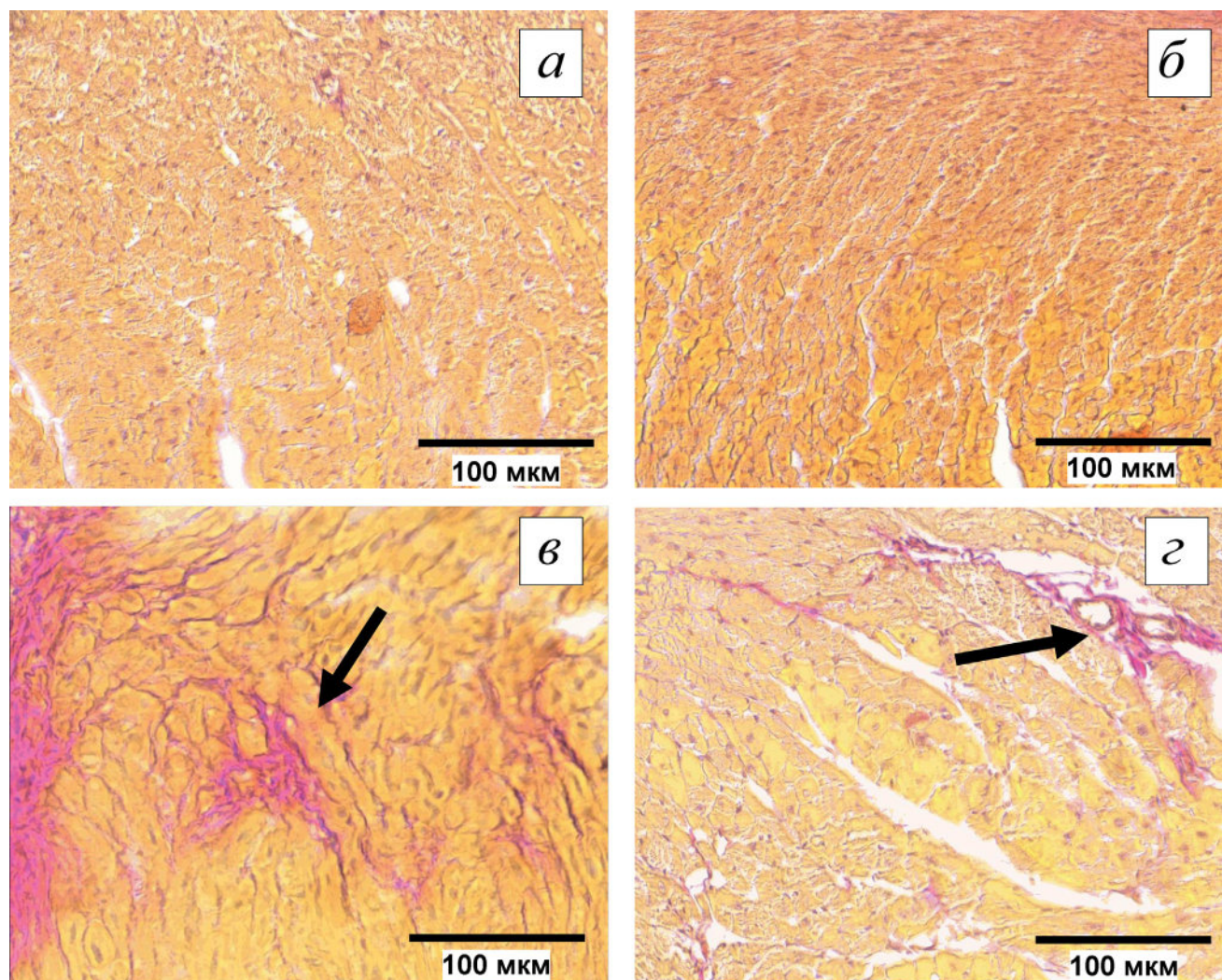
быстро прогрессирующей мышечной слабостью и истощением вследствие дегенерации скелетной мускулатуры и ее замещением соединительной тканью. Основными причинами смерти пациентов, страдающих этой патологией, являются дыхательная и сердечная недостаточность [1–6]. В условиях отсутствия эффективной и безопасной генной терапии, позволяющей восстановить нормальную экспрессию дистрофина, основное внимание уделяется коррекции вторичных эффектов МДД, прежде всего нарушения Ca^{2+} -гомеостаза, ассоциированного с увеличением уровня АФК, характеризующих наличие окислительного стресса, а также хронического воспаления и фиброза [7].

В качестве одной из мишеней для терапии МДД рассматриваются митохондрии. Это неудивительно, так как развитие патологии скелетных мышц сопровождается существенным нарушением структуры и функции этих органелл, в том числе регуляции ионного гомеостаза [8–14]. Показано, что нормализация гомеостаза Ca^{2+} в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных *mdx*-мышей путем увеличения кальциевой емкости и восстановления чувствительности к индукции кальций-зависимой МРТ-поры способствует смягчению деструктивных процессов в скелетной мускулатуре животных [10, 44, 45]. Подобная картина выявлена нами недавно и в случае митохондриального гомеостаза ионов калия. Было установлено, что митохондрии скелетных мышц *mdx*-мышей характеризуются снижением эффективности транспорта K^+ через внутреннюю мембрану органелл, а также снижением общего содержания иона [25, 26]. В этом случае применение активатора $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ NS1619 способствовало нормализации этих параметров, и такой эффект сопровождался улучшением ультраструктуры органелл, снижением интенсивности окис-

лительного стресса и деструктивных процессов в скелетной мускулатуре животных [26]. Однако встает вопрос: насколько эффективна такая терапия при коррекции сердечной патологии? Для ответа на него мы оценили влияние NS1619 на функционирование и структуру митохондрий сердца мышей *mdx*, представляющих собой приближенную патологическую модель болезни Дюшенна и состояние органа в эксперименте *in vivo* путем сравнения нормальных и трансгенных животных в условиях нормы и коррекции.

Как показано в настоящей работе, в митохондриях сердца *mdx*-мышей, так же как в митохондриях скелетных мышц, наблюдается достоверное снижение скорости транспорта и содержания K^+ в матриксе (рис. 1), а применение NS1619 приводит к улучшению этих параметров в митохондриях. При этом такое изменение не связано с изменением уровня белка $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ и/или экспрессии гена, кодирующего этот белок (рис. 2). Это позволяет предположить, что наблюдаемые изменения митохондриального гомеостаза K^+ в кардиомиоцитах *mdx*-мышей могут быть обусловлены изменением активности имеющихся белковых субъединиц $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ или же влиянием этого агента на другие переносчики ионов калия во внутренней митохондриальной мембране, что мы не можем исключить. Интересно, что в случае скелетных мышц *mdx*-мышей ранее нами выявлено снижение экспрессии гена, кодирующего $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, которое устранялось NS1619 [26]. Это указывает на выраженное развитие патологии на уровне скелетных мышц *mdx*-мышей, которое отражает изменения на генном уровне.

Интересно отметить, что, несмотря на снижение скорости транспорта и содержания K^+ в митохондриях сердца *mdx*-мышей нами вновь отмечено ускорение дыхания и



д

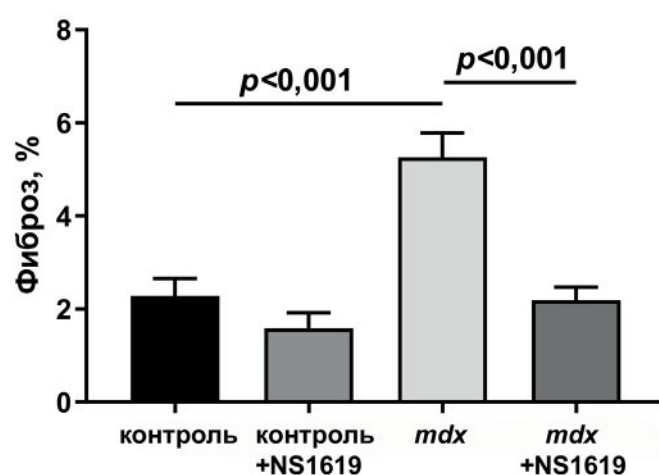


Рис. 6. Типичные гистологические изображения ткани сердца (для сравнения представлены участки левого желудочка) мышей группы контроль (а), контроль + NS1619 (б), *mdx* (в) и *mdx* + NS1619 (г). Отдельные участки соединительной ткани розового цвета отмечены стрелкой. На панели д представлены количественные данные, демонстрирующие уровень фиброза в сердце экспериментальных групп мышей, который оценивали, как процентное отношение площади окрашивания гематоксилином по Ван-Гизону к общей площади ткани, при этом для каждого образца анализировали не менее 10 срезов. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего

окислительного синтеза АТФ по сравнению с митохондриями контрольных животных (табл. 2), что наблюдалось и в предыдущих работах [19, 21]. Это также сопровождается увеличением способности митохондрий сердца транспортировать и удерживать ионы кальция в матриксе органелл (рис. 3, а). Ранее нами и другими коллективами было показано, что такая картина может маскировать дисфункцию биоэнергетического аппарата кардиомиоцитов при развитии мышечной дистрофии [17–21]. При этом можно видеть, что в условиях *in vivo* NS1619 не влияет на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования, а также кальциевую емкость митохондрий сердца обеих групп мышей.

Известно, что улучшение калиевого гомеостаза митохондрий, в том числе путем активации $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, способствует снижению продукции АФК митохондриями и снижает интенсивность окислительного стресса [31]. Важно отметить, что такие эффекты описаны для активатора $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ NS1619, и они, как предполагается, лежат в основе известного кардиопротекторного действия этого агента и достигаются уже при однократном введении препарата [32, 46]. Недавно нами показано, что хроническое введение NS1619 приводит к снижению уровня АФК в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей [26]. В настоящей работе мы выяснили, что такой эффект наблюдается и в случае митохондрий сердца — уровень МДА, одного из маркеров окислительного стресса, повышенный при дистрофии Дюшенна, достоверно снижается в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных животных, получавших NS1619 (рис. 3, б).

Наряду с улучшением митохондриального гомеостаза K^+ и снижением уровня продуктов перекисного окисления, что можно интерпретировать как снижение уровня окислительного стресса, применение NS1619 также сопровождается тенденцией к улучшению ультраструктуры органелл *mdx*-животных, о чем свидетельствуют данные электронной микроскопии сердечной мускулатуры (рис. 4 и рис. П1 в Приложении). Положительное влияние этого агента на структуру митохондрий отмечено нами ранее и в случае патологии скелетных мышц [26]. В сердечной ткани *mdx*-мышей действие NS1619 также сопровождалось достоверным увеличением количества митохондрий и снижением периметра органелл (рис. 5). Это можно трактовать как неканоническое увеличение митохондриальной фрагментации, которое, в отличие от показанных ранее случаев положительной ассоциации

фрагментации и окислительного стресса, в данных условиях сопровождается уменьшением выраженности окислительного стресса, ассоциированного с фрагментацией.

В предыдущей работе мы показали, что в целом благоприятное влияние NS1619 на структуру и функцию митохондриального аппарата скелетных мышц *mdx*-мышей способствует снижению интенсивности дегенеративных процессов в скелетной мускулатуре и уровня фиброза [26]. Можно видеть, что в случае сердечной мышцы дистрофин-дефицитных мышей также наблюдается достоверное увеличение площади, занимаемой соединительной тканью, по сравнению со здоровыми животными (рис. 6), однако различия не столь выражены, как в случае скелетных мышц, что в целом соответствует данным литературы [47] и подтверждает тезис об отсроченном развитии деструктивных явлений в тканях сердца. Тем не менее и в этом случае действие NS1619 сопровождается достоверным снижением уровня фиброза в сердце *mdx*-мышей до уровня животных дикого типа (рис. 6).

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что активатор $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ NS1619, наряду с облегчением патологии скелетных мышц дистрофин-дефицитных *mdx*-мышей, также способствует улучшению состояния сердечной мышцы. Это, по всей видимости, также обусловлено активацией транспорта ионов калия в митохондриях сердца, что ведет к снижению продукции АФК органеллами и улучшению их ультраструктуры. Важно отметить практически полное отсутствие влияния NS1619 на структуру и функцию митохондрий сердца животных дикого типа, что может свидетельствовать об отсутствии серьезных побочных эффектов такой терапии. Наряду с этим, следует понимать, что эффекты NS1619 могут быть обусловлены также его влиянием на BK -каналы, расположенные в ядерной и цитоплазматической мембране [31], которые имеют схожие биофизические свойства и роль которых в развитии патологий, включая дистрофию Дюшенна, только предстоит исследовать. Кроме того, важной задачей является выяснение влияния этого агента на функциональные параметры работы сердца при МДД, что позволит подтвердить перспективность его применения для коррекции кардиомиопатии.

Вклад авторов. М.В. Дубинин и К.Н. Белослудцев — концепция и руководство работой; М.В. Дубинин, В.С. Старинец, Ю.А. Че-

лядникова, Н.В. Белослудцева, И.Б. Михеева, Д.К. Пенкина, А.Д. Игошкина, Е.Ю. Таланов, И.И. Киреев — проведение экспериментов; М.В. Дубинин, К.Н. Белослудцев, Д.Б. Зоров — обсуждение результатов исследования; М.В. Дубинин — написание текста; М.В. Дубинин, К.Н. Белослудцев, Д.Б. Зоров — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10006).

Благодарности. Электронная микроскопия образцов выполнена при поддержке Программы развития МГУ (ПНР 5.13) и Центра коллективного пользования «Субдиф-

ракционная микроскопия» НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работу с лабораторными животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и с принципами Хельсинкской декларации (2000). Все протоколы были одобрены Комиссией по биологической безопасности и биоэтике МарГУ (протокол № 1/2021 от 18.10.2021).

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Emery, A. E. (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases — A world survey, *Neuromuscul. Disord.*, **1**, 19-29, doi: 10.1016/0960-8966(91)90039-u.
- Mavrogeni, S., Markousis-Mavrogenis, G., Papa-vasiliou, A., and Kolovou, G. (2015) Cardiac involvement in Duchenne and Becker muscular dystrophy, *World J. Cardiol.*, **7**, 410-414, doi: 10.4330/wjc.v7.i7.410.
- Ignatieva, E., Smolina, N., Kostareva, A., and Dmitrieva, R. (2021) Skeletal muscle mitochondria dysfunction in genetic neuromuscular disorders with cardiac phenotype, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7349, doi: 10.3390/ijms22147349.
- Kamdar, F., and Garry, D. J. (2016) Dystrophin-deficient cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **67**, 2533-2546, doi: 10.1016/j.jacc.2016.02.081.
- D'Amario, D., Amodeo, A., Adorisio, R., Tiziano, F. D., Leone, A. M., Perri, G., Bruno, P., Massetti, M., Ferlini, A., Pane, M., Niccoli, G., Porto, I., D'Angelo, G. A., Borovac, J. A., Mercuri, E., and Crea, F. (2017) A current approach to heart failure in Duchenne muscular dystrophy, *Heart*, **103**, 1770-1779, doi: 10.1136/heartjnl-2017-311269.
- Ware, S. M. (2017) Genetics of paediatric cardiomyopathies, *Curr. Opin. Pediatr.*, **29**, 534-540, doi: 10.1097/MOP.0000000000000533.
- Angelini, G., Mura, G., and Messina, G. (2022) Therapeutic approaches to preserve the musculature in Duchenne muscular dystrophy: The importance of the secondary therapies, *Exp. Cell Res.*, **410**, 112968, doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112968.
- Rybalka, E., Timpani, C., Cooke, M. B., Williams, A., and Hayes, A. (2014) Defects in mitochondrial ATP synthesis in dystrophin-deficient mdx skeletal muscles may be caused by complex I insufficiency, *PLoS One*, **9**, e115763, doi: 10.1371/journal.pone.0115763.
- Vila, M. C., Rayavarapu, S., Hogarth, M., van der Meulen, J. H., Horn, A., Defour, A., Takeda, S., Brown, K. J., Hathout, Y., Nagaraju, K., and Jaiswal, J. K. (2017) Mitochondria mediate cell membrane repair and contribute to Duchenne muscular dystrophy, *Cell Death Differ.*, **24**, 330-342, doi: 10.1038/cdd.2016.127.
- Schiavone, M., Zulian, A., Menazza, S., Petronilli, V., Argenton, F., Merlini, L., Sabatelli, P., and Bernardi, P. (2017) Alisporivir rescues defective mitochondrial respiration in Duchenne muscular dystrophy, *Pharmacol. Res.*, **125**, 122-131, doi: 10.1016/j.phrs.2017.09.001.
- Hughes, M. C., Ramos, S. V., Turnbull, P. C., Rebalka, I. A., Cao, A., Monaco, C. M., Varah, N. E., Edgett, B. A., Huber, J. S., Tadi, P., Delfinis, L. J., Schlattner, U., Simpson, J. A., Hawke, T. J., and Perry, C. G. R. (2019) Early myopathy in Duchenne muscular dystrophy is associated with elevated mitochondrial H₂O₂ emission during impaired oxidative phosphorylation, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **10**, 643-661, doi: 10.1002/jcsm.12405.
- Dubinina, M. V., Talanov, E. Y., Tenkov, K. S., Starinets, V. S., Mikheeva, I. B., Sharapov, M. G., and Belosludtsev, K. N. (2020) Duchenne muscular dystrophy is associated with the inhibition of calcium uniport in mitochondria and an increased sensitivity of the organelles to the calcium-induced permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1866**, 165674, doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165674.
- Dubinina, M. V., Talanov, E. Y., Tenkov, K. S., Starinets, V. S., Belosludtseva, N. V., and Belosludtsev, K. N. (2020) The effect of deflazacort treatment on the functioning of skeletal muscle mitochondria in Duchenne muscular dystrophy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8763, doi: 10.3390/ijms21228763.
- Mareedu, S., Million, E. D., Duan, D., and Babu, G. J. (2021) Abnormal calcium handling in

- Duchenne muscular dystrophy: mechanisms and potential therapies, *Front. Physiol.*, **12**, 647010, doi: 10.3389/fphys.2021.647010.
15. Zhang, W., ten Hove, M., Schneider, J. E., Stuckey, D. J., Sebag-Montefiore, L., Bia, B. L., Radda, G. K., Davies, K. E., Neubauer, S., and Clarke, K. (2008) Abnormal cardiac morphology, function and energy metabolism in the dystrophic mdx mouse: An MRI and MRS study, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **45**, 754-760, doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.09.125.
 16. Kyrychenko, V., Poláková, E., Janíček, R., and Shirokova, N. (2015) Mitochondrial dysfunctions during progression of dystrophic cardiomyopathy, *Cell Calcium*, **58**, 186-195, doi: 10.1016/j.ceca.2015.04.006.
 17. Willi, L., Abramovich, I., Fernandez-Garcia, J., Agranovich, B., Shulman, M., Milman, H., Baskin, P., Eisen, B., Michele, D. E., Arad, M., Binah, O., and Gottlieb, E. (2022) Bioenergetic and metabolic impairments in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes generated from Duchenne muscular dystrophy patients, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 9808, doi: 10.3390/ijms23179808.
 18. Ascah, A., Khairallah, M., Daussin, F., Bourcier-Lucas, C., Godin, R., Allen, B. G., Petrof, B. J., Rosiers, C. D., Burelle, Y. (2011) Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **300**, H144-H153, doi: 10.1152/ajpheart.00522.2010.
 19. Dubinin, M. V., Talanov, E. Y., Tenkov, K. S., Starinets, V. S., Mikheeva, I. B., and Belosludtsev, K. N. (2020) Transport of Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent permeability transition in heart mitochondria in the early stages of Duchenne muscular dystrophy, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148250, doi: 10.1016/j.bbabbio.2020.148250.
 20. Angebault, C., Panel, M., Lacôte, M., Rieusset, J., Lacampagne, A., and Fauconnier, J. (2021) Metformin reverses the enhanced myocardial SR/ER-mitochondria interaction and impaired complex I-driven respiration in dystrophin-deficient mice, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 609493, doi: 10.3389/fcell.2020.609493.
 21. Dubinin, M. V., Starinets, V. S., Talanov, E. Y., Mikheeva, I. B., Belosludtseva, N. V., Serov, D. A., Tenkov, K. S., Belosludtseva, E. V., and Belosludtsev, K. N. (2021) Effect of the non-immunosuppressive MPT pore inhibitor alisporivir on the functioning of heart mitochondria in dystrophin-deficient *mdx* mice, *Biomedicines*, **9**, 1232, doi: 10.3390/biomedicines9091232.
 22. Bienengraeber, M., Olson, T. M., Selivanov, V. A., Kathmann, E. C., O'Coilain, F., Gao, F., Karger, A. B., Ballew, J. D., Hodgson, D. M., Zingman, L. V., Pang, Y. P., Alekseev, A. E., and Terzic, A. (2004) ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating, *Nat. Genet.*, **36**, 382-387, doi: 10.1038/ng1329.
 23. Farid, T. A., Nair, K., Massé, S., Azam, M. A., Maguy, A., Lai, R. F., Umapathy, K., Dorian, P., Chauhan, V., Varró, A., Al-Hesayen, A., Waxman, M., Nattel, S., and Nanthakumar, K. (2011) Role of KATP channels in the maintenance of ventricular fibrillation in cardiomyopathic human hearts, *Circ. Res.*, **109**, 1309-1318, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.232918.
 24. Graciotti, L., Becker, J., Granata, A. L., Procopio, A. D., Tessarollo, L., and Fulgenzi, G. (2011) Dystrophin is required for the normal function of the cardio-protective K(ATP) channel in cardiomyocytes, *PLoS One*, **6**, e27034, doi: 10.1371/journal.pone.0027034.
 25. Dubinin, M. V., Starinets, V. S., Belosludtseva, N. V., Mikheeva, I. B., Chelyadnikova, Y. A., Penkina, D. K., Vedernikov, A. A., and Belosludtsev, K. N. (2022) The effect of uridine on the state of skeletal muscles and the functioning of mitochondria in Duchenne dystrophy, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10660, doi: 10.3390/ijms231810660.
 26. Dubinin, M. V., Starinets, V. S., Belosludtseva, N. V., Mikheeva, I. B., Chelyadnikova, Y. A., Igoshkina, A. D., Vafina, A. B., Vedernikov, A. A., and Belosludtsev, K. N. (2022) BK_{Ca} activator NS1619 improves the structure and function of skeletal muscle mitochondria in Duchenne dystrophy, *Pharmaceutics*, **14**, 2336, doi: 10.3390/ijms231810660.
 27. Checchetto, V., Leanza, L., De Stefani, D., Rizzuto, R., Gulbins, E., and Szabo, I. (2021) Mitochondrial K⁺ channels and their implications for disease mechanisms, *Pharmacol. Ther.*, **227**, 107874, doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107874.
 28. Zorov, D. B. (2022) A window to the potassium world. The evidence of potassium energetics in the mitochondria and identity of the mitochondrial ATP-dependent K⁺ channel, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 683-688, doi: 10.1134/S0006297922080016.
 29. Juhaszova, M., Koblinsky, E., Zorov, D. B., Nuss, H. B., Yaniv, Y., Fishbein, K. W., de Cabo, R., Montoliu, L., Gabelli, S. B., Aon, M. A., Cortassa, S., and Sollott, S. J. (2021) ATP Synthase K⁺- and H⁺-fluxes drive ATP synthesis and enable mitochondrial K⁺-“Uniporter” function: I. Characterization of ion fluxes, *Function (Oxf)*, **3**, zqab065, doi: 10.1093/function/zqab065.
 30. Juhaszova, M., Koblinsky, E., Zorov, D. B., Nuss, H. B., Yaniv, Y., Fishbein, K. W., de Cabo, R., Montoliu, L., Gabelli, S. B., Aon, M. A., Cortassa, S., and Sollott, S. J. (2022) ATP synthase K⁺- and H⁺-fluxes drive ATP synthesis and enable mitochondrial K⁺-“Uniporter” function: II. Ion and ATP synthase flux regulation, *Function (Oxf)*, **3**, zqac001, doi: 10.1093/function/zqac001.
 31. González-Sanabria, N., Echeverría, F., Segura, I., Alvarado-Sánchez, R., and Latorre, R. (2021) BK in double-membrane organelles: A biophysical, pharmacological, and functional survey, *Front. Physiol.*, **12**, 761474, doi: 10.3389/fphys.2021.761474.
 32. Wang, X., Yin, C., Xi, L., and Kukreja, R. C. (2004) Opening of Ca^{2+} -activated K⁺ channels triggers

- early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **287**, H2070-H2077, doi: 10.1152/ajpheart.00431.2004.
33. Lam, J., Katti, P., Biete, M., Mungai, M., AshShareef, S., Neikirk, K., Garza Lopez, E., Vue, Z., Christensen, T. A., Beasley, H. K., Rodman, T. A., Murray, S. A., Salisbury, J. L., Glancy, B., Shao, J., Pereira, R. O., Abel, E. D., and Hinton, A. (2021) A universal approach to analyzing transmission electron microscopy with ImageJ, *Cells*, **10**, 2177, doi: 10.3390/cells10092177.
 34. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
 35. Dubinin, M. V., Semenova, A. A., Ilzorkina, A. I., Markelova, N. Y., Penkov, N. V., Shakurova, E. R., Belosludtsev, K. N., and Parfenova, L. V. (2021) New quaternized pyridinium derivatives of betulin: Synthesis and evaluation of membranotropic properties on liposomes, pro- and eukaryotic cells, and isolated mitochondria, *Chem. Biol. Interact.*, **349**, 109678, doi: 10.1016/j.cbi.2021.109678.
 36. Belosludtseva, N. V., Starinets, V. S., Pavlik, L. L., Mikheeva, I. B., Dubinin, M. V., and Belosludtsev, K. N. (2020) The effect of S-15176 difumarate salt on ultrastructure and functions of liver mitochondria of C57BL/6 mice with streptozotocin/high-fat diet-induced type 2 diabetes, *Biology*, **9**, 309, doi: 10.3390/biology9100309.
 37. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinform.*, **13**, 134, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
 38. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
 39. Quiros, P. M., Goyal, A., Jha, P., and Auwerx, J. (2017) Analysis of mtDNA/nDNA ratio in mice, *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, **7**, 47-54, doi: 10.1002/cpmo.21.
 40. Szewczyk, A., Skalska, J., Głąb, M., Kulawiak, B., Malińska, D., Koszela-Piotrowska, I., and Kunz, W. S. (2006) Mitochondrial potassium channels: from pharmacology to function, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 715-720, doi: 10.1016/j.bbabo.2006.05.002.
 41. Singh, H., Rong, L., Bopassa, J., Meredith, A., Stefani, E., and Toro, L. (2013) MitoBK-Ca is encoded by the KCNMA1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 10836-10841, doi: 10.1073/pnas.1302028110.
 42. Heinen, A., Aldakkak, M., Stowe, D. F., Rhodes, S. S., Riess, M. L., Varadarajan, S. G., and Camara, A. K. (2007) Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H1400-H1407, doi: 10.1152/ajpheart.00198.2007.
 43. Kharraz, Y., Guerra, J., Pessina, P., Serrano, A. L., and Muñoz-Cánoves, P. (2014) Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 965631, doi: 10.1155/2014/965631.
 44. Wissing, E. R., Millay, D. P., Vuagniaux, G., and Molkentin, J. D. (2010) Debio-025 is more effective than prednisone in reducing muscular pathology in mdx mice, *Neuromuscul. Disord.*, **20**, 753-760, doi: 10.1016/j.nmd.2010.06.016.
 45. Dubinin, M. V., Starinets, V. S., Talanov, E. Y., Mikheeva, I. B., Belosludtseva, N. V., and Belosludtsev, K. N. (2021) Alisporivir Improves mitochondrial function in skeletal muscle of mdx mice but suppresses mitochondrial dynamics and biogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9780, doi: 10.3390/ijms22189780.
 46. Dai, H., Wang, M., Patel, P. N., Kalogeris, T., Liu, Y., Durante, W., and Korthuis, R. J. (2017) Preconditioning with the BKCa channel activator NS-1619 prevents ischemia-reperfusion-induced inflammation and mucosal barrier dysfunction: Roles for ROS and heme oxygenase-1, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **313**, H988-H999, doi: 10.1152/ajpheart.00620.2016.
 47. Li, Y., Zhang, S., Zhang, X., Li, J., Ai, X., Zhang, L., Yu, D., Ge, S., Peng, Y., and Chen, X. (2014) Blunted cardiac beta-adrenergic response as an early indication of cardiac dysfunction in Duchenne muscular dystrophy, *Cardiovasc. Res.*, **103**, 60-71, doi: 10.1093/cvr/cvu119.

EFFECT OF THE LARGE-CONDUCTANCE CALCIUM-DEPENDENT K⁺ CHANNEL ACTIVATOR NS1619 ON THE FUNCTION OF MITOCHONDRIA IN THE HEART OF DYSTROPHIN-DEFICIENT MICE

M. V. Dubinin^{1*}, V. S. Starinets², Y. A. Chelyadnikova¹, N. V. Belosludtseva²,
I. B. Mikheeva², D. K. Penkina¹, A. D. Igoshkina¹, E. Y. Talanov², I. I. Kireev³,
D. B. Zorov³, and K. N. Belosludtsev^{1,2}

¹ *Mari State University,
424001 Yoshkar-Ola, Mari El, Russia; E-mail: dubinin1989@gmail.com*

² *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

³ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia.*

Dystrophin-deficient muscular dystrophy (Duchenne dystrophy) is characterized by impaired ion homeostasis, in which mitochondria play an important role. In the present work, using a model of dystrophin-deficient *mdx* mice, we revealed a decrease in the efficiency of potassium ion transport and the total content of this ion in heart mitochondria. We evaluated the effect of chronic administration of the benzimidazole derivative NS1619, which is an activator of the large-conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channel (mitoBK_{Ca}) on the structure and function of organelles and the state of the heart muscle. It was shown that NS1619 improves K^{+} transport and increases the content of the ion in the heart mitochondria of *mdx* mice, but this is not associated with changes in the level of the mitoBK_{Ca} protein and the expression of the encoding gene. The effect of NS1619 was accompanied by a decrease in the intensity of oxidative stress, assessed by the level of lipid peroxidation products (MDA products) and normalization of the mitochondrial ultrastructure in the heart of *mdx* mice. In addition, we found positive changes in the tissue, expressed in a decrease in the level of fibrosis in the heart of dystrophin-deficient animals treated with NS1619. It was noted that NS1619 had no significant effect on the structure and function of heart mitochondria in wild-type animals. The paper discusses the mechanisms of influence of NS1619 on the function of mouse heart mitochondria in Duchenne muscular dystrophy and the prospects for applying this approach to correct pathology.

Keywords: Duchenne dystrophy, heart, mitochondria, NS1619, calcium-activated potassium channel, BK_{Ca}

ДИСБАЛАНС ПЛАЦЕНТАРНЫХ АНГИОГЕННЫХ И РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ ПРИ МАТЕРИНСКОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

© 2023 А.В. Арутюнян^{1*}, Г.О. Керкешко¹, Ю.П. Милютин^{1,2}, А.Д. Щербицкая^{1,3},
И.В. Залозная¹, А.В. Михель¹, Д.Б. Иноземцева¹, Д.С. Васильев^{1,3},
А.А. Коваленко³, И.Ю. Коган¹

¹ ФГБУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: alexarutiunjan@gmail.com

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический
медицинский университет Минздрава России, 194100 Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, 194223 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 23.09.2022

После доработки 23.12.2022

Принята к публикации 11.01.2023

Многочисленными исследованиями установлено, что влияние на плаценту неблагоприятных воздействий различной природы и механизма действия приводит, как правило, к общему конечному результату — недостаточности ее кровоснабжения. Одним из факторов риска развития осложненной беременности с плацентарной этиологией является повышенный уровень аминокислоты гомоцистеина в крови беременных, однако воздействие гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на развитие плаценты и, в частности, на формирование ее сосудистой сети, остается до сих пор мало изученным. Целью настоящей работы явилось исследование влияния материнской ГГЦ на экспрессию в плаценте крыс ангиогенных и ростовых факторов (VEGF-A, MMP-2, VEGF-B, BDNF и NGF), а также их рецепторов (VEGFR-2, TrkB и p75NTR). Влияние ГГЦ изучалось в двух морфологически и функционально различных отделах — материнской и плодной частях плаценты, на двух сроках развития — 14-й и 20-й дни беременности. Под влиянием материнской ГГЦ в исследуемых отделах плаценты наблюдалось повышение уровней маркеров окислительного стресса и апоптоза, а также нарушение баланса изучаемых ангиогенных и ростовых факторов, в большинстве случаев выражавшееся в снижении содержания белка (VEGF-A), ферментативной активности (MMP-2), экспрессии генов (*VEGFB*, *NGF*, *TRKB*), а также накоплении незрелых форм (proBDNF). В ряде случаев эффекты ГГЦ различались в зависимости от отдела плаценты и срока ее развития. Влияние материнской ГГЦ на сигнальные пути и процессы, контролируемые изученными ангиогенными и ростовыми факторами, может приводить к неполному развитию сосудистой сети плаценты и снижению трансплацентарного транспорта, результатом чего являются задержка роста плода и нарушение развития его мозга, наблюдаемые при материнской ГГЦ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: материнская гипергомоцистеинемия, плацента, ангиогенные факторы, нейротрофины.

DOI: 10.31857/S0320972523020057, EDN: QGFASA

ВВЕДЕНИЕ

Неблагоприятные факторы во время беременности могут осуществлять негативное влияние на плаценту посредством различных механизмов. Вместе с тем общим конечным итогом их воздействия оказывается, как пра-

вило, недостаточное кровоснабжение плаценты [1]. Следствием нарушения плацентарного кровоснабжения является состояние гипоксии и окислительного стресса (ОС), вызывающее подавление пролиферативной активности и увеличение клеточной гибели в различных отделах плаценты, что, в свою очередь, приводит

Принятые сокращения: ГЦ — гомоцистеин; ГГЦ — гипергомоцистеинемия; МДА — малоновый диальдегид; MMP — матриксные металлопротеиназы; МЧП — материнская часть плаценты; ОС — окислительный стресс; ПОЛ — перекисное окисление липидов; ПЧП — плодная часть плаценты; ПЭ — преэклампсия; СОД — супероксиддисмутаза; BDNF — нейротрофический фактор мозга; NGF — фактор роста нервов; VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

* Адресат для корреспонденции.

к задержке роста плаценты, недостаточному развитию ее сосудистой дерева и в итоге — к нарушению транспортной и других плацентарных функций [2].

Формирование разветвленной плацентарной сосудистой сети имеет решающее значение для морфологического и функционального созревания плаценты, и, как следствие, для физиологического роста и развития плода [3, 4]. Процессы плацентарного васкулогенеза (образование сосудов *de novo*) и ангиогенеза (удлинение и разветвление уже существующих сосудов) находятся под контролем ряда ангиогенных факторов, соотношение между которыми в различных отделах плаценты на разных сроках беременности изменяется, обеспечивая скоординированную смену различных стадий развития сосудистой сети [5]. Ключевым проангиогенным фактором, регулирующим все стадии плацентарного васкуло- и ангиогенеза, является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF-A, в дальнейшем — VEGF), который осуществляет свои эффекты во взаимодействии с другими ангиогенными факторами [6].

Наряду с развитием сосудистой дерева важную роль в обеспечении адекватного кровоснабжения плаценты играет процесс ремоделирования материнских спиральных артерий, в ходе которого выстилающие их стенки эндотелиальные и гладкомышечные клетки заменяются мигрирующими клетками трофобласта, благодаря чему диаметр этих сосудов расширяется и приток материнской крови к плаценте усиливается [7]. VEGF совместно с другими проангиогенными факторами, такими как матриксные металлопротеиназы (ММП), участвует в процессе ремоделирования, усиливая миграционные и инвазивные свойства клеток трофобласта [8].

Недавно было показано, что факторы семейства нейротрофинов, в первую очередь нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) и фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), экспрессируются в плаценте и играют там роль ростовых факторов, ингибируя процессы апоптоза и усиливая пролиферацию и инвазивные способности клеток трофобласта [9–14]. Высказаны предположения, что плацента является источником нейротрофических факторов для развивающегося плода [15, 16], вследствие чего снижение их уровня в плаценте может приводить к задержке роста плода и нарушениям развития его мозга [17].

Одним из основных первичных механизмов, обуславливающих патологические эффекты

гипергомоцистеинемии (ГГЦ), то есть повышенного уровня аминокислоты гомоцистеин (ГЦ) в крови, является ОС [18, 19]. Предполагается, что активация под влиянием материнской ГГЦ процессов ОС, сопровождающаяся усилением процессов апоптоза в плаценте, способна вызывать нарушения необходимого для развития плаценты и ее сосудистой дерева баланса плацентарных ангиогенных и ростовых факторов [20, 21], в частности, за счет изменения уровня экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию VEGF, ММП и других белков, вовлеченных в процессы ангиогенеза и инвазии трофобласта [22].

Хотя антиангиогенные свойства ГЦ подтверждены во многочисленных опытах на моделях *in vitro* [23–25] и *in vivo* [25–27], существуют лишь единичные сообщения о влиянии ГГЦ на уровень экспрессии ангиогенных факторов, а также играющих роль ростовых факторов BDNF и NGF в плаценте животных и человека [28–30]. Вызванные материнской ГГЦ критические изменения структуры и функций плаценты могут привести к снижению трансплацентарного транспорта и, как следствие, к задержке роста плода [31]. Высказаны предположения, что исходной причиной многих нейроповеденческих расстройств у потомства являются патофизиологические изменения в плаценте матери, сопровождающиеся нарушениями развития мозга плода, который особенно уязвим к последствиям плацентарной дисфункции [32, 33]. Эти гипотезы, до сих пор недостаточно подкрепленные клиническими и экспериментальными данными, обуславливают актуальность дальнейшего изучения воздействия материнской ГГЦ на сигнальные пути, контролирующие морфологическое и функциональное созревание плаценты, в частности развитие ее сосудистой сети. Выяснение механизмов негативного влияния ГГЦ на уровне плаценты будет способствовать лучшему пониманию этиологии осложнений беременности и патологий развития плода, характеризующихся повышенным уровнем ГЦ в крови матери и нарушениями плацентарного кровоснабжения, в частности, преэклампсии (ПЭ) и задержки внутриутробного развития плода (ЗВУР) [34, 35], а также когнитивных нарушений, наблюдающихся у потомства матерей с ГГЦ [36–39].

В настоящей работе в экспериментах на самках крыс исследовано влияние материнской ГГЦ на уровни маркеров ОС и апоптоза, проангиогенных и ростовых факторов (VEGF, ММП-2, VEGF-B, BDNF и NGF) и их рецеп-

торов (VEGFR-2, TrkB и p75NTR) в плодной части плаценты (ПЧП), являющейся основной зоной обмена между кровеносными системами матери и плода, а также материнской части плаценты (МЧП), выполняющей в первую очередь эндокринную функцию. Исследуемые показатели определялись на 14-й день эмбрионального развития (E14), соответствующий началу второго триместра беременности у человека и характеризующийся активацией процессов ангиогенеза и миграции трофобласта в плаценте крыс, а также в конце беременности на 20-й день эмбрионального развития (E20, соответствует концу второго триместра у человека), когда сосудистое русло плаценты крыс уже полностью сформировано.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперимент проводили на 62 самках крыс линии Wistar (Биопитомник «СМК Стезар», Владимирская обл., РФ) в возрасте 3–4 месяца массой 180–220 г. Животных содержали в виварии с искусственной вентиляцией и контролируемым 12-часовым циклом света и темноты при постоянной комнатной температуре. Самки крыс получали стандартный лабораторный корм и воду *ad libitum*. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского Сообщества (86/609/ЕЕС)

об использовании животных для экспериментальных исследований.

Модель материнской ГГЦ. Стадии эстрального цикла у самок определяли по влагалищным мазкам. В эксперимент отбирали самок с четырехдневным эстральным циклом, стабильным на протяжении как минимум 2–3 циклов. Подсадку самцов к самкам осуществляли на стадии проэструса, первым днем беременности (E1) считали следующий день после обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. Для создания экспериментальной материнской ГГЦ использовали разработанный нами ранее метод, основанный на дозированной хронической метиониновой нагрузке, начиная с четвертого дня беременности (E4) до дня, предшествующего выводу животных из эксперимента (E13 или E19) [30]. Экспериментальным животным ежедневно перорально через желудочный зонд вводили 1 мл водного раствора L-метионина, приготовленного *ex tempore* из расчета 0,6 г/кг массы животного; контрольным животным в течение того же периода времени тем же способом вводили 1 мл воды. Эксперимент включал 4 группы животных: контроль E14 ($n = 15$), контроль E20 ($n = 15$), ГГЦ E14 ($n = 16$) и ГГЦ E20 ($n = 16$) (рис. 1).

Подготовка ткани к анализу. На сроках беременности E14 и E20, через сутки после последнего введения метионина, самок обеих групп декапитировали без анестезии и отбирали

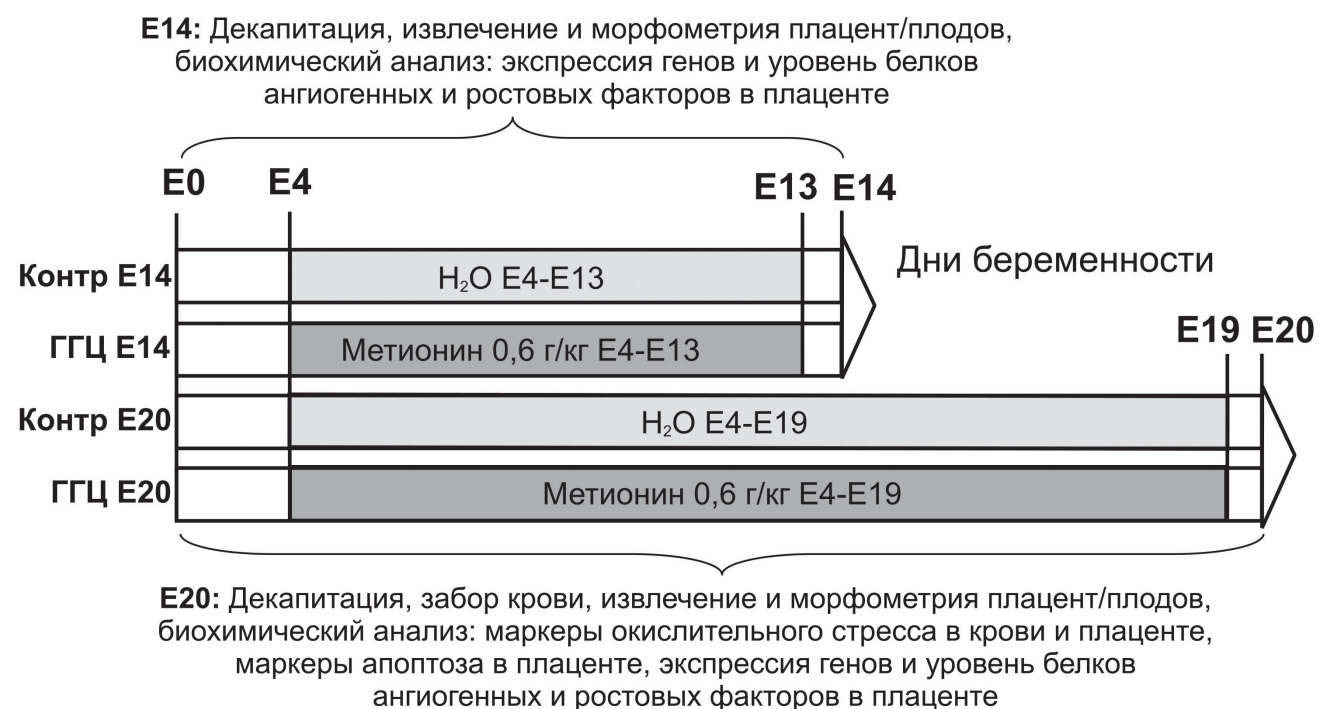


Рис. 1. Схема эксперимента

кровь, слитую из туловища. Плоды и плаценты извлекали и анализировали их массу. Плоды декапитировали, отбирали кровь, слитую из туловищ, пулируя кровь от помета одной самки. Сыворотку крови отделяли путем центрифугирования (10 мин при 2300 g). Образцы сыворотки крови и ткани плаценты для биохимического анализа хранили при -80°C . Перед началом анализа замороженную ткань плаценты промывали от крови в холодном 10 mM фосфатном буфере (pH 7,4) и разделяли на МЧП (базальную часть) и ПЧП (лабиринтную часть). Ткани плаценты гомогенизировали в 10 mM фосфатном буфере (pH 7,4), центрифугировали 20 мин при 16 000 g и $+4^{\circ}\text{C}$, супернатант подвергали анализу. В группах E14 для иммуноблоттинга и зимографии в качестве образцов для анализа брали пулированные гомогенаты МЧП или ПЧП от 3–4 плацент, в остальных случаях использовались гомогенаты МЧП или ПЧП от отдельных плацент. От одной самки в группу для анализа отбирали 1 плаценту, в группах E14 – 1 пулированный образец. Концентрацию общего белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [40] на спектрофотометре NanoDrop One («Thermo Scientific», США).

Оценка показателей окислительного стресса.

Показатели ОС исследовались на сроке E20. В сыворотке крови беременных самок МЧП и ПЧП оценивали перекисное окисление липидов (ПОЛ) путем определения малонового диальдегида (МДА) по стандартной методике с использованием тиобарбитуровой кислоты [41]. В тех же объектах исследования, а также в сыворотке крови плодов измеряли активность супероксиддисмутазы (СОД) с использованием набора Superoxide Dismutase Assay Kit («Cayman Chemical», США), согласно инструкции производителя. Окислительная модификация белков исследовалась в МЧП и ПЧП при помощи набора OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit («Merck Millipore», США), как описано нами ранее [42].

Иммуноблоттинг. Содержание в МЧП и ПЧП белков VEGF (на сроках E14 и E20), NGF и BDNF (на сроке E14), каспазы-3 и каспазы-8 (на сроке E20) оценивали методом иммуноблоттинга. Образцы, содержащие по 50 мкг белка, разделяли в 10%-ном ПААГ в денатурирующих условиях по Лэммли и переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad», США). Мембраны блокировали раствором 2%-ного бычьего сывороточного альбумина («Sigma-Aldrich Chem. Co.», США) в буфере TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20 (pH 7,5)). Содержание бел-

ков интереса в исследуемых образцах выявляли с помощью специфичных первичных антител к VEGF (Anti-VEGF rabbit Ab, 1/1000), NGF (Anti-NGF rabbit Ab, 1/1000), BDNF (Anti-BDNF rabbit Ab, 1/1000) производства «Abcam», США и к каспазе-3 (Caspase-3 rabbit Ab, 1/1000) и каспазе-8 (Caspase-8 mouse Ab, 1/1000) производства «Cell Signaling», США. Инкубацию проводили при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение ночи. После инкубации с соответствующими вторичными антителами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1/1000, «Bio-Rad»), сигналы визуализировали, используя усиленную хемилюминесценцию Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad»). Мембраны сканировали в гель-документирующей системе ChemiDoc™ Touch Imaging system («Bio-Rad»), интенсивность полос определяли при помощи программного обеспечения ImageLab. Руководствуясь существующими рекомендациями по процедуре нормализации содержания белка-мишени [43], полученные данные были нормализованы по содержанию общего белка в геле, определяемого с применением технологии stain-free («Bio-Rad»), согласно инструкции производителя.

Зимография. Оценку протеолитической активности ММП-2 (желатиназы) в МЧП и ПЧП на сроках E14 и E20 проводили методом зимографии [44] с собственными модификациями [42]. При проведении анализа в качестве субстрата использовали желатин («Sigma-Aldrich», США). Пробы, содержащие 15–28 мкг белка, смешивали с буфером Лэммли («Bio-Rad») без нагревания, после чего проводили электрофорез в 10%-ном ПААГ, содержащем 1 мг/мл желатина, в невозстанавливающих и неденатурирующих условиях. После проведения электрофореза гели промывали 3 раза по 30 мин в нагретом до 37°C буферном растворе (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 и 2,5% (w/v) Triton X-100 (pH 7,6)) для удаления SDS и ренатурации ММП в геле. Затем гели инкубировали в течение 18 ч при 37°C в буферном растворе (50 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl_2 , 1 мкМ ZnCl_2 и 0,02% Brij-35 (pH 7,6)) для индукции лизиса желатина. Для анализа активности фермента гели окрашивали 0,5%-ным Кумасси бриллиантовым синим R-250 («Bio-Rad») и обесцвечивали в 25%-ном растворе этанола, содержащем 10% уксусной кислоты. При этом зоны, содержащие ММП-2, проявлялись в виде белых полос на синем фоне. Количественный анализ проводили так же, как при оценке данных иммуноблоттинга.

Количественная ПЦР в реальном времени. Для анализа экспрессии генов в МЧП и ПЧП

на сроках E14 и E20 использовали метод количественной ПЦР в реальном времени. Выделение тотальной РНК из клеток МЧП и ПЧП производили с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя, с модификациями. Для удаления возможной примеси геномной ДНК образцы РНК дополнительно подвергали ДНКазной обработке с использованием свободной от РНКаз RQ1-ДНКазы («Promega», США). Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop Lite («Thermo Fisher Scientific», США). Обратную транскрипцию выполняли с использованием 1 мкг РНК, смеси случайных 9-мерных и олиго-dT-праймеров («ДНК-Синтез», Россия) и MMLV-обратной транскриптазы («Евроген»). Определение мРНК *VEGFA*, *VEGFB*, *KDR* (*VEGFR-2*), *BDNF*, *NGF*, *TRKA* (*NTRK1*), *TRKB* (*NTRK2*) и *P75NTR* (*NGFR*), а также генов домашнего хозяйства *YWHAZ* (белок активации тирозин-3-монооксигеназы/триптофан-5-монооксигеназы, полипептид ζ) и *PGK1* (фосфоглицераткиназа 1) было про-

ведено методом ПЦР в реальном времени. Для количественной ПЦР в реальном времени готовили реакционную смесь, содержащую 0,8 мкл образца кДНК; 0,75 ед. TaqM-полимеразы («Алкор-Био», Россия); 200 нМ специфических прямых и обратных праймеров; 100 нМ зонда TaqMan; 3,5 мМ MgCl₂ и 250 мкМ dATP/dTTP/dCTP/dGTP в 6 мкл общего объема 1×TaqM-реакционного буфера. Для анализа генов были использованы мультиплексные системы: *VEGFA* + *KDR*, *TRKB* + *P75NTR*, *YWHAZ* + *PGK1*. В случае анализа экспрессии *BDNF*, *NGF*, *VEGFB* и *TRKA* вместо зондов использовали интеркалирующий краситель 50× SYBR Green I («Евроген»). Также для *BDNF*, *NGF*, *VEGFB* и *TRKA* проводился анализ кривых плавления. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов («ДНК-Синтез») представлены в табл. 1. Реакцию проводили на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler с детектирующей системой CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad»). Каждую пробу ставили в трех параллелях. Дополнительно

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использовавшихся праймеров и зондов

Ген	Нуклеотидные последовательности (5'→3')
<i>VEGFA</i> NM_031836.3	F: AGGGTCAAAAACGAAAGCGC R: CGCGAGTCTGTGTTTTGCA Зонд: ROX-CCTGGAGCGTTCACTGTGAGCCT-BHQ2
<i>VEGFB</i> NM_053549.1	F: TGGTACCTCTGAGCATGGAA R: GAGGATCTGCATTCCGACTT
<i>KDR (VEGFR-2)</i> NM_013062.2	F: TTCCCGTCCTCAAAGCATCA R: TGTACGCTGTGCAGGTGTAT Зонд: FAM-CCCTTCCTGGGACTGTGGCAAAGA-BHQ1
<i>BDNF</i> NM_001270638.1	F: CAGGTCGATTAGGTGGCTTCA R: CATAAACCACCGACATGGAGC
<i>NGF</i> NM_001277055.1	F: TGCATAGCGTAATGTCCATGTTG R: CTGTGTCAAGGGAATGCTGAA
<i>TRKA (NTRK1)</i> NM_021589.1	F: GACCCCATCCCTGTCTCCTT R: CCACAGAGACCCCAAAGGT
<i>TRKB (NTRK2)</i> NM_012731.3	F: GACAGTCCTCTGTGGCCAGG R: TGGCTCTCCCTGGACTCTTT Зонд: ROX-CCCCAGCCCTGAGGTGCGCA-BHQ2
<i>P75NTR (NGFR)</i> NM_012610.2	F: AGAGGGGCACATACTCAGACG R: TCGACCAGGGATCTCTTCGC Зонд: FAM-TGCACGCCCTGGGCTGATGCTGAA-BHQ1
<i>YWHAZ</i> NM_013011	F: GATGAAGCCATTGCTGAAGTTG R: GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC Зонд: ROX-TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC-BHQ2
<i>PGK1</i> NM_053291	F: ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC R: AGCCACAGCCTCAGCATATTC Зонд: HEX-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGA-BHQ2

Таблица 2. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на массу плода и плаценты самок крыс

Срок беременности	Масса плода (мг)		Масса плаценты (мг)	
	Контроль	ГГЦ	Контроль	ГГЦ
E14	174,4 ± 4,0	165,7 ± 3,1	170,1 ± 4,4	160,5 ± 5,8
E20	4104,8 ± 92,9	3518,2 ± 60,3 ***	567,6 ± 14,6	486,7 ± 12,6 ***

Примечание. Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$) от среднеарифметической массы всех плодов или плацент в помете каждой самки ($n = 12$ самок для всех групп); *** $p < 0,001$.

в качестве контролей были использованы образцы РНК, с которыми не проводили обратную транскрипцию, а также отрицательный контроль ПЦР без добавления кДНК. Относительная продукция мРНК рассчитывалась по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [45]. Данные, полученные для генов интереса, нормировали по среднему геометрическому значений двух генов домашнего хозяйства. Выбор референсных генов был обусловлен их участием в различных звеньях кле-

точного гомеостаза, а также тем, что их экспрессия достаточно стабильна в плаценте.

Статистическая обработка данных. Для выявления статистически значимых различий данные обрабатывали с помощью программы STATISTICA 10.0. Для сравнения исследованных показателей был использован непараметрический U-критерий Манна–Уитни и t-тест для независимых выборок. Выбор статистического метода основывался на оценке харак-

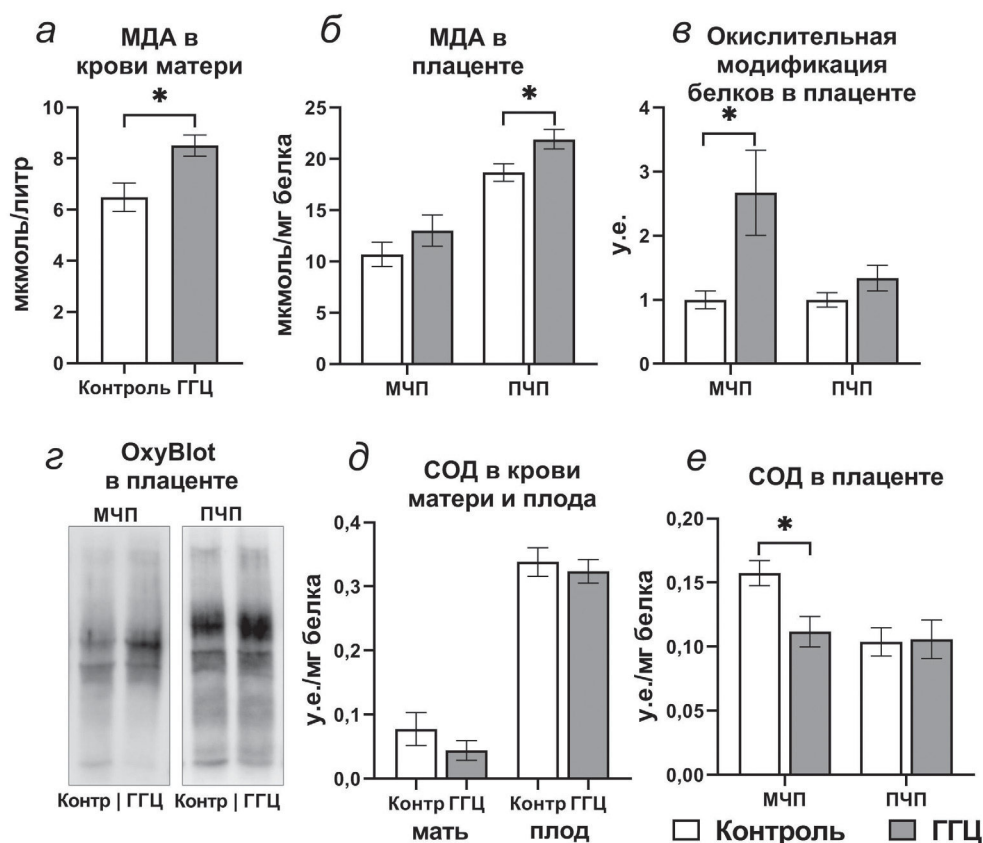


Рис. 2. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на показатели окислительного стресса у самок крыс и их плодов на 20-й день беременности (E20). *a* – Уровень перекисного окисления липидов (содержание малонового диальдегида, МДА) в крови беременных самок крыс ($n = 8–11$); *b* – содержание МДА в материнской (МЧП) и плодной (ПЧП) частях плацент ($n = 10–16$); *c* – относительный уровень окислительной модификации белка (оценен при помощи набора OxyBlot™) в материнской (МЧП) и плодной (ПЧП) частях плаценты крыс ($n = 10–11$), ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивности полос, полученных методом иммуноблоттинга, за условную единицу (у.е.) принят уровень окислительной модификации белка в данной части плаценты в контроле; *d* – репрезентативный OxyBlot продуктов окислительной модификации белков в плаценте; *e* – активность супероксиддисмутазы (СОД) в крови беременных самок крыс и их плодов ($n = 6$); *f* – активность СОД в материнской (МЧП) и плодной (ПЧП) частях плаценты ($n = 8$). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$

тера распределения признаков. Данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Расчет корреляций проводили методом ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Результаты на рисунках и в табл. 2 представлены как среднее арифметическое (M) $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На сроке беременности E14 не было отмечено значительных изменений массы тела плодов и плаценты под влиянием материнской ГГЦ, вместе с тем в конце беременности на сроке E20 наблюдалось выраженное снижение этих морфометрических показателей (табл. 2).

Материнская ГГЦ приводила к повышению на сроке E20 уровня маркера ПОЛ МДА в сыворотке крови самок крыс (рис. 2, а)

и ПЧП (рис. 2, б) ($p < 0,05$). Под влиянием ГГЦ было обнаружено также увеличение степени окислительной модификации белков в МЧП ($p < 0,05$) (рис. 2, в и г). В обеих исследуемых частях плаценты отмечалась положительная корреляция между уровнем МДА и степенью окислительной модификации белков (МЧП: $r = 0,683$; $p < 0,01$; ПЧП: $r = 0,468$; $p < 0,05$). В условиях материнской ГГЦ активность одного из основных антиоксидантных ферментов (СОД) на сроке E20 в крови матерей и плодов не претерпевала значительных изменений (рис. 2, д), вместе с тем в МЧП наблюдалось снижение активности этого фермента ($p < 0,05$) (рис. 2, е).

На сроке E20 в контроле в МЧП содержание активной расщепленной изоформы эффекторной каспазы-3 было сопоставимо с уровнем белка ее неактивного предшественника прокаспазы-3 (рис. 3, а и б), в то время как в ПЧП наблюдалось значительное преобладание неактивной прокаспазы-3 над ее активной формой (рис. 3, б и д). Под влиянием материнской ГГЦ

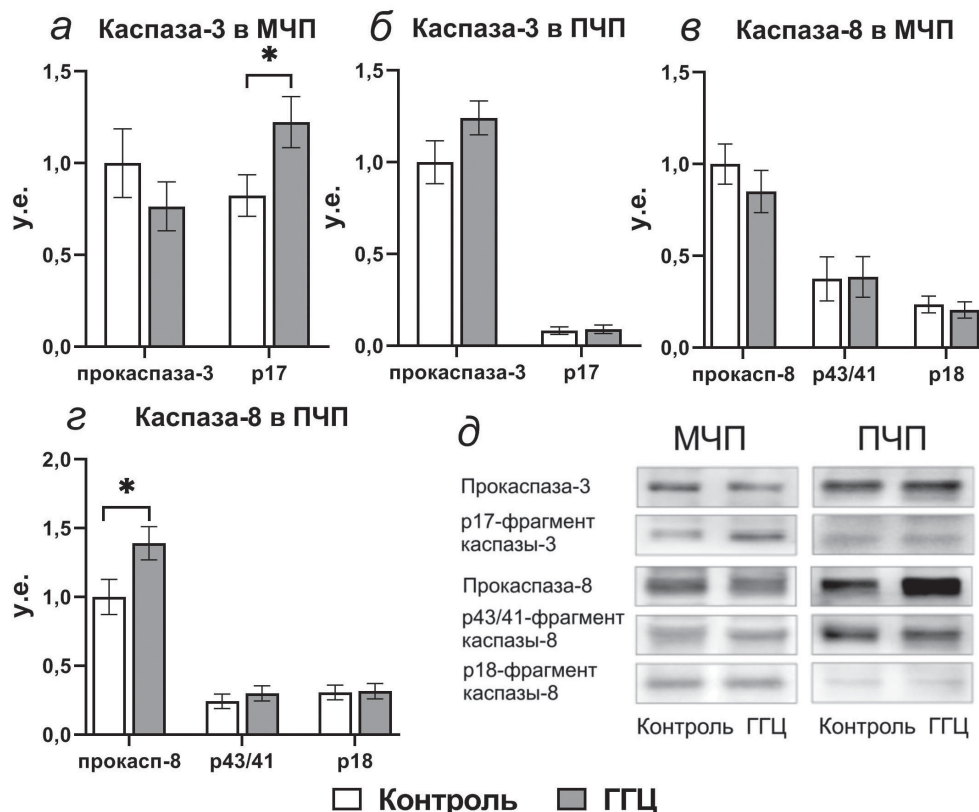


Рис. 3. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на содержание изоформ каспазы-3 и каспазы-8 в плаценте крыс на 20-й день беременности (E20). Содержание активной формы каспазы-3 (p17-фрагмент, ~17кДа) и ее неактивного предшественника (прокаспазы-3, ~35кДа) в материнской (МЧП) (а) и плодной (ПЧП) (б) частях плаценты ($n = 8-11$); содержание активной формы каспазы-8 (p18-фрагмент, ~18кДа) и ее неактивных предшественников (прокаспазы-8, ~57кДа; фрагмент промежуточного расщепления p43/p41, ~43/41кДа) в материнской (МЧП) (в) и плодной (ПЧП) (г) частях плаценты ($n = 10-11$); ось ординат — выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга; за условную единицу (у.е.) принято содержание прокаспазы-3 (а и б) или прокаспазы-8 (в и г) в контроле; д — репрезентативный вестерн-блот изоформ каспаз-3 и -8. Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$

содержание активной изоформы каспазы-3 повышалось в МЧП ($p < 0,05$) (рис. 3, а и д) и не изменялось в ПЧП (рис. 3, б), уровень неактивной прокаспазы-3 в обеих исследуемых отделах плаценты не претерпевал достоверных изменений. ГГЦ не оказывала влияния на содержание активной изоформы инициаторной каспазы-8 (p18) и ее предшественников (прокаспазы-8, фрагмент p43/41) в МЧП (рис. 3, в), вместе с тем в ПЧП наблюдалось повышение уровня прокаспазы-8 ($p < 0,05$) (рис. 3, з).

В МЧП достоверное снижение содержания белка VEGF под влиянием материнской ГГЦ наблюдалось только на сроке E20 ($p < 0,05$) (рис. 4, а и д). В ПЧП отмечалось разнонаправленное влияние ГГЦ на уровень белка VEGF – снижение на сроке E14 ($p < 0,05$) и повышение на сроке E20 ($p < 0,01$) (рис. 4, б и д). Материнская ГГЦ сопровождалась достоверным снижением активности ММП-2 в МЧП на обоих исследуемых сроках ($p < 0,05$) (рис. 4, в и д), а в ПЧП – на сроке E20 ($p < 0,05$) (рис. 4, з и д).

Под влиянием материнской ГГЦ в МЧП не было отмечено значительных изменений в экспрессии генов *VEGFA*, *KDR* (*VEGFR-2*) и *VEGFB* на обоих исследуемых сроках (E14 и E20) (рис. 5, а). В ПЧП при воздействии ГГЦ уровень экспрессии *VEGFA* на сроках E14 и E20 также не изменялся, вместе с тем в этой части плаценты на сроке E20 наблюдалось снижение экспрессии *KDR* (*VEGFR-2*) и *VEGFB* ($p < 0,05$) (рис. 5, б).

На сроке беременности E14 под влиянием материнской ГГЦ в МЧП наблюдалось повышение уровня proBDNF ($p < 0,05$) (рис. 6, а и е), сопровождавшееся снижением отношения mBDNF/proBDNF в этой структуре ($p < 0,05$) (рис. 6, в). При этом не было отмечено изменения уровня обеих изоформ и отношения mBDNF/proBDNF в ПЧП (рис. 6, б, в и е). Содержание proNGF в МЧП и ПЧП при воздействии ГГЦ на сроке E14 не изменялось (рис. 6, г, д и е).

В МЧП под влиянием материнской ГГЦ не наблюдалось изменений в экспрессии генов

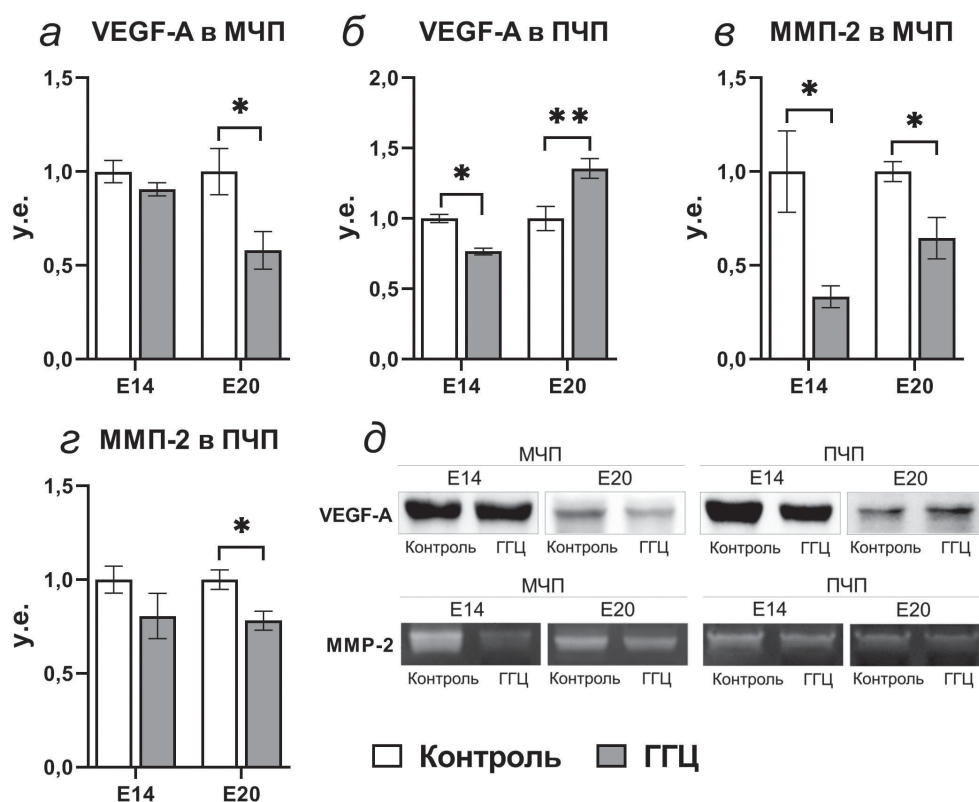


Рис. 4. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на содержание и активность ангиогенных факторов в плаценте крыс. Содержание VEGF, выраженное в условных единицах, в материнской (МЧП) (а) и плодной (ПЧП) (б) частях плацент на 14-й (E14) ($n = 4$) и на 20-й день беременности (E20) ($n = 6-9$); желатиная активность матриксной металлопротеиназы 2 (ММП-2) в материнской (МЧП) (в) и в плодной (ПЧП) (з) частях плаценты крыс на 14-й (E14) ($n = 5-6$) и на 20-й день беременности (E20) ($n = 4-8$); ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга или зимографии; за условную единицу (у.е.) принято содержание VEGF или активность ММП-2 в контроле; д – репрезентативный вестерн-блот VEGF (~44 кДа) и репрезентативная зимограмма ММП-2 (~67 кДа). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

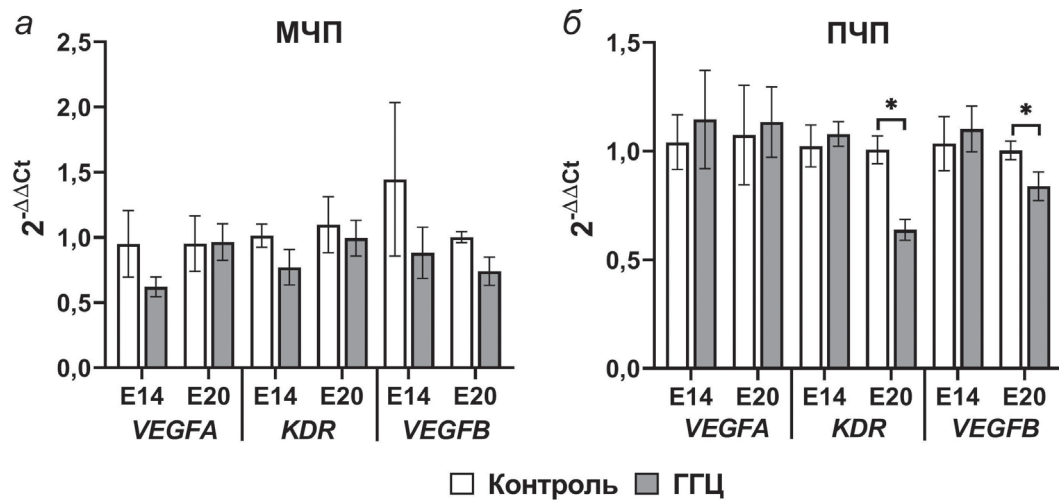


Рис. 5. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на уровень экспрессии генов ангиогенных факторов в плаценте крыс. Уровень экспрессии генов *VEGFA*, *KDR* (*VEGFR-2*) и *VEGFB* в материнской (МЧП) (а) и плодной (ПЧП) (б) частях плацент крыс на 14-й (E14) и 20-й (E20) дни беременности ($n = 4-8$). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$

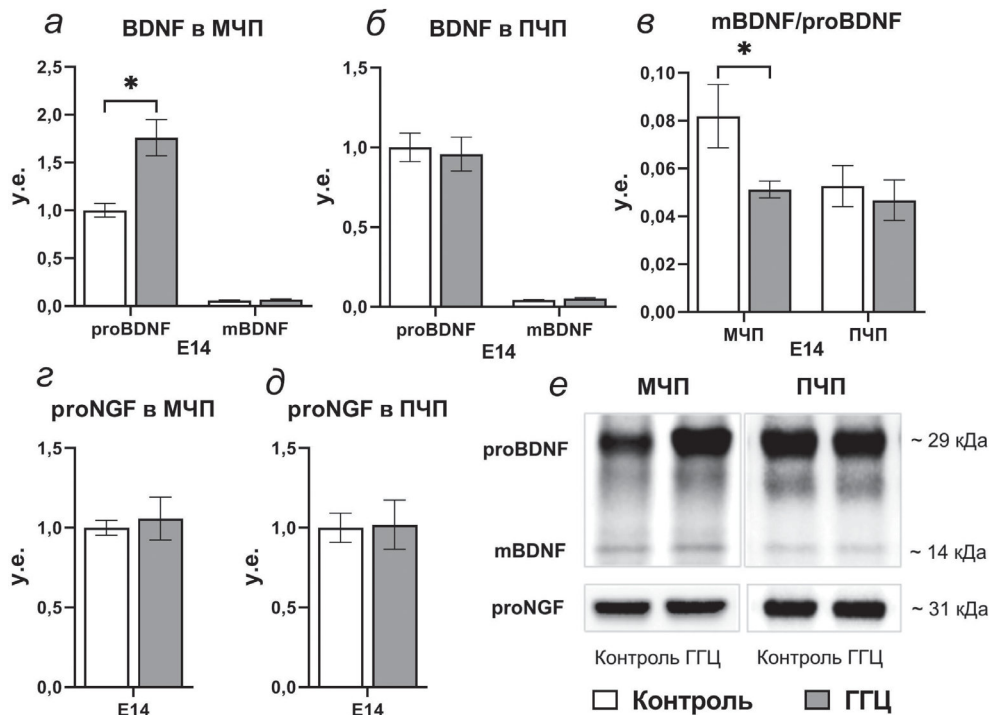


Рис. 6. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на содержание нейротрофинов в плаценте крыс. Содержание изоформ proBDNF и mBDNF в материнской (МЧП) (а) и плодной (ПЧП) (б) частях плацент и отношение mBDNF/proBDNF (в) на 14-й день беременности (E14) ($n = 14-15$); содержание изоформы proNGF в материнской (МЧП) (г) и плодной (ПЧП) (д) частях плацент на 14-й день беременности (E14) ($n = 13-15$); ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга; за условную единицу (y.e.) принято содержание proBDNF (а и б) или proNGF (г и д) в контроле; е – репрезентативный вестерн-блот proBDNF (~29 кДа), mBDNF (~14 кДа) и proNGF (~31 кДа). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

BDNF, *NGF* и *TRKB* на обоих исследуемых сроках (E14 и E20) (рис. 7, а). В ПЧП в группе ГГЦ экспрессия генов *NGF* и *TRKB* оказалась сниженной на сроке E20 ($p < 0,05$) (рис. 7, б), в то время как уровень экспрессии *BDNF* и

P75NTR в этом отделе плаценты при воздействии ГГЦ не изменялся (рис. 7, б). Экспрессия гена *TRKA* в обеих частях плаценты не была выявлена ни в одной из исследуемых групп животных.

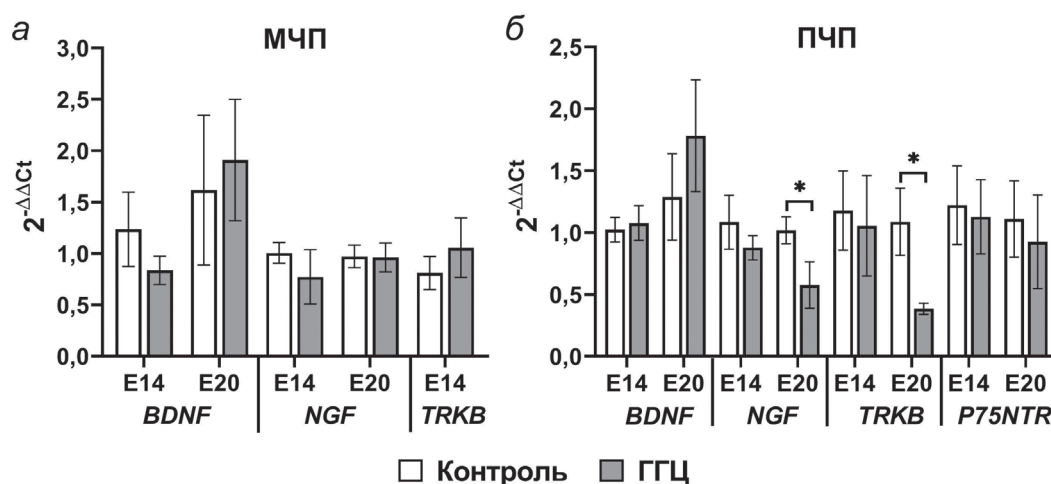


Рис. 7. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на уровень экспрессии генов нейротрофинов и их рецепторов в плаценте крыс. Уровень экспрессии генов *BDNF*, *NGF* и рецептора *TRKB* (*NTRK2*) в материнской части плаценты (МЧП) (а), а также уровень экспрессии генов *BDNF*, *NGF* и рецепторов *TRKB* (*NTRK2*), *P75NTR* (*NGFR*) в плодной части плаценты крыс (ПЧП) (б) на 14-й (E14) и 20-й (E20) дни беременности ($n = 4-8$). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ряде клинических и экспериментальных исследований было отмечено, что материнская ГГЦ вызывает задержку роста плода у человека и животных [31, 46, 47]. Полученные нами в настоящей работе и в предыдущих исследованиях [30] данные подтверждают эти наблюдения и дополняют их тем, что снижение массы плодов крыс под влиянием ГГЦ в нашей модели происходит не в период органогенеза, завершающийся к сроку беременности E14 [8], а на этапе усиленного роста плода в период с E14 по E20. В этот же период, когда в физиологических условиях происходит значительное увеличение содержащего сосуды матери и плода лабиринтного слоя плаценты [48], в группе с воздействием ГГЦ нами наблюдалась задержка роста плаценты, приводящая к уменьшению ее массы, возможно, за счет снижения толщины ее лабиринтного слоя.

Одним из основных механизмов токсических эффектов ГГЦ, как в отношении сердечно-сосудистой системы, так и ЦНС, является ОС, обусловленный усилением продукции активных форм кислорода и снижением активности основных антиоксидантных систем [49]. Развитие ОС и активация процессов апоптоза в системе мать—плацента—плод под влиянием материнской ГГЦ изучалось в основном в отношении мозга плода [30, 50, 51], обладающего повышенной чувствительностью к свободнорадикальному окислению и низкой активностью антиоксидантной защиты [52]. В предыдущих исследованиях было показано, что материнская ГГЦ вызывает повышение уровня ПОЛ,

окислительной модификации ДНК, снижение активности одного из важнейших антиоксидантных ферментов, СОД, и общей антиоксидантной активности в мозге новорожденных крыс [50, 53].

Плацента представляет собой особый и до сих пор малоизученный объект воздействия ГГЦ, основную клеточную массу ее составляют клетки трофобласта, отличающиеся по своим свойствам от клеток сосудов и нейрональных клеток, в отношении которых в основном изучались токсические эффекты ГЦ. По нашим сведениям, изучение непосредственного влияния материнской ГГЦ на показатели ОС, антиоксидантной защиты и на пути активации апоптоза в ткани плаценты *in vivo* до сих пор не проводилось, хотя подобные показатели в плаценте человека исследовались при состоянии ПЭ [20, 21]. Также в ряде исследований *in vitro* было обнаружено усиление процессов апоптоза клеток трофобласта под влиянием высоких концентраций ГЦ [54, 55]. На развитие ОС в организме матери в наших экспериментальных условиях указывает интенсификация ПОЛ в материнской крови. При изучении воздействия ГГЦ на плаценту нами было отмечено увеличение ПОЛ в ПЧП и усиление окислительной модификации белков в МЧП. Несмотря на то что повышение уровня МДА в МЧП и степени окислительной модификации белков в ПЧП не достигало требуемого уровня значимости, при анализе корреляционных зависимостей как в МЧП, так и в ПЧП отмечалась положительная корреляция между этими двумя маркерами ОС. Полученные результаты дают возможность полагать,

что материнская ГЦ вызывает ОС в плаценте. Отмеченная разная чувствительность к ОС маркеров ПОЛ и окислительной модификации белков в двух исследованных частях плаценты может объясняться различиями их морфологической структуры, определяющей степень доступности ГЦ тем или иным клеткам, а также неодинаковым липидным и белковым составом клеток в МЧП и ПЧП. В крови матерей и плодов, а также в ПЧП под влиянием ГЦ не наблюдалось повышения активности СОД, а в МЧП уровень активности СОД даже снижался, что может указывать на отсутствие активации или даже снижение активности антиоксидантной системы. Следует отметить, что во многих исследованиях под действием ГЦ отмечалось сходное снижение уровня общей антиоксидантной защиты, однако влияние ГЦ на экспрессию генов, уровень белка и активность отдельных антиоксидантных ферментов в различных тканях не носило однонаправленного характера [56]. Можно предположить, что спектр индуцируемых под влиянием ГЦ активных форм кислорода в МЧП и ПЧП различается, в связи с чем в их устранении принимают преимущественное участие различные антиоксиданты и антиоксидантные ферменты. Для более полного изучения механизмов развития ОС и нитрозативного стресса в плаценте при материнской ГЦ необходимо в дальнейшем провести исследования более широкого диапазона маркеров окислительного повреждения макромолекул и показателей антиоксидантной защиты, изучив также влияние ГЦ на продукцию и биодоступность оксида азота как фактора, играющего важную роль в процессах плацентарного ангиогенеза [57].

Полученные в данном исследовании результаты впервые показали, что материнская ГЦ, наряду со стимулированием ОС, способна вызывать активацию процессов апоптоза в плаценте грызунов. Увеличение в МЧП содержания активной формы эффекторной каспазы-3 и отсутствие повышения активной формы инициаторной каспазы-8 позволяет предполагать, что активация апоптоза в данном случае происходит по внутреннему митохондриальному пути, как уже было отмечено в отношении воздействия ГЦ на клетки мозга [58]. Повышение уровня активной каспазы-3 в сочетании с данными о повышении окислительной модификации белков и снижении уровня активности СОД в МЧП указывают на связь между ОС и активацией процессов апоптоза в данном отделе плаценты. Усиление под влиянием ГЦ ОС, запускающего процессы апоптоза, может приводить к гибели проду-

цирующих ангиогенные и ростовые факторы клеток плаценты, тем самым вызывая снижение уровня и нарушение необходимого для нормального формирования плацентарной сосудистой сети баланса этих факторов.

К наиболее вероятным механизмам негативного воздействия материнской ГЦ на функциональное состояние плаценты относят нарушения плацентарного васкуло- и ангиогенеза [21, 26, 27, 59]. Как отмечалось выше, этому могут способствовать инициируемые ГЦ процессы ОС и апоптоза в плаценте, способные вызывать нарушения морфологического созревания плацентарной сосудистой сети [20–22]. На наличие у ГЦ антиангиогенных эффектов указывают и его васкулотоксические свойства, характеризующиеся развитием в эндотелиальных клетках ОС и стресса эндоплазматического ретикулума, уменьшением биодоступности продуцируемого этими клетками оксида азота, а также снижением количества эндотелиоцитов вследствие их апоптотической гибели, что приводит к развитию эндотелиальной дисфункции [49, 60]. Косвенным доказательством возможного негативного воздействия повышенного уровня ГЦ в крови матери на ангиогенез в плаценте служит тот факт, что ГЦ рассматривается в качестве фактора риска развития ПЭ и ЗВУР [61, 62], этиология которых, как предполагают, связана с неполным формированием сосудистой сети плаценты и нарушением ремоделирования материнских спиральных артерий [34, 35]. Вместе с тем исследования, в которых бы изучалось воздействие ГЦ на уровень ангиогенных факторов и процессы ангиогенеза непосредственно на уровне плаценты, крайне немногочисленны. В модели материнской ГЦ, вызванной диетой с дефицитом фолатов, у беременных самок мышей на сроке E6–E8 (после имплантации, но до образования плаценты) в материнской децидуальной оболочке наблюдалось снижение экспрессии на уровне мРНК и белка ангиогенных факторов VEGF, VEGFR-2 и плацентарного фактора роста (PlGF), сопровождавшееся задержкой децидуального ангиогенеза [59]. В другой работе, выполненной также на самках мышей, было показано снижение уровня мРНК и белка VEGF в цельной плаценте на сроке E17,5 после однократного введения ГЦ [28]. На модели экстраэмбриональной сосудистой сети куриного эмбриона было показано ингибирующее воздействие ГЦ на васкуло- и ангиогенез, сопровождающееся снижением экспрессии генов и уровня белков VEGF и VEGFR-2 [26, 27].

В настоящей работе было впервые изучено влияние хронической материнской ГГЦ на уровень VEGF в различных функциональных частях плаценты на разных сроках ее формирования. Полученные данные позволяют предположить, что эффект ГГЦ может различаться в зависимости от срока беременности и исследуемого отдела плаценты. При воздействии ГГЦ на сроке E14 нами наблюдалось снижение уровня VEGF в ПЧП и отсутствие значительных изменений содержания этого фактора в МЧП, в то время как к концу беременности, на сроке E20, снижение содержания VEGF в МЧП сопровождалось повышением его уровня в ПЧП. Возможными причинами различий в характере изменений уровня VEGF под действием ГГЦ в двух исследованных отделах плаценты могут являться как различие функций, которые, как предполагается, выполняет VEGF в МЧП и ПЧП [3, 63], так и изменение характера проангиогенного действия VEGF на разных сроках созревания плаценты [64], что подробнее обсуждается ниже.

Зрелая плацента грызунов представлена двумя морфологически и функционально различными зонами. Находящаяся в непосредственной близости к плоду лабиринтная часть плаценты (ПЧП) содержит сосуды матери и плода и является основной зоной трансплацентарного обмена. Прилегающая к ней с материнской стороны базальная губчатая часть или спонгиозотрофобласт (МЧП) гораздо менее васкуляризирована, содержит только сосуды матери и играет, как предполагается, эндокринную роль [1]. Синтезируемый в ПЧП клетками трофобласта и эндотелия VEGF является ключевым фактором развития плацентарной сети в данном отделе плаценты [5, 65]. Предполагается, что VEGF, синтезируемый в МЧП, осуществляет в большей степени эндокринную функцию либо непосредственно, высвобождаясь в материнский кровоток, либо путем влияния на эндокринную активность клеток трофобласта [63]. Характер ангиогенного действия VEGF в плаценте в процессе ее развития изменяется. У человека в первом триместре беременности VEGF иницирует формирование первичной плацентарной сосудистой сети; во втором триместре он, наряду с другими проангиогенными факторами, индуцирует разветвление первичных сосудов; в последнем же триместре разветвляющее действие VEGF ингибируется, что приводит к удлинению сформированных сосудов и увеличению площади обмена питательными веществами между матерью и плодом [3, 4].

Срок беременности E14 у грызунов соответствует началу второго триместра беременности у человека и характеризуется завершением процессов органогенеза и началом интенсивного роста плода. К этому сроку МЧП является уже полностью сформированной, в ПЧП же процессы пролиферации и ангиогенеза активно продолжают вплоть до последних дней внутриутробного развития, что позволяет адаптировать плацентарную кровеносную систему ко все возрастающим потребностям плода в кислороде и питательных веществах [7, 48, 66]. Усиленный рост ПЧП в период E14–E20 отражается на соотношении обеих зон плаценты: если на сроке E14 МЧП и ПЧП сопоставимы по толщине, то к концу беременности (E21) толщина ПЧП значительно превосходит толщину МЧП [48]. В этот период в ПЧП происходит как удлинение сосудов, так и их усиленное ветвление [66, 67], сопровождающееся значительным изменением экспрессии генов, в том числе контролирующих ангиогенез [68]. Получены данные, что в плаценте крыс на сроке E14 наблюдается повышение экспрессии гена *VEGF* по сравнению с E10, а к сроку E19 уровень экспрессии *VEGF* и *VEGFR-1 (FLT-1)* снижается [64], в другом исследовании показано, что экспрессия *VEGF* между E17 и E20 не претерпевает значительных изменений [68]. Следует предположить, что в период E14–E17 VEGF принимает наиболее важное участие в процессах плацентарного ангиогенеза, к сроку же окончания беременности (E20), когда плацентарное сосудистое дерево практически сформировано, его значение, как ангиогенного фактора, в ПЧП снижается. Другими активно начинающимися в период E13–E14 процессами, в которых VEGF, наряду с ММП, играет важную роль, является миграция клеток трофобласта и ремоделирование материнских спиральных артерий, необходимые для усиления кровоснабжения плода [7, 48, 64].

Отмеченное нами снижение под воздействием ГГЦ уровня VEGF в ПЧП на сроке E14, в ключевой момент для процессов формирования разветвленной сосудистой сети и ремоделирования материнских спиральных артерий, согласуется с данными других исследований [28, 59]. Повышение под влиянием материнской ГГЦ уровня VEGF в ПЧП на конечном сроке беременности (E20) могло явиться компенсаторной реакцией на недостаточное формирование разветвленной плацентарной сосудистой сети и возникающие вследствие него нарушения плацентарного кровообращения и гипоксию [35, 69], а также ответом на

отмеченное снижение экспрессии рецептора *KDR (VEGFR-2)* в этой части плаценты. Увеличение содержания VEGF в МЧП может быть также связано с повышением уровня стимулирующих экспрессию VEGF провоспалительных цитокинов [70], отмеченным нами ранее при воздействии ГГЦ в этой зоне плаценты [30].

Наблюдавшееся при воздействии ГГЦ снижение уровня VEGF в МЧП на E20 могло оказаться следствием уменьшения количества продуцирующих VEGF клеток, в частности, гигантских клеток трофобласта [71], и/или снижения в них синтеза VEGF вследствие отмеченной нами активации ОС и апоптотических процессов в данном отделе плаценты. С другой стороны, снижение уровня VEGF, обладающего антиапоптотической активностью [21], могло внести вклад в наблюдаемую в МЧП активацию процессов апоптоза. Роль VEGF в МЧП пока мало исследована, но, исходя из гипотезы, что VEGF, синтезируемый в МЧП, может высвобождаться в кровь матери и сигнализировать материнскому организму о функциональном состоянии плаценты [63], можно предположить, что снижение уровня VEGF в МЧП с последующим возможным уменьшением его секреции в кровь матери является одним из сигналов материнскому организму о нарушении развития плаценты под влиянием ГГЦ.

VEGF усиливает экспрессию и активность ММП-2 и -9, которые разрушают внеклеточный матрикс, освобождают от закоривания клетки эндотелия и трофобласта, позволяя им мигрировать, и посредством этих механизмов участвуют в процессах развития плаценты, плацентарного ангиогенеза, инвазии трофобласта и ремоделирования плацентарных артерий [8, 26, 65, 72–74]. Предполагается, что ММП совместно с VEGF вовлечены в патогенез плацентарных осложнений беременности, связанных с нарушением ангиогенеза, в частности, ПЭ [72]. Данные о влиянии ГЦ на содержание и ферментативную активность ММП в плаценте немногочисленны и неоднозначны: в культуре клеток цитотрофобласта человека ГЦ вызывал снижение синтеза и активности ММП-2 и -9 [75], в то время как в плаценте женщин с преждевременными родами и легкой ГГЦ уровень белка ММП-2 и -9 оказался повышенным [29]. Возможность разнонаправленного воздействия ГЦ на желатиназную активность ММП-2 подтверждено в опытах *in vitro*, показавших, что эффект ГЦ зависит от молярного соотношения ГЦ к ММП-2 — при молярном соотношении ГЦ/ММП-2 в пределах 1/1–100/1 наблюдается активация неактив-

ной формы предшественника проММП-2, при повышении уровня ГЦ (молярное соотношение ГЦ/ММП-2 большее 1000/1) происходит ингибирование активной формы ММП-2 [76].

В данной работе нами впервые было изучено влияние ГЦ на активность ММП в плаценте крыс и показано, что под влиянием материнской ГГЦ в обеих изученных частях плаценты наблюдается снижение активности ММП-2, особенно четко проявляющееся в МЧП на обоих изучаемых сроках беременности (E14 и E20). Снижение активности ММП-2 в плаценте может являться следствием прямого ингибирующего воздействия высоких концентраций ГЦ [76], а также быть связано с уменьшением уровня VEGF, которое в МЧП совпадает со снижением активности ММП-2, а в ПЧП — предшествует этому снижению. Характерно, что сходное снижение уровней VEGF и ММП-2 в децидуальной оболочке и плаценте мышей, сопровождавшееся нарушением плацентарного ангиогенеза и задержкой роста плода, наблюдалось при пренатальном воздействии алкоголя, который, подобно ГЦ, способен индуцировать развитие ОС [65, 77].

Фактор VEGF-B, связывающийся с рецептором VEGFR-1 (Flt-1), по-видимому, имеет не столь решающее значение для развития плода, как VEGF. Выключение у мышей гена *VEGFB* не вызывало серьезных отклонений в развитии, в то время как инактивация гена *VEGFA* приводила к эмбриональной гибели на сроке E11–E12 [6, 78]. Возможная ангиогенная роль фактора VEGF-B в плаценте остается невыясненной, вместе с тем отмечено, что уровень белка VEGF-B, наряду с ключевыми ангиогенными факторами VEGF и PlGF, в плаценте мышей снижается в модели задержки роста плода, вызванного гиперэкспрессией sFlt-1, являющегося антагонистом VEGF [79]. Установлено, что VEGF-B может выполнять антиоксидантные функции, повышая активность ключевых антиоксидантных ферментов [80]. Отмеченное нами снижение экспрессии фактора *VEGFB* в ПЧП на сроке E20 может быть связано как с нарушениями ангиогенеза, так и с наблюдаемым под влиянием материнской ГГЦ снижением уровней антиоксидантов и общей антиоксидантной защиты [53].

В процессе развития нейротрофины BDNF и NGF, помимо своей основной роли регуляторов жизненно значимых процессов роста и дифференциации нейронов ЦНС, выполняют также проангиогенную функцию, усиливая пролиферацию и миграцию клеток эндотелия [9, 81–83]. Предполагается, что в плаценте человека и грызунов нейротрофины, так же

как и в ЦНС, выступают в качестве важных ростовых и проангиогенных факторов [9, 13, 84–87]. BDNF, NGF и их специфические рецепторы TrkB и TrkA, а также рецептор p75NTR, с которым селективно связываются предшественники нейротрофинов proBDNF и proNGF, обнаруживаются на уровне белка и/или мРНК как в материнских децидуальных и эндотелиальных клетках, так и в клетках трофобласта и эндотелия сосудов плода [10, 11, 13, 14, 88–93]. Показано, что активация сигнального пути BDNF/TrkB усиливает пролиферацию и дифференциацию клеток трофобласта и снижает в них уровень апоптоза [10, 92], в том числе вызванного ОС [11]. Установлено участие системы NGF в формировании плаценты и становлении иммунологической толерантности матери к плоду [93, 94], хотя сигнальные пути и механизмы, обеспечивающие эффекты NGF в плаценте, остаются недостаточно выясненными. Также остается неизученной самостоятельная сигнальная роль в плаценте предшественников нейротрофинов proBDNF и proNGF, способных в ЦНС через рецептор p75NTR оказывать антипролиферативное и проапоптотическое действие [95, 96]. Поэтому изучение роли нейротрофинов в плаценте и их взаимодействия с плацентарными ангиогенными факторами оставляет широкое поле для дальнейших исследований [9].

Ранее нами было показано, что материнская ГГЦ приводит к увеличению на сроке E20 содержания предшественников нейротрофических факторов proBDNF (29 кДа) и proNGF (31 кДа) в МЧП и ПЧП при неизменном уровне зрелой изоформы mBDNF (14 кДа), что могло явиться следствием как усиления синтеза этих нейротрофинов, так и нарушения процессинга их незрелых форм [30]. В качестве продолжения предыдущего исследования в данной работе было изучено влияние ГГЦ на содержание белков proBDNF, mBDNF и proNGF на сроке E14, а также на экспрессию генов изучаемых нейротрофинов и их рецепторов на сроках E14 и E20 в МЧП и ПЧП. Под влиянием материнской ГГЦ в МЧП на сроке E14 отмечалось повышение содержания proBDNF, аналогичное наблюдавшемуся на сроке E20 в МЧП и ПЧП [30]. Отсутствие значительных изменений экспрессии гена *BDNF* в обеих исследованных частях плаценты под влиянием материнской ГГЦ, а также повышение уровня proBDNF и снижение отношения mBDNF/proBDNF в МЧП дают основание предположить, что в данном случае материнская ГГЦ вызывает замедление расщепления proBDNF с образованием mBDNF. Это пред-

положение косвенно подтверждается и наблюдаемым снижением при воздействии ГГЦ активности ММП-2, поскольку известно, что ММП, наряду с другими протеазами, участвуют в расщеплении незрелых форм нейротрофинов [97]. Кроме того, показано, что состояние ОС вызывает окислительную модификацию белков proBDNF и proNGF, препятствующую их процессингу при участии протеаз [98].

В отношении экспрессии NGF в плаценте грызунов имеются скудные и неоднозначные данные. У мышей на ранних сроках беременности (E7,5–E12,5) экспрессия мРНК *NGF* и рецептора *TRKA* отмечалась только в материнской децидуальной оболочке, но не в тканях плаценты, вместе с тем клетки трофобласта экспрессировали рецептор *P75NTR* и подвергались трансформации в гигантские клетки под воздействием NGF, вследствие чего авторы предположили, что на дифференциацию этих клеток оказывает влияние NGF материнского происхождения [93, 94]. В подтверждение этих данных в нашем исследовании также не наблюдалась экспрессия *TRKA* в обеих изученных частях плаценты, вместе с тем в ПЧП обнаруживалась экспрессия *P75NTR*. В ряде работ белок NGF определялся в цельной плаценте крыс на поздних сроках беременности (E16–E21) [15, 99, 100], однако его содержание в отдельных частях плаценты не было изучено. В данной работе, наряду с нашим предыдущим исследованием [30], впервые было исследовано содержание изоформы белка proNGF (31 кДа) в МЧП и ПЧП. В наших экспериментальных условиях зрелая форма mNGF (13,5 кДа) в обеих частях плаценты не обнаруживалась. Следует отметить, что в ЦНС и периферических тканях mNGF является минорной изоформой этого нейротрофина и не всегда определяется, основную же часть пула NGF составляет именно proNGF, который способен оказывать сходные со зрелой формой mNGF эффекты [95]. С другой стороны, в ЦНС proNGF через рецептор p75NTR может усиливать процессы апоптоза, поэтому предполагается, что характер действия этого нейротрофина определяется соотношением рецепторов TrkA и p75NTR в клетке [95]. Поскольку ранее нами было отмечено повышение под влиянием материнской ГГЦ уровня белка proNGF в обеих частях плаценты на сроке E20 [30], а в настоящем исследовании было показано отсутствие экспрессии *TRKA* в МЧП и ПЧП при наличии экспрессии *P75NTR*, можно предположить, что повышение уровня изоформы proNGF может вносить вклад в усиление процессов апоптоза в плаценте.

На сроке E14 изменений уровня белка proNGF в МЧП и ПЧП под действием ГГЦ не наблюдалось, экспрессия гена *NGF* также значительно не изменялась, вместе с тем на более позднем сроке (E20) в ПЧП происходило снижение экспрессии гена *NGF* при неизменном уровне его экспрессии в МЧП. Повышение содержания белков BDNF и NGF в различных отделах плаценты при отсутствии изменений экспрессии их мРНК было показано в условиях ПЭ [89, 90], что предполагает наличие посттранскрипционных механизмов изменения содержания этих нейротрофинов. Другим объяснением их повышенного содержания в плаценте при отсутствии увеличения или даже снижения уровня экспрессии соответствующих генов является предполагаемая возможность транспорта нейротрофинов в плаценту из организма матери [15, 16, 87, 93, 94].

В ПЧП на сроке E20 наблюдалось снижение уровня экспрессии гена рецептора BDNF *TRKB*. Уменьшение количества рецепторов TrkB при неизменном уровне mBDNF может привести к снижению активности сигнального пути BDNF/TrkB, что может негативно повлиять на процессы ангиогенеза, вызывая в эндотелиальных клетках активацию апоптоза и снижение экспрессии рецептора KDR (VEGFR-2) [83], которое на уровне мРНК наблюдалось и в нашем исследовании. В предшествующих работах было показано, что ингибирование сигналинга BDNF/TrkB приводит к уменьшению толщины лабиринтного слоя, веса плаценты и плода, а также активации апоптоза во всех отделах плаценты [10]. Усилению апоптоза может способствовать и повышение уровня предшественника proBDNF, через рецептор p75NTR оказывающего проапоптотическое действие [96]. Поэтому наблюдаемые нами в условиях материнской ГГЦ снижение веса плаценты и активация процессов апоптоза могут являться следствием воздействия ГГЦ на сигнальные пути BDNF в плаценте.

Полученные нами данные позволяют утверждать, что материнская ГГЦ оказывает воздействие на ряд проангиогенных и ростовых факторов в плаценте (VEGF-A, ММП-2, VEGF-B, BDNF и NGF), причем эффекты ГГЦ варьиру-

ют в зависимости от морфологического и функционального отдела плаценты и срока ее развития. Выявленное нарушение баланса проангиогенных и ростовых факторов в плаценте под влиянием ГГЦ может привести к замедлению ее роста и нарушениям процессов плацентарного ангиогенеза. В свою очередь, снижение поступления питательных веществ и кислорода от матери к плоду, являющееся следствием неполного развития плацентарной сосудистой сети, может служить одной из причин отмечаемых при материнской ГГЦ нарушений развития мозга плода и снижения когнитивных функций потомства.

Вклад авторов. И.Ю. Коган, А.В. Арутюнян — концепция и руководство работой; И.В. Залозная, Ю.П. Милютина, А.Д. Щербицкая, А.В. Михель, Д.Б. Иноземцева — проведение экспериментов; Ю.П. Милютина, А.Д. Щербицкая, И.В. Залозная, А.В. Михель, Д.Б. Иноземцева, Г.О. Керкешко, Д.С. Васильев, А.А. Коваленко — обработка образцов; А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко, Ю.П. Милютина, А.Д. Щербицкая — обсуждение результатов исследования; А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко — написание текста; А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко, Ю.П. Милютина, А.Д. Щербицкая — редактирование финального текста статьи.

Финансирование. Исследование воздействия ГГЦ на молекулярно-клеточные процессы, обуславливающие развитие плаценты, поддержано Российским научным фондом (проект № 22-15-00393), исследование параметров окислительного стресса и апоптоза в плаценте проведено в рамках Госзадания ФГБУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» (1021062812133-0-3.2.2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования (одобрены комитетом по этике Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, протокол № 88 от 08.12.2017), и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burton, G. J., Fowden, A. L., and Thornburg, K. L. (2016) Placental origins of chronic disease, *Physiol. Rev.*, **96**, 1509-1565, doi: 10.1152/physrev.00029.2015.
2. Roberts, J. M., and Escudero, C. (2012) The placenta in preeclampsia, *Pregnancy Hypertens*, **2**, 72-83, doi: 10.1016/j.preghy.2012.01.001.

3. Umapathy, A., Chamley, L. W., and James, J. L. (2020) Reconciling the distinct roles of angiogenic/anti-angiogenic factors in the placenta and maternal circulation of normal and pathological pregnancies, *Angiogenesis*, **23**, 105-117, doi: 10.1007/s10456-019-09694-w.
4. Chen, D. B., and Zheng, J. (2014) Regulation of placental angiogenesis, *Microcirculation*, **21**, 15-25, doi: 10.1111/micc.12093.
5. Wang, Y., and Zhao, S. (2010) *Vascular Biology of the Placenta* (Granger D. N., and Granger, J. P., eds) Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA), p. 1-90.
6. Ferrara, N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, *Endocr. Rev.*, **25**, 581-611, doi: 10.1210/er.2003-0027.
7. Silva, J. F., and Serakides, R. (2016) Intrauterine trophoblast migration: A Comparative view of humans and rodents, *Cell Adh. Migr.*, **10**, 88-110, doi: 10.1080/19336918.2015.1120397.
8. Gualdoni, G. S., Jacobo, P. V., Barril, C., Ventureira, M. R., and Cebal, E. (2021) Early abnormal placentation and evidence of vascular endothelial growth factor system dysregulation at the feto-maternal interface after periconceptional alcohol consumption, *Front. Physiol.*, **12**, 815760, doi: 10.3389/fphys.2021.815760.
9. Sahay, A. S., Sundrani, D. P., and Joshi, S. R. (2017) Neurotrophins: role in placental growth and development, *Vitam. Horm.*, **104**, 243-261, doi: 10.1016/bs.vh.2016.11.002.
10. Kawamura, K., Kawamura, N., Sato, W., Fukuda, J., Kumagai, J., and Tanaka, T. (2009) Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival, *Endocrinology*, **150**, 3774-3782, doi: 10.1210/en.2009-0213.
11. Fujita, K., Tatsumi, K., Kondoh, E., Chigusa, Y., Mogami, H., Fujii, T., Yura, S., Kakui, K., and Konishi, I. (2011) Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors, *Placenta*, **32**, 737-744, doi: 10.1016/j.placenta.2011.07.001.
12. Kawamura, K., Kawamura, N., Okamoto, N., and Manabe, M. (2013) Suppression of choriocarcinoma invasion and metastasis following blockade of BDNF/TrkB signaling, *Cancer Med.*, **2**, 849-861, doi: 10.1002/cam4.158.
13. Toti, P., Ciarmela, P., Florio, P., Volpi, N., Occhini, R., and Petraglia, F. (2006) Human placenta and fetal membranes express nerve growth factor mRNA and protein, *J. Endocrinol. Invest.*, **29**, 337-341, doi: 10.1007/BF03344105.
14. Mayeur, S., Silhol, M., Moitrot, E., Barbaux, S., Breton, C., Gabory, A., Vaiman, D., Dutriez-Casteloot, I., Fajardy, I., Vambergue, A., Tapia-Arancibia, L., Bastide, B., Storme, L., Junien, C., Vieau, D., and Lesage, J. (2010) Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human, *Placenta*, **31**, 785-791, doi: 10.1016/j.placenta.2010.06.008.
15. Gilmore, J. H., Jarskog, L. F., and Vadlamudi, S. (2003) Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat, *J. Neuroimmunol.*, **138**, 49-55, doi: 10.1016/S0165-5728(03)00095-X.
16. Kodomari, I., Wada, E., Nakamura, S., and Wada, K. (2009) Maternal supply of BDNF to mouse fetal brain through the placenta, *Neurochem. Int.*, **54**, 95-98, doi: 10.1016/j.neuint.2008.11.005.
17. Briana, D. D., and Malamitsi-Puchner, A. (2018) Developmental origins of adult health and disease: The metabolic role of BDNF from early life to adulthood, *Metabolism*, **81**, 45-51, doi: 10.1016/j.metabol.2017.11.019.
18. Boldyrev, A. A. (2009) Molecular mechanisms of homocysteine toxicity, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 589-598, doi: 10.1134/s0006297909060017.
19. Skovierova, H., Vidomanova, E., Mahmood, S., Sopkova, J., Drgova, A., Cervenova, T., Halasova, E., and Lehotsky, J. (2016) The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1733, doi: 10.3390/ijms17101733.
20. Kasture, V., Sundrani, D., Randhir, K., Wagh, G., and Joshi, S. (2021) Placental apoptotic markers are associated with placental morphometry, *Placenta*, **115**, 1-11, doi: 10.1016/j.placenta.2021.08.051.
21. Kasture, V. V., Sundrani, D. P., and Joshi, S. R. (2018) Maternal one carbon metabolism through increased oxidative stress and disturbed angiogenesis can influence placental apoptosis in preeclampsia, *Life Sci.*, **206**, 61-69, doi: 10.1016/j.lfs.2018.05.029.
22. Pereira, R. D., De Long, N. E., Wang, R. C., Yazdi, F. T., Holloway, A. C., and Raha, S. (2015) Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling, *Biomed. Res. Int.*, **2015**, 814543, doi: 10.1155/2015/814543.
23. Zhang, Q., Li, Q., Chen, Y., Huang, X., Yang, I. H., Cao, L., Wu, W. K., and Tan, H. M. (2012) Homocysteine-impaired angiogenesis is associated with VEGF/VEGFR inhibition, *Front. Biosci. (Elite Ed)*, **4**, 2525-2535, doi: 10.2741/e563.
24. Rodriguez-Nieto, S., Chavarria, T., Martinez-Poveda, B., Sanchez-Jimenez, F., Rodriguez Quesada, A., and Medina, M. A. (2002) Anti-angiogenic effects of homocysteine on cultured endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 497-500, doi: 10.1016/S0006-291X(02)00232-2.
25. Pan, L., Yu, G., Huang, J., Zheng, X., and Xu, Y. (2017) Homocysteine inhibits angiogenesis through cytoskeleton remodeling, *Biosci. Rep.*, **37**, BSR20170860, doi: 10.1042/BSR20170860.
26. Latacha, K. S., and Rosenquist, T. H. (2005) Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular develop-

- ment in the avian embryo, *Dev. Dyn.*, **234**, 323-331, doi: 10.1002/dvdy.20527.
27. Oosterbaan, A. M., Steegers, E. A., and Ursem, N. T. (2012) The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development, *Microvasc. Res.*, **83**, 98-104, doi: 10.1016/j.mvr.2011.11.001.
 28. Xu, X., Yang, X. Y., He, B. W., Yang, W. J., and Cheng, W. W. (2016) Placental NRP1 and VEGF expression in pre-eclamptic women and in a homocysteine-treated mouse model of pre-eclampsia, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **196**, 69-75, doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.11.017.
 29. Bala, R., Verma, R., Budhwar, S., Prakash, N., and Sachan, S. (2022) Fetal hyperhomocysteinemia is associated with placental inflammation and early breakdown of maternal-fetal tolerance in pre-term birth, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **88**, e13589, doi: 10.1111/aji.13589.
 30. Arutjunyan, A. V., Milyutina, Y. P., Shcherbitskaia, A. D., Kerkeshko, G. O., Zalizniaia, I. V., and Mikhel, A. V. (2020) Neurotrophins of the fetal brain and placenta in prenatal hyperhomocysteinemia, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 248-259, doi: 10.1134/S000629792002008X.
 31. Dai, C., Fei, Y., Li, J., Shi, Y., and Yang, X. (2021) A novel review of homocysteine and pregnancy complications, *Biomed. Res. Int.*, **2021**, 6652231, doi: 10.1155/2021/6652231.
 32. Rosenfeld, C. S. (2021) The placenta-brain-axis, *J. Neurosci. Res.*, **99**, 271-283, doi: 10.1002/jnr.24603.
 33. Shallie, P. D., and Naicker, T. (2019) The placenta as a window to the brain: a review on the role of placental markers in prenatal programming of neurodevelopment, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **73**, 41-49, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.01.003.
 34. Burton, G. J., and Jauniaux, E. (2018) Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **218**, S745-S761, doi: 10.1016/j.ajog.2017.11.577.
 35. Burton, G. J., Redman, C. W., Roberts, J. M., and Moffett, A. (2019) Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications, *BMJ*, **366**, 12381, doi: 10.1136/bmj.12381.
 36. Yakovleva, O., Bogatova, K., Mukhtarova, R., Yakovlev, A., Shakhmatova, V., Gerasimova, E., Ziyatdinova, G., Hermann, A., and Sitdikova, G. (2020) Hydrogen sulfide alleviates anxiety, motor, and cognitive dysfunctions in rats with maternal hyperhomocysteinemia via mitigation of oxidative stress, *Biomolecules*, **10**, 995, doi: 10.3390/biom10070995.
 37. Arutjunyan, A., Kozina, L., Stvolinskiy, S., Bulygina, Y., Mashkina, A., and Khavinson, V. (2012) Pineal on protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **5**, 179-185.
 38. Baydas, G., Koz, S. T., Tuzcu, M., and Nedzvetsky, V. S. (2008) Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats, *J. Pineal Res.*, **44**, 181-188, doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00506.x.
 39. Shcherbitskaya, A. D., Milyutina, Y. P., Zaliznyaya, I. V., Arutjunyan, A. V., Nalivaeva, N. N., and Zhuravin, I. A. (2017) The effects of prenatal hyperhomocysteinemia on the formation of memory and the contents of biogenic amines in the rat hippocampus, *Neurochem. J.*, **11**, 296-301, doi: 10.1134/s1819712417040080.
 40. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
 41. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Мажуль Л. М. (1987) Анализ методов определения продуктов ПОЛ в сыворотке крови по тесту с ТБК, *Вопр. мед. химии*, **33**, 118-122.
 42. Vasilev, D.S., Shcherbitskaia, A.D., Tumanova, N.L., Mikhel, A.V., Milyutina, Y.P., Kovalenko, A.A., Dubrovskaya, N.M., Inozemtseva, D.B., Zalizniaia, I.V., and Arutjunyan, A.V. (2023) Maternal hyperhomocysteinemia disturbs the mechanisms of embryonic brain development and its maturation in early postnatal ontogenesis, *Cells*, **12**, 189, doi: 10.3390/cells12010189.
 43. Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szweczyk, N. J., Smith, K., and Atherton, P. J. (2017) An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **27**, 4-25, doi: 10.1111/sms.12702.
 44. Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Кожухарова И. В., Гамалей И. А. (2011) Изменение активности матриксных металлопротеиназ первичных эмбриональных фибробластов мыши в процессе культивирования, *Цитология*, **53**, 49-54.
 45. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method, *Methods*, **25**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
 46. Mori, M., Yamashita, Y., Hiroi, Y., Shinjo, S., Asato, R., Hirai, K., Suzuki, K., and Yamamoto, S. (1999) Effect of single essential amino acid excess during pregnancy on dietary nitrogen utilization and fetal growth in rats, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **8**, 251-257, doi: 10.1046/j.1440-6047.1999.00094.x.
 47. Yakovleva, O. V., Ziganshina, A. R., Dmitrieva, S. A., Arslanova, A. N., Yakovlev, A. V., Minibayeva, F. V., Khaertdinov, N. N., Ziyatdinova, G. K., Giniatullin, R. A., and Sitdikova, G. F. (2018) Hydrogen sulfide ameliorates developmental impairments of rat offspring with prenatal hyperhomocysteinemia, *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2018**, 2746873, doi: 10.1155/2018/2746873.
 48. Furukawa, S., Tsuji, N., and Sugiyama, A. (2019) Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation, *J. Toxicol. Pathol.*, **32**, 1-17, doi: 10.1293/tox.2018-0042.

49. Esse, R., Barroso, M., Tavares de Almeida, I., and Castro, R. (2019) The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: state-of-the-art, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 867, doi: 10.3390/ijms20040867.
50. Koz, S. T., Gouwy, N. T., Demir, N., Nedzvetsky, V. S., Etem, E., and Baydas, G. (2010) Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **28**, 325-329, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.02.006.
51. Li, W., Li, Z., Zhou, D., Zhang, X., Yan, J., and Huang, G. (2019) Maternal folic acid deficiency stimulates neural cell apoptosis via miR-34a associated with Bcl-2 in the rat foetal brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **72**, 6-12, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.11.002.
52. Ikonomidou, C., and Kaindl, A. M. (2011) Neuronal death and oxidative stress in the developing brain, *Antioxid. Redox Signal*, **14**, 1535-1550, doi: 10.1089/ars.2010.3581.
53. Pustygina, A. V., Milyutina, Y. P., Zaloznyaya, I. V., and Arutyunyan, A. V. (2015) Indices of oxidative stress in the brain of newborn rats subjected to prenatal hyperhomocysteinemia, *Neurochem. J.*, **9**, 60-65, doi: 10.1134/s1819712415010079.
54. Di Simone, N., Maggiano, N., Caliendo, D., Riccardi, P., Evangelista, A., Carducci, B., and Caruso, A. (2003) Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features, *Biol. Reprod.*, **69**, 1129-1134, doi: 10.1095/biolreprod.103.015800.
55. Kamudhamas, A., Pang, L., Smith, S. D., Sadovsky, Y., and Nelson, D. M. (2004) Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **191**, 563-571, doi: 10.1016/j.ajog.2004.01.037.
56. Faverzani, J. L., Hammerschmidt, T. G., Sitta, A., Deon, M., Wajner, M., and Vargas, C. R. (2017) Oxidative stress in homocystinuria due to cystathionine ss-synthase deficiency: findings in patients and in animal models, *Cell Mol. Neurobiol.*, **37**, 1477-1485, doi: 10.1007/s10571-017-0478-0.
57. Krause, B. J., Hanson, M. A., and Casanello, P. (2011) Role of nitric oxide in placental vascular development and function, *Placenta*, **32**, 797-805, doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.025.
58. Baydas, G., Reiter, R. J., Akbulut, M., Tuzcu, M., and Tamer, S. (2005) Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels, *Neuroscience*, **135**, 879-886, doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.05.048.
59. Li, Y., Gao, R., Liu, X., Chen, X., Liao, X., Geng, Y., Ding, Y., Wang, Y., and He, J. (2015) Folate deficiency could restrain decidual angiogenesis in pregnant mice, *Nutrients*, **7**, 6425-6445, doi: 10.3390/nu7085284.
60. Lai, W. K., and Kan, M. Y. (2015) Homocysteine-induced endothelial dysfunction, *Ann. Nutr. Metab.*, **67**, 1-12, doi: 10.1159/000437098.
61. Chen, Y. Y., Gupta, M. B., Grattton, R., Powell, T. L., and Jansson, T. (2018) Down-regulation of placental folate transporters in intrauterine growth restriction, *J. Nutr. Biochem.*, **59**, 136-141, doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.06.003.
62. Hague, W. M. (2003) Homocysteine and pregnancy, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, **17**, 459-469.
63. Li, H., Qu, D., McDonald, A., Isaac, S. M., Whiteley, K. J., Sung, H. K., Nagy, A., and Adamson, S. L. (2014) Trophoblast-specific reduction of VEGFA alters placental gene expression and maternal cardiovascular function in mice, *Biol. Reprod.*, **91**, 87, doi: 10.1095/biolreprod.114.118299.
64. Silva, J. F., Ocarino, N. M., and Serakides, R. (2017) Spatiotemporal expression profile of proteases and immunological, angiogenic, hormonal and apoptotic mediators in rat placenta before and during intrauterine trophoblast migration, *Reprod. Fertil. Dev.*, **29**, 1774-1786, doi: 10.1071/RD16280.
65. Gualdoni, G. S., Ventureira, M. R., Coll, T. A., Palomino, W. A., Barbeito, C. G., and Cebal, E. (2021) Perigestational alcohol consumption induces altered early placentation and organogenic embryo growth restriction by disruption of trophoblast angiogenic factors, *Reprod. Biomed. Online*, **42**, 481-504, doi: 10.1016/j.rbmo.2020.10.015.
66. Rennie, M. Y., Detmar, J., Whiteley, K. J., Jurisicova, A., Adamson, S. L., and Sled, J. G. (2012) Expansion of the fetoplacental vasculature in late gestation is strain dependent in mice, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **302**, H1261-H1273, doi: 10.1152/ajpheart.00776.2011.
67. Coan, P. M., Ferguson-Smith, A. C., and Burton, G. J. (2004) Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology, *Biol. Reprod.*, **70**, 1806-1813, doi: 10.1095/biolreprod.103.024166.
68. Vaswani, K., Hum, M. W., Chan, H. W., Ryan, J., Wood-Bradley, R. J., Nitert, M. D., Mitchell, M. D., Armitage, J. A., and Rice, G. E. (2013) The effect of gestational age on angiogenic gene expression in the rat placenta, *PLoS One*, **8**, e83762, doi: 10.1371/journal.pone.0083762.
69. Mesiano, S. (2019) Endocrinology of Human Pregnancy and Fetal-Placental Neuroendocrine Development, in *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)*, Elsevier, p. 256-284.e9.
70. Choi, S. J., Park, J. Y., Lee, Y. K., Choi, H. I., Lee, Y. S., Koh, C. M., and Chung, I. B. (2002) Effects of cytokines on VEGF expression and secretion by human first trimester trophoblast cell line, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **48**, 70-76, doi: 10.1034/j.1600-0897.2002.01071.x.
71. Hemberger, M., Nozaki, T., Masutani, M., and Cross, J. C. (2003) Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells

- depending on depth of invasion, *Dev. Dyn.*, **227**, 185-191, doi: 10.1002/dvdy.10291.
72. Chen, J., and Khalil, R. A. (2017) Matrix metalloproteinases in normal pregnancy and preeclampsia, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **148**, 87-165, doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.001.
 73. Funahashi, Y., Shawber, C. J., Sharma, A., Kanamaru, E., Choi, Y. K., and Kitajewski, J. (2011) Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing matrix metalloproteinase activity, *Vasc. Cell*, **3**, 2, doi: 10.1186/2045-824X-3-2.
 74. Li, W., Mata, K. M., Mazzuca, M. Q., and Khalil, R. A. (2014) Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy, *Biochem. Pharmacol.*, **89**, 370-385, doi: 10.1016/j.bcp.2014.03.017.
 75. Yang, P. F., Li, J. K., and Xiong, Q. (2007) Homocysteine decreases the invasion in cultured human trophoblasts: relationship between homocysteine and matrix metalloproteinase-2, -9 expression [in Chinese], *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, **42**, 184-186.
 76. Bescond, A., Augier, T., Chareyre, C., Garcon, D., Hornebeck, W., and Charpiot, P. (1999) Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 498-503, doi: 10.1006/bbrc.1999.1391.
 77. Almeida-Toledano, L., Andreu-Fernandez, V., Aras-Lopez, R., Garcia-Algar, O., Martinez, L., and Gomez-Roig, M. D. (2021) Epigallocatechin gallate ameliorates the effects of prenatal alcohol exposure in a fetal alcohol spectrum disorder-like mouse model, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms22020715.
 78. Bry, M., Kivela, R., Leppanen, V. M., and Alitalo, K. (2014) Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease, *Physiol. Rev.*, **94**, 779-794, doi: 10.1152/physrev.00028.2013.
 79. Vogtman, R., Kuhn, E., Dicke, N., Verkaik-Schakel, R. N., Plosch, T., Schorle, H., Stojanovska, V., Herse, F., Koninger, A., Kimmig, R., Winterhager, E., and Gellhaus, A. (2019) Human sFLT1 leads to severe changes in placental differentiation and vascularization in a transgenic hsFLT1/rtTA FGR mouse model, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **10**, 165, doi: 10.3389/fendo.2019.00165.
 80. Chen, R., Lee, C., Lin, X., Zhao, C., and Li, X. (2019) Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications, *Pharmacol. Res.*, **143**, 33-39, doi: 10.1016/j.phrs.2019.03.002.
 81. Nico, B., Mangieri, D., Benagiano, V., Crivellato, E., and Ribatti, D. (2008) Nerve growth factor as an angiogenic factor, *Microvasc. Res.*, **75**, 135-141, doi: 10.1016/j.mvr.2007.07.004.
 82. Caporali, A., and Emanuelli, C. (2009) Cardiovascular actions of neurotrophins, *Physiol. Rev.*, **89**, 279-308, doi: 10.1152/physrev.00007.2008.
 83. Kim, H., Li, Q., Hempstead, B. L., and Madri, J. A. (2004) Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, **279**, 33538-33546, doi: 10.1074/jbc.M404115200.
 84. Sahay, A., Kale, A., and Joshi, S. (2020) Role of neurotrophins in pregnancy and offspring brain development, *Neuropeptides*, **83**, 102075, doi: 10.1016/j.npep.2020.102075.
 85. Dhobale, M. (2014) Neurotrophins: role in adverse pregnancy outcome, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **37**, 8-14, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.06.005.
 86. Dhobale, M. (2017) Neurotrophic factors and maternal nutrition during pregnancy, *Vitam. Horm.*, **104**, 343-366, doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.011.
 87. Mayeur, S., Lukaszewski, M. A., Breton, C., Storme, L., Vieau, D., and Lesage, J. (2011) Do neurotrophins regulate the feto-placental development? *Med. Hypotheses*, **76**, 726-728, doi: 10.1016/j.mehy.2011.02.008.
 88. Garces, M. F., Sanchez, E., Torres-Sierra, A. L., Ruiz-Parra, A. I., Angel-Muller, E., Alzate, J. P., Sanchez, A. Y., Gomez, M. A., Romero, X. C., Castaneda, Z. E., Sanchez-Reboredo, E., Dieguez, C., Nogueiras, R., and Caminos, J. E. (2014) Brain-derived neurotrophic factor is expressed in rat and human placenta and its serum levels are similarly regulated throughout pregnancy in both species, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **81**, 141-151, doi: 10.1111/cen.12391.
 89. Sahay, A. S., Sundrani, D. P., Wagh, G. N., Mehendale, S. S., and Joshi, S. R. (2015) Neurotrophin levels in different regions of the placenta and their association with birth outcome and blood pressure, *Placenta*, **36**, 938-943, doi: 10.1016/j.placenta.2015.06.006.
 90. Sahay, A. S., Jadhav, A. T., Sundrani, D. P., Wagh, G. N., and Joshi, S. R. (2019) Differential expression of nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in different regions of normal and preeclampsia placentae, *Clin. Exp. Hypertens*, **42**, 360-364, doi: 10.1080/10641963.2019.1665677.
 91. Dhobale, M. V., Pisal, H. R., Mehendale, S. S., and Joshi, S. R. (2013) Differential expression of human placental neurotrophic factors in preterm and term deliveries, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **31**, 719-723, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.09.006.
 92. Kawamura, K., Kawamura, N., Kumazawa, Y., Kumagai, J., Fujimoto, T., and Tanaka, T. (2011) Brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling regulates human trophoblast growth in an *in vivo* animal model of ectopic pregnancy, *Endocrinology*, **152**, 1090-1100, doi: 10.1210/en.2010-1124.
 93. Frank, P., Barrientos, G., Tirado-Gonzalez, I., Cohen, M., Moschansky, P., Peters, E. M., Klapp, B. F., Rose, M., Tometten, M., and Blois, S. M. (2014) Balanced levels of nerve growth factor are required for normal pregnancy progression, *Reproduction*, **148**, 179-189, doi: 10.1530/REP-14-0112.

94. Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Matsuda, H., Kurohmaru, M., Tachi, C., Yazaki, K., and Hayashi, Y. (1997) Nerve growth factor promotes giant-cell transformation of mouse trophoblast cells *in vitro*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**, 309-315, doi: 10.1006/bbrc.1996.6032.
95. Fahnstock, M., and Shekari, A. (2019) ProNGF and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.*, **13**, 129, doi: 10.3389/fnins.2019.00129.
96. Teng, K. K., Felice, S., Kim, T., and Hempstead, B. L. (2010) Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges, *Dev. Neurobiol.*, **70**, 350-359, doi: 10.1002/dneu.20768.
97. Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., and Hempstead, B. L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins, *Science*, **294**, 1945-1948, doi: 10.1126/science.1065057.
98. Fleitas, C., Pinol-Ripoll, G., Marfull, P., Rocandio, D., Ferrer, I., Rampon, C., Egea, J., and Espinet, C. (2018) proBDNF is modified by advanced glycation end products in Alzheimer's disease and causes neuronal apoptosis by inducing p75 neurotrophin receptor processing, *Mol. Brain*, **11**, 68, doi: 10.1186/s13041-018-0411-6.
99. Gilmore, J. H., Jarskog, L. F., and Vadlamudi, S. (2005) Maternal poly I:C exposure during pregnancy regulates TNF alpha, BDNF, and NGF expression in neonatal brain and the maternal-fetal unit of the rat, *J. Neuroimmunol.*, **159**, 106-112, doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.10.008.
100. Fornes, R., Hu, M., Maliqueo, M., Kokosar, M., Benrick, A., Carr, D., Billig, H., Jansson, T., Manni, L., and Stener-Victorin, E. (2016) Maternal testosterone and placental function: Effect of electroacupuncture on placental expression of angiogenic markers and fetal growth, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **433**, 1-11, doi: 10.1016/j.mce.2016.05.014.

IMBALANCE OF ANGIOGENIC AND GROWTH FACTORS IN THE PLACENTA IN MATERNAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA

A. V. Arutjunyan^{1*}, G. O. Kerkeshko¹, Yu. P. Milyutina^{1,2}, A. D. Shcherbitskaia^{1,3},
I. V. Zalozniaia¹, A. V. Mikhel¹, D. B. Inozemtseva¹, D. S. Vasilev^{1,3},
A. A. Kovalenko³, and I. Yu. Kogan¹

¹ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive medicine,
199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: alexarutjunjan@gmail.com

² St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,
194100 St. Petersburg, Russia

³ I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
194223 St. Petersburg, Russia

Numerous studies have shown that various adverse factors of different nature and action mechanisms have similar negative influence on placental angiogenesis, resulting in insufficiency of placental blood supply. One of the risk factors for pregnancy complications with placental etiology is an increased level of homocysteine in the blood of pregnant women. However, the effect of hyperhomocysteinemia (HHcy) on the development of the placenta and, in particular, on the formation of its vascular network is at present poorly understood. The aim of this work was to study the effect of maternal HHcy on the expression of angiogenic and growth factors (VEGF-A, MMP-2, VEGF-B, BDNF, NGF), as well as their receptors (VEGFR-2, TrkB, p75NTR), in the rat placenta. The effects of HHcy were studied in the morphologically and functionally different maternal and fetal parts of the placenta on the 14th and 20th day of pregnancy. The maternal HHcy caused increase in the levels of oxidative stress and apoptosis markers accompanied by an imbalance of the studied angiogenic and growth factors in the maternal and/or fetal part of the placenta. The influence of maternal HHcy in most cases manifested in a decrease in the protein content (VEGF-A), enzymatic activity (MMP-2), gene expression (*VEGFA*, *NGF*, *TRKB*), and accumulation of precursor form (proBDNF) of the studied factors. In some cases, the effects of HHcy differed depending on the placental part and stage of development. The influence of maternal HHcy on signaling pathways and processes controlled by the studied angiogenic and growth factors could lead to incomplete development of the placental vasculature and decrease in the placental transport, resulting in fetal growth restriction and impaired fetal brain development.

Keywords: maternal hyperhomocysteinemia, placenta, angiogenic factors, neurotrophins

5,7-ДИАМИНО-3,5,7,9-ТЕТРАДЕЗОКСИНОН-2-УЛОЗОНОВЫЕ КИСЛОТЫ В КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДАХ *Acinetobacter baumannii*

Обзор

© 2023 Ю.А. Книрель^{1*}, А.А. Касимова¹, Н.П. Арбатский¹, М.М. Шнейдер²,
А.В. Попова³, Ф.А. Бровко⁴, А.С. Шашков¹, С.Н. Сенченкова¹,
А.В. Перепелов¹, А.М. Шпирт¹

¹ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
117913 Москва, Россия; электронная почта: yknirel@gmail.com

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

³ Государственный исследовательский центр прикладной микробиологии и биотехнологии,
142279 Оболенск, Московская обл., Россия

⁴ Филиал Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 18.12.2022

После доработки 16.01.2023

Принята к публикации 19.01.2023

Защищая бактерии от внешних антимикробных факторов, полисахаридная капсула, окружающая бактериальную клетку, играет важную роль в патогенезе инфекционных заболеваний, вызываемых условно-патогенным микроорганизмом *Acinetobacter baumannii*. Структуры капсульных полисахаридов (КПС), продуцируемых индивидуальными изолятами *A. baumannii*, и соответствующие генные кластеры биосинтеза КПС отличаются значительным разнообразием, и в то же время многие из них являются родственными друг другу. Особенностью КПС многих типов *A. baumannii* является присутствие в их составе 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот. Три из этих высших сахаров – ацинетаминовая кислота (L-глицеро-L-альтро-изомер), 8-эпиацинетаминовая кислота (D-глицеро-L-альтро-изомер) и 8-эпипсевдааминовая кислота (D-глицеро-L-манно-изомер) – в других природных углеводах до настоящего времени не обнаружены. Эти моносахариды несут N-ацильные заместители в положениях 5 и 7, и в КПС некоторых типов *A. baumannii* в положении 7 псевдааминовой кислоты (L-глицеро-L-манно-изомер) и легионаминовой кислоты (D-глицеро-D-галакто-изомер) альтернативно присутствуют N-ацетильная или N-(3-гидроксипропаноильная) группа. При этом псевдааминовая кислота несет (R)-изомер 3-гидроксипропаноильной группы, а легионаминовая кислота – (S)-изомер. В настоящем обзоре рассмотрены строение и генетика биосинтеза КПС *A. baumannii*, содержащих ди-N-ацильные производные 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Acinetobacter baumannii*, капсульный полисахарид, бактериальный полисахарид, капсула, ацильная группа, высший моносахарид, нонулозоновая кислота.

DOI: 10.31857/S0320972523020069, EDN: QGLOGL

ВВЕДЕНИЕ

Род бактерий *Acinetobacter* принадлежит к семейству Moraxellaceae порядка Pseudomonadales класса Gammaproteobacteria (тип Proteo-

bacteria). Он включает условно-патогенный грамотрицательный микроорганизм *Acinetobacter baumannii*, который является глобально распространенным возбудителем внутрибольничных инфекций, отличающихся высокой

Принятые сокращения: ДТНК – 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновая кислота; КПС – капсульный полисахарид; Ac – ацетил; Aci – ацинетаминовая кислота; CMP – цитозинмонофосфат; Leg – легионаминовая кислота; Pse – псевдааминовая кислота; RHb – (R)-3-гидроксипропаноил; SHb – (S)-3-гидроксипропаноил; UDP – уридиндифосфат; 8eAci – 8-эпиацинетаминовая кислота; 8eLeg – 8-эпилегионаминовая кислота; 8ePse – 8-эпипсевдааминовая кислота.

* Адресат для корреспонденции.

летальностью. Вызывая пневмонию, септицемию, менингит и будучи ответственными за раневые инфекции и инфекционные заболевания мочевыводящих путей, эти бактерии стали серьезной угрозой здоровью человека во всем мире. Интерес к изучению *A. baumannii* и созданию вакцин для защиты от этих бактерий постоянно возрастает.

Одним из основных факторов вирулентности *A. baumannii* является полисахаридная капсула, которая окружает бактериальную клетку и обеспечивает устойчивость бактерий к защитным механизмам хозяина, включая врожденный иммунитет. Тип бактерий определяется структурой капсульного полисахарида (КПС). В последнее время опубликован ряд статей и обзоров, в которых обсуждаются различные аспекты изучения КПС *A. baumannii* [1–3].

Клинические изоляты *A. baumannii* отличаются множественной антибиотикорезистентностью. В связи с этим в качестве альтернативного подхода для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызываемыми этими бактериями, рассматривается вакцинация. Для этой цели используются гликовакцины на основе КПС и их фрагментов, полученных расщеплением полисахаридов деполимеразами специфических бактериофагов [4] или химическим синтезом [5]. Бактериофаги и их комбинации (коктейли) сами могут использоваться для контроля вирулентных штаммов *A. baumannii* [6].

Капсульные полисахариды *A. baumannii* построены из повторяющихся олигосахаридов (К-звеньев), которые включают от трех до пяти моносахаридных остатков. Биосинтез КПС осуществляется по полимеразе (Wzy)-зависимому пути, который начинается со сборки

К-звена на липидном (ундекапренилдифосфатном) носителе, связанном с внутренней мембраной. В этом процессе участвует иницирующая трансфераза Itr, присоединяющая к липиду первый моносахарид К-звена, и гликозилтрансферазы, создающие затем специфические связи между моносахаридными компонентами внутри К-звена. Затем продукт (К-звено, связанное с липидом) переносится транслоказой Wzx в периплазматическое пространство, где К-звенья связываются друг с другом полимеразой Wzy, и готовый КПС переносится на клеточную поверхность с помощью белков Wza, Wzb и Wzc [1].

В хромосомных К-локусах *A. baumannii* присутствуют более 200 различных комбинаций генов [7], каждая из которых ответственна за синтез и экспорт КПС с определенной структурой. Следствием генетического разнообразия является широкое разнообразие структур КПС этих бактерий. Они варьируются по типам входящих в их состав моносахаридов и неуглеводных компонентов и по типам связей между моносахаридами внутри К-звеньев и между К-звеньями.

Капсульные полисахариды многих типов *A. baumannii* содержат различные изомеры 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновой кислоты (ДТНК), известные как компоненты ряда других бактериальных полисахаридов и гликопротеинов. В недавно опубликованных обзорах обсуждались химические свойства ДТНК, методы выделения этих моносахаридов, их идентификации и химического синтеза [8, 9].

Два изомера ДТНК — псевдаминовая и легионаминовая кислоты, имеющие L-глицеро-L-манно- и D-глицеро-D-галакто-конфигурацию соответственно, — были впервые найдены

Таблица 1. Присутствие 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот в капсульных полисахаридах *Acinetobacter baumannii*

Тривиальное название и аббревиатура	Конфигурация	Впервые найдена в бактериях	Присутствует в КПС капсульного типа*
Псевдаминовая кислота, Pse	L-глицеро-L-манно	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K2, K6, K16, K33, K42, K46, K90, K93, K121, K218
8-Эпипсевдаминовая кислота, 8ePse	D-глицеро-L-манно	<i>A. baumannii</i>	K135
Легионаминовая кислота, Leg	D-глицеро-D-галакто	<i>Legionella pneumophila</i>	K5, K7, K8, K27, K44, K54, K63
8-Эпилегионаминовая кислота, 8eLeg	L-глицеро-D-галакто	<i>P. aeruginosa</i>	K49
Ацинетаминовая кислота, Aci	L-глицеро-L-альтро	<i>A. baumannii</i>	K12, K13
8-Эпиацинетаминовая кислота, 8eAci	D-глицеро-L-альтро	<i>A. baumannii</i>	K73

Примечание. * Структуры КПС приведены в табл. 2.

в полисахаридах *Pseudomonas aeruginosa* и *Legionella pneumophila* и получили тривиальные названия по родовым названиям этих бактерий (табл. 1). Впоследствии в бактериальных углеводах были обнаружены также эпимеры легионаминовой кислоты по С-4 и С-8 (D-глицеро-D-тало- и L-глицеро-D-галакто-изомеры соответственно).

Недавно в КПС *A. baumannii* найдены еще три представителя ДТНК (табл. 1). Один из них — ацинетаминовая кислота (L-глицеро-L-альтро-изомер) получил название, указывающее на род бактерий *Acinetobacter*, где он был обнаружен впервые [10]. Два других новых высших моносахарида являются эпимерами по С-8 ацинетаминовой кислоты (D-глицеро-L-альтро-изомер) [11, 12] и псевдаминовой кислоты (D-глицеро-L-манно-изомер) [13, 14].

Генные кластеры биосинтеза КПС *A. baumannii*, содержащих ДТНК, включают модуль генов для синтеза цитозинмонофосфат-активированной формы этих высших моносахаридов.

В настоящем обзоре впервые рассмотрены вместе строение и генетика биосинтеза КПС *A. baumannii*, содержащих ди-N-ацильные производные 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот.

СОСТАВ И СТРОЕНИЕ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *A. baumannii*, СОДЕРЖАЩИХ 5,7-ДИАМИНО-3,5,7,9-ТЕТРАДЕЗОКСИНОН-2-УЛОЗОНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Псевдаминовая кислота (Pse) и легионаминовая кислота (Leg) являются наиболее распространенными высшими моносахаридами в составе КПС *A. baumannii* (табл. 1). Кроме них, в полисахаридах некоторых штаммов идентифицированы ацинетаминовая кислота (Aci) и эпимеры всех трех моносахаридов по С-8 (8eAci, 8eLeg и 8ePse). Ацинетаминовая, 8-эпиацинетаминовая и 8-эпипсевдаминовая кислоты до настоящего времени в других природных углеводах обнаружены не были, и, таким образом, они являются уникальными для бактерий *A. baumannii*.

Наиболее распространенным заместителем аминогрупп в положениях 5 и 7 ДТНК является ацетильная группа (Ac), но в КПС некоторых капсульных типов на остатке Pse или Leg в положении 7 присутствуют различные ацильные заместители (табл. 2). Так, в КПС капсульных типов K8, K27 и K44 на аминогруппе в положении 5 остатка легионаминовой

кислоты находится ацетильная группа, а на другой аминогруппе — ацетильная или 3-гидроксисибутаноильная группа при доминировании последней (табл. 2). Аналогично, в КПС капсульных типов K42 и K93 присутствуют 5,7-ди-N-ацетильное и 5-N-ацетил-7-N-(3-гидроксисибутаноильное) производные псевдаминовой кислоты [20, 24]. Эти вариации ацильных заместителей, по-видимому, являются следствием нестрогой специфичности соответствующих ацилтрансфераз по отношению к донору ацильной группы. Отметим также, что псевдаминовая кислота несет остаток (R)-3-гидроксисибутановой кислоты (RNB), а легионаминовая кислота — остаток (S)-3-гидроксисибутановой кислоты (SNB).

О-Ацетилирование — модификация, обязанная присутствию в бактериальном геноме функционального гена ацилтрансферазы. Так, остатки Leg5Ac7Ac и Pse5Ac7Ac О-ацетилированы в положении 4 в КПС капсульных типов K5 и K46 соответственно [21, 25], тогда как близкородственные по структуре КПС типов K7, K90 и K218 включают неацетилированные формы этих моносахаридов [22, 23, 26]. В штаммах с КПС типов K5 и K46 ген ацилтрансферазы обнаружен в геноме лизогенного бактериофага, интегрированного в геном бактерии [21, 25]. Эти данные показывают, что некоторые гены, участвующие в биосинтезе КПС, могут передаваться между бактериями по механизму, отличному от гомологичной рекомбинации.

Как и другие специфические полисахариды бактерий, КПС *A. baumannii*, содержащие ДТНК, построены из повторяющихся олигосахаридов (К-звеньев), размер которых варьируется от трисахарида до пентасахарида (табл. 2). Большинство полисахаридов являются разветвленными с остатком ДТНК в боковой цепи, но нередки и линейные полимеры, такие как, например, КПС групп K6, K16, K33 (все включают Pse) [17–19] и K49 (включает 8eLeg) [29].

Наиболее типичным К-звеном является разветвленный тетрасахарид с одним моносахаридным или дисахаридным ответвлением (топология 3 + 1 или 2 + 2 соответственно). У многих разветвленных КПС, содержащих ДТНК в боковой цепи, основная цепь построена из дисахаридных повторяющихся звеньев, одним из компонентов которых является β-D-GalpNAc (табл. 2).

Остаток ДТНК может присоединяться α- или β-гликозидной связью. α-Аномеры Leg и эпимеров Leg имеют аксиальную карбоксильную группу, тогда как у α-аномеров Pse и Aci и их 8-эпимеров карбоксильная группа находится в экваториальном положении.

Таблица 2. Структуры капсульных полисахаридов *Acinetobacter baumannii*, содержащих 5,7-диамино-3,5,7,9-тетразедоксинон-2-улозоновые кислоты

[illegible]

Распространенной структурной вариацией в КПС *A. baumannii* является изменение положения гликозидной связи между К-звеньями и, как следствие, их пространственной ориентации относительно друг друга. При этом топология полисахарида может также изменяться, как результат синхронного изменения размеров основной и боковой цепей К-звена ($3 + 1/2 + 2$ или $4 + 1/3 + 2$), но может и сохраняться, как например, в КПС пары K8 и K54, в которых при одинаковой топологии $3 + 1$ К-звенья соединены связью $1 \rightarrow 3$ или $1 \rightarrow 4$ между остатками β -D-GlcpNAc и D-GalpNAc [27].

Встречаются вариации и других типов. Например, в КПС типов K6 и K16 присутствует дисахаридный фрагмент β -Pse5Ac7Ac-(2 $\rightarrow$ 4)-Gal [17, 18], а в КПС типа K33 – изомерный фрагмент α -Pse5Ac7Ac-(2 $\rightarrow$ 4)-Gal [19]. Аналогично, аномерной конфигурацией остатка Pse отличаются друг от друга фрагменты Pse5Ac7Ac-(2 $\rightarrow$ 6)-Gal в КПС типов K46 и K218 [21, 23]. В КПС типов K46, K16 и K90 остаток β -Pse5Ac7Ac присоединяется к соседнему остатку галактозы связью (2 $\rightarrow$ 6), (2 $\rightarrow$ 4) или (2 $\rightarrow$ 3) соответственно [18, 21, 22].

Один изомер ДТНК может заменяться другим: например, КПС типов K5 и K7 содержат α -Leg5Ac7Ac [25, 26], а в родственных по структуре КПС типов K46 и K90 в том же положении присутствует β -Pse5Ac7Ac [21, 22]. При этом КПС типов K5 и K46 имеют топологию $3 + 1$ с остатком ДТНК в боковой цепи и одинаковые основные цепи, тогда как КПС типов K7 и K90 при топологии $2 + 2$ отличаются друг от друга не только конфигурацией остатка ДТНК, находящегося в боковой цепи, но и местом его присоединения к остатку галактозы (в положение 6 или 3 соответственно). Кроме того, имеется отличие в моносахаридном составе основной цепи (К-звено типа K90 включает два остатка GlcNAc, а К-звено типа K7 – по одному остатку GlcNAc и GalNAc) [22, 26].

КАПСУЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ПСЕВДАМИНОВУЮ (Pse) И 8-ЭПИПСЕВДАМИНОВУЮ (8ePse) КИСЛОТЫ

В разветвленных тетрасахаридных К-звеньях всех изученных полисахаридов типа K2 [15, 16] и полисахаридов капсульных типов K90, K93 и K135 [14, 22, 24] остаток Pse5Ac7Ac терминирует боковой дисахаридный фрагмент (топология $2 + 2$), а в КПС типов K46 [9] и K218 [11] этот остаток присутствует в виде

бокового моносахаридного ответвления (топология $3 + 1$) (табл. 2). Отметим, что основная цепь КПС типов K135 [14] и K90 [22] является гомополимером D-GlcNAc, в котором регулярно чередуются α - и β -связанные 3-замещенные остатки этого моносахарида, образуя дисахаридное повторяющееся звено.

В К-локусе большинства штаммов с КПС, содержащими Pse5Ac7Ac, присутствует оперон *psaABCDEF*, но в штамме с КПС типа K218, в состав которого входит этот же моносахарид, обнаружен оперон *psaABCIF* [23]. Таким образом, замена генов *psaDE* генами *psaIJ* не меняет картину ацилирования псевдаминной кислоты. Гены *psaI* и *psaJ* присутствуют редко в штаммах *A. baumannii* [23]. Предположительно их приобретение является результатом эволюционного события в прошлом, заключавшегося в импорте этих генов в геном *A. baumannii* из генома одного из других видов *Acinetobacter* (*A. pittii*, *A. lactucae*, *A. calcoaceticus* или *A. oleivorans*), у которых обнаружены близкородственные гомологи генов *psaI* и *psaJ* (идентичность аминокислотной последовательности >95%).

За синтез другого производного псевдаминной кислоты Pse5Ac7RNb, которое присутствует в КПС типов K42 и K93, ответственен оперон *psaABCFGH* [20, 24].

Варьирующиеся гены *psa* кодируют ацилтрансферазы и нуклеотидазы пути синтеза производных Pse из UDP-D-GlcNAc через UDP-2-ацетамидо-4-амино-2,4,6-тридезоксил-альтрозу [20, 24]. Из них *psaE* (*psaJ*) и *psaH* – гены предполагаемых ацилтрансфераз, которые присоединяют ацетильную или (*R*)-3-гидроксипутаноильную группу к свободной аминогруппе в положении 4 субстрата, образуя уридиндифосфат (UDP)-предшественники Pse5Ac7Ac или Pse5Ac7RNb соответственно. 3-Гидроксипутаноильная и ацетильная группы чередуются в положении 7 ДТНК в КПС типов K42 и K93, что, как уже отмечалось, является результатом нестрогой неспецифичности ацилтрансферазы PsaH по отношению к донору ацильной группы. На следующей стадии биосинтеза нуклеотидазы *psaD* (*psaI*) и *psaG* превращают UDP-производные в свободные моносахариды, при конденсации которых с фосфоенолпируватом образуются соответствующие производные псевдаминной кислоты.

Генные кластеры KL2 и KL42 включают гомологичные гены *kpsS1* и *kpsS2*, кодирующие Pse5Ac7Ac-трансферазу и Pse5Ac7RNb-трансферазу соответственно (их идентичность 51%) [15, 20]. Обе гликозилтрансферазы используют сохраняющий механизм, перенося остаток

ДТНК из нуклеотидных (цитозинмонофосфатных) предшественников CMP- α -Pse5Ac7Ac или CMP- α -Pse5Ac7RHb на остаток D-Gal или D-Rib соответственно. Гены *kpsS1* и *kpsS2* являются далекими гомологами гена *kpsS*, кодирующего сохраняющую 3-дезоксид- β -D-манно-окт-2-улозонат (Kdo)-трансферазу, и существенно отличаются от генов гликозилтрансфераз, использующих инвертирующий механизм. Ген *kpsS3*, присутствующий в генном кластере KL218, выполняет ту же функцию, что и ген *kpsS1* [23].

Инвертирующие гликозилтрансферазы, кодируемые в генных кластерах KL46, KL16 и KL90, имеют различную специфичность в отношении образуемой ими связи, присоединяя остаток Pse5Ac7Ac в различные положения остатка галактозы [18, 21, 22].

В КПС типа K2 остаток Pse5Ac7Ac является сайтом узнавания хвостовым белком бактериофага ФАВ6 — гликозидазой, специфически расщепляющей этот полисахарид по сохраняющему механизму [5]. Образующиеся при этом олигосахариды, из которых основной соответствует димеру К-звена, могут использоваться для создания конъюгатных гликовакцин для борьбы с инфекциями, вызываемыми *A. baumannii*. Этой же цели могут служить олигосахариды, полученные мягким кислотным гидролизом КПС по кислотолабильной гликозидной связи остатков Pse5Ac7Ac и других 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот.

8-Эпимер псевдаминовой кислоты 8ePse5Ac7Ac, образующийся из Pse5Ac7Ac через промежуточное 8-кетопроизводное, встречается редко; он присутствует в КПС типа K135 (штамм Res546), который характеризуется топологией 2 + 2 [14].

КАПСУЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ЛЕГИОНАМИНОВУЮ (Leg) И 8-ЭПИЛЕГИОНАМИНОВУЮ (8eLeg) КИСЛОТЫ

Капсульные полисахариды типов K5 и K7, содержащие Leg5Ac7Ac, построены из разветвленных тетрасахаридных повторяющихся К-звеньев, имеющих одинаковый состав, но отличающихся друг от друга топологией (3 + 1 и 2 + 2 соответственно) [25, 26]. Такая вариация является результатом кодирования в генных кластерах биосинтеза КПС этих типов полимераз Wzy с различной специфичностью по отношению к образуемым ими связям, в то время как остальные гены в генных кластерах KL5 и KL7 одинаковые.

В КПС типов K8, K27, K44 и K54 также присутствует Leg5Ac7Ac, но в КПС типа K8, K27 и K44 это производное чередуется с Leg5Ac7SHb [27, 28]. Генные кластеры соответствующих штаммов отличаются двумя генами пути биосинтеза производного Leg (гены *lgaDE* в KL54 заменяются генами *lgaHI* в KL8). Генный кластер KL8 обнаружен в геномах 11 штаммов *A. baumannii*, включая штамм BAL 097, тогда как генный кластер KL54 до настоящего времени обнаружен только в двух штаммах, включая штамм RCH52 с известной структурой КПС [16], приведенной в табл. 2.

Без учета различия в ацилировании легионаминовой кислоты К-звенья групп K54 и K8 имеют одинаковую структуру, в том числе одинаковую топологию 3 + 1, но в КПС они связаны друг с другом различными связями между остатками GlcNAc и GalNAc (1→3 или 1→4 соответственно) [27].

Leg5Ac7Ac и Leg5Ac7SHb присутствуют также в КПС *A. baumannii* типов K27 и K44, К-звенья которых имеют топологию 3 + 2 и 4 + 1 соответственно [28]. В этих и во всех других полисахаридах, содержащих оба эти производных, Leg5Ac7SHb является доминирующим.

8-Эпилегионаминовая кислота в КПС *A. baumannii* встречается редко. К настоящему времени ее присутствие было подтверждено только для КПС типа K49 [29].

Синтез Leg5Ac7Ac осуществляется ферментами, кодируемыми модулем генов *lgaABCDEF*. Этот моносахарид активируется в виде цитозинмонофосфатного производного CMP-Leg5Ac7Ac, образующегося при действии на Leg5Ac7Ac цитидилтрансферазы LgaG или ElaB. Дегидрогеназа ElaA и редуктаза ElaC ответственны за превращение CMP-Leg5Ac7Ac в CMP-8eLeg5Ac7Ac путем эпимеризации по C-8 через соответствующее 8-кетопроизводное. Гены для синтеза CMP-Leg5Ac7Ac найдены в генных кластерах 10 типов *A. baumannii*, и кластеры трех типов включают также дополнительные гены (*elaABC*) для превращения этого производного в CMP-8eLeg5Ac7Ac [29].

КАПСУЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АЦИНЕТАМИНОВУЮ (Aci) И 8-ЭПИАЦИНЕТАМИНОВУЮ (8eAci) КИСЛОТЫ

Ацинетаминовая кислота присутствует в КПС двух групп *A. baumannii* (K12 и K13), а КПС группы K73 является единственным известным полисахаридом, содержащим 8-эпиацинетаминовую кислоту [10–12].

За синтез изомеров CMP-Aci5Ac7Ac и CMP-8eAci5Ac7Ac из CMP-Leg5Ac7Ac ответственны модули генов *aciBCD* и *aciECD* соответственно. Они отличаются одним геном, кодирующим дегидрогеназу/редуктазу (в генных кластерах типов KL12 и KL13 присутствует ген *aciB*, а в генном кластере KL73 – ген *aciE*) [10–12].

При различных боковых моносахаридных заместителях (Aci5Ac7Ac или 8eAci5Ac7Ac) близкородственные по структуре КПС типов K12, K13 и K73 имеют не только одинаковую топологию (3 + 1) с боковым остатком ДТНК, но и сходные основные цепи с тем единственным исключением, что остаток GalNAc, присутствующий в КПС типа K12, заменен остатком Gal в КПС типов K13 и K73 [10–12]. В соответствии с этим ген полимеразы Wzy, участвующей в биосинтезе КПС типов K13 и K73 и ответственной за образование связи α -D-FucpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Galp, отличается от гена *wzy*, присутствующего в генном кластере KL12 и кодирующего полимеразу Wzy, которая образует связь α -D-FucpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GalpNAc.

Полимераза Wzy, кодируемая в генном кластере KL12, на 54% идентична ферменту Wzy штамма *A. baumannii* с генным кластером KL78 (структура КПС K78 остается неизвестной), в то время как гомологов полимеразы Wzy штаммов с генными кластерами KL13 и KL73 в других бактериях не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

5,7-Диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновые кислоты являются широко распространенными компонентами КПС *A. baumannii*. За исключением 4-эпилегионаминовой кислоты, в них найдены все известные природные изомеры этих высших моносахаридов. Наряду с изомерами ДТНК, обнаруженными ранее в других бактериях (псевдаминовой и легионаминовой кислотами и 8-эпимера последней), в КПС *A. baumannii* идентифицированы новые

изомеры, включая ацинетаминовую кислоту и 8-эпимеры ацинетаминовой и псевдаминовой кислот.

Разнообразие компонентов КПС *A. baumannii* создается как различиями в конфигурации ДТНК, так и вариацией N-ацильных заместителей в положении 7 ДТНК, причем эти заместители (ацетильная или 3-гидроксibuтаноильная группа) могут быть различными в К-звеньях одного и того же полисахарида.

Высокая насыщенность КПС производными ДТНК, не отмеченная ни у одной другой бактерии, может указывать на важность этих высших моносахаридов для жизнедеятельности *A. baumannii*. Учитывая уникальность ДТНК, создание и применение препаратов, способных селективно регулировать их биосинтез, может стать новым перспективным подходом для терапии ацинетобактерных инфекций.

Вклад авторов. Ю.А. Книрель определил концепцию и дизайн исследования; А.С. Шашков и А.В. Перепелов снимали и интерпретировали спектры ЯМР; А.А. Касимова, Н.П. Арбатский, С.Н. Сенченкова и А.М. Шпирт выделяли КПС, проводили их расщепление химическими методами, идентифицировали продукты расщепления; А.В. Попова, Ф.А. Бровко и М.М. Шнейдер исследовали генетику биосинтеза КПС и рассматривали вместе строение и генетику биосинтеза КПС. Все авторы одобрили окончательную версию статьи перед ее подачей для публикации.

Благодарности. Авторы благодарят J.J. Kenyon и R.M. Hall за плодотворное обсуждение.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-14-00273).

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. Kenyon, J. J., and Hall, R. M. (2013) Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes, *PLoS One*, **8**, e62160, doi: 10.1371/journal.pone.0062160.
2. Giguere, D. (2015) Surface polysaccharides from *Acinetobacter baumannii*: Structures and syntheses, *Carbohydr. Res.*, **418**, 29–43, doi: 10.1016/j.carres.2015.10.001.
3. Singh, J. K., Adams, F. G., and Brown, M. H. (2019) Diversity and function of capsular polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*, *Front. Microbiol.*, **9**, 3301, doi: 10.3389/fmicb.2018.03301.
4. Lee, I. M., Tu, I. F., Yang, F. L., Ko, T. P., Liao, J. H., Lin, N. T., Wu, C. Y., Ren, C. T., Wang, A. H., Chang, C. M., Huang, K. F., and Wu, S. H. (2017) Structural basis for fragmenting the exopolysaccharide of *Acineto-*

- bacter baumannii* by bacteriophage ΦAB6 tailspike protein, *Sci. Rep.*, **7**, 42711, doi: 10.1038/srep42711.
5. Zhang, S., and Seeberger, P. H. (2021) Total syntheses of conjugation-ready repeating units of *Acinetobacter baumannii* AB5075 for glycoconjugate vaccine development, *Chemistry*, **27**, 17444-17451, doi: 10.1002/chem.202103234.
 6. Zhang, Y., Lin, Y., Galgano, S., Houdijk, J., Xie, W., Jin, Y., Lin, J., Song, W., Fu, Y., Li, X., Chui, W., Kan, W., Jia, C., Hu, G., and Li, T. (2022) Recent progress in phage therapy to modulate multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, including in human and poultry, *Antibiotics (Basel)*, **11**, 1406, doi: 10.3390/antibiotics11101406.
 7. Cahill, S. M., Hall, R. M., and Kenyon, J. J. (2022) An update to the database for *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharide locus typing extends the extensive and diverse repertoire of genes found at and outside the K locus, *Microb. Genom.*, **8**, mgen000878, doi: 10.1099/mgen.0.000878.
 8. Knirel, Y. A., Shevelev, S. D., and Perepelov, A. V. (2011) Higher aldulosonic acids: Components of bacterial glycans, *Mendeleev Commun.*, **21**, 173-182, doi: 10.1016/j.mencom.2011.07.001.
 9. Knirel, Y. A., Shashkov, A. S., Tsvetkov, Y. E., Jansson, P. E., and Zähringer, U. (2003) 5,7-Diamino-3,5,7,9-tetradeoxynon-2-ulonic acids in bacterial glycopolymers: chemistry and biochemistry, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **58**, 371-417, doi: 10.1016/S0065-2318(03)58007-6.
 10. Kenyon, J. J., Marzaioli, A. M., Hall, R. M., and De Castro, C. (2015) Structure of the K12 capsule containing 5,7-di-N-acetylacetaminic acid from *Acinetobacter baumannii* isolate D36, *Glycobiology*, **25**, 881-887, doi: 10.1093/glycob/cwv028.
 11. Kenyon, J. J., Kasimova, A. A., Notaro, A., Arbatsky, N. P., Speciale, I., Shashkov, A. S., De Castro, C., Hall, R. M., and Knirel, Y. A. (2017) *Acinetobacter baumannii* K13 and K73 capsular polysaccharides differ only in K-unit side branches of novel non-2-ulonic acids: di-N-acetylated forms of either acinetaminic acid or 8-epiacinetaminic acid, *Carbohydr. Res.*, **452**, 149-155, doi: 10.1016/j.carres.2017.10.005.
 12. Kenyon, J. J., Notaro, A., Hsu, L. Y., De Castro, C., and Hall, R. M. (2017) 5,7-Di-N-acetyl-8-epiacinetaminic acid: A new non-2-ulonic acid found in the K73 capsule produced by an *Acinetobacter baumannii* isolate from Singapore, *Sci. Rep.*, **7**, 11357, doi: 10.1038/s41598-017-11166-4.
 13. Shashkov, A. S., Arbatsky, N. P., Senchenkova, S. N., Perepelov, A. V., Chizhov, A. O., Dmitrenok, A. S., Shneider, M. M., and Knirel, Y. A. (2022) Identification of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeoxy-D-glycero-L-manno-non-2-ulonic acid (di-N-acetyl-8-epipseudaminic acid) in the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Res546, *Carbohydr. Res.*, **513**, 108531, doi: 10.1016/j.carres.2022.108531.
 14. Shashkov, A. S., Kasimova, A. A., Arbatsky, N. P., Senchenkova, S. N., Perepelov, A. V., Dmitrenok, A. S., Chizhov, A. O., Knirel, Y. A., Shneider, M. M., Popova, A. V., and Kenyon, J. J. (2022) Complete chemical structure of the K135 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* RES-546 that contains 5,7-di-N-acetyl-8-epipseudaminic acid, *Carbohydr. Res.*, **523**, 108726, doi: 10.1016/j.carres.2022.108726.
 15. Senchenkova, S. N., Shashkov, A. S., Shneider, M. M., Arbatsky, N. P., Popova, A. V., Miroshnikov, K. A., Volozhantsev, N. V., and Knirel, Y. A. (2014) Structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* ACICU containing di-N-acetyl-pseudaminic acid, *Carbohydr. Res.*, **391**, 89-92, doi: 10.1016/j.carres.2014.04.002.
 16. Kenyon, J. J., Marzaioli, A. M., Hall, R. M., and De Castro, C. (2014) Structure of the K2 capsule associated with the KL2 gene cluster of *Acinetobacter baumannii*, *Glycobiology*, **24**, 554-563, doi: 10.1093/glycob/cwu024.
 17. Kenyon, J. J., Marzaioli, A. M., Hall, R. M., and De Castro, C. (2015) Structure of the K6 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* isolate RBH4, *Carbohydr. Res.*, **409**, 30-35, doi: 10.1016/j.carres.2015.03.016.
 18. Kenyon, J. J., Arbatsky, N. P., Sweeney, E. L., Shashkov, A. S., Shneider, M. M., Popova, A. V., Hall, R. M., and Knirel, Y. A. (2019) Production of the K16 capsular polysaccharide by *Acinetobacter baumannii* ST25 isolate D4 involves a novel glycosyltransferase encoded in the KL16 gene cluster, *Int. J. Biol. Macromol.*, **128**, 101-106, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.080.
 19. Арбатский Н. П., Шнейдер М. М., Шашков А. С., Попова А. В., Мирошников К. А., Воложанцев Н. В., Книрель Ю. А. (2016) Структура капсульного полисахарида, выделенного из *Acinetobacter baumannii* NIPH67, содержащего ди-N-ацетилпсевдаминную кислоту, *Изв. АН Сер. хим.*, **65**, 588-591.
 20. Senchenkova, S. N., Popova, A. V., Shashkov, A. S., Shneider, M. M., Mei, Z., Arbatsky, N. P., Liu, B., Miroshnikov, K. A., Volozhantsev, N. V., and Knirel, Y. A. (2015) Structure of a new pseudaminic acid-containing capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* LUH5550 having the KL42 capsule biosynthesis locus, *Carbohydr. Res.*, **407**, 154-157, doi: 10.1016/j.carres.2015.02.006.
 21. Kenyon, J. J., Arbatsky, N. P., Shneider, M. M., Popova, A. V., Dmitrenok, A. S., Kasimova, A. A., Shashkov, A. S., Hall, R. M., and Knirel, Y. A. (2019) The K46 and K5 capsular polysaccharides produced by *Acinetobacter baumannii* NIPH 329 and SDF have related structures and the side-chain nonulosonic acids are 4-O-acetylated by phage-encoded O-acetyltransferases, *PLoS One*, **14**, 0218461, doi: 10.1371/journal.pone.0218461.

22. Senchenkova, S., Kenyon, J., Jia, T., Popova, A., Kasimova, A., Shashkov, A., Liu, B., Hall, R., and Knirel, Y. (2019) The K90 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* LUH5553 contains di-N-acetylpsseudaminic acid and is structurally related to the K7 polysaccharide from *A. baumannii* LUH5533, *Carbohydr. Res.*, **479**, 1-5, doi: 10.1016/j.carres.2019.04.008.
23. Kasimova, A. A., Dudnik, A. G., Shashkov, A. S., Shneider, M. M., Christofferson, A., Shelenkov, A. A., Mikhailova, Y. V., Kenyon, J. J., and Knirel, Y. A. (2022) The K218 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* isolate 52-249 includes 5,7-di-N-acetylpsseudaminic acid linked by a KpsS3 glycosyltransferase, *Int. J. Biol. Macromol.*, **21**, 310-316, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.135.
24. Касимова А. А., Шнейдер М. М., Арбатский Н. П., Попова А. В., Шашков А. С., Мирошников К. А., Баладжи В., Бисвас И., Книрель Ю. А. (2017) Структура и генный кластер капсульного полисахарида K93 *Acinetobacter baumannii* B11911, содержащего 5-N-ацетил-7-N-[(R)-3-гидроксипутаноил] псевдаминовою кислоту, *Биохимия*, **82**, 655-663.
25. Арбатский Н. П., Кенион Дж. Дж., Шашков А. С., Шнейдер М. М., Попова А. В., Калинин Н. А., Хэлл Р. М., Книрель Ю. А. (2019) Капсульный полисахарид K5 бактерии *Acinetobacter baumannii* SDF, построенный из таких же K-звеньев с Leg5Ac7Ac, что и капсульный полисахарид K7, но с другой связью между K-звеньями, *Изв. АН Сер. хим.*, **68**, 163-167.
26. Шашков А. С., Сенченкова, С. Н., Попова А. В., Чжу Мэй, Шнайдер М. М., Лю Бинь, Мирошников К. А., Воложанцев Н. В., Книрель Ю. А. (2015) Пересмотр структуры капсульного полисахарида *Acinetobacter baumannii* LUH5533 (серогруппа O1), содержащего ди-N-ацетиллегионаминовую кислоту, *Изв. АН Сер. хим.*, **64**, 1196-1199.
27. Arbatsky, N. P., Kenyon, J. J., Kasimova, A. A., Shashkov, A. S., Shneider, M. M., Popova, A. V., Knirel, Y. A., and Hall, R. M. (2019) K units of the K8 and K54 capsular polysaccharides produced by *Acinetobacter baumannii* BAL 097 and RCH52 have the same structure but contain different di-N-acetyl derivatives of legionaminic acid and are linked differently, *Carbohydr. Res.*, **483**, 107745, doi: 10.1016/j.carres.2019.107745.
28. Shashkov, A. S., Kenyon, J. J., Senchenkova, S. N., Shneider, M. M., Popova, A. V., Arbatsky, N. P., Miroshnikov, K. A., Volozhantsev, N. V., Hall, R. M., and Knirel, Y. A. (2016) *Acinetobacter baumannii* K27 and K44 capsular polysaccharides have the same K unit but different structures due to the presence of distinct *wzy* genes in otherwise closely related K gene clusters, *Glycobiology*, **26**, 501-508, doi: 10.1093/glycob/cwv168.
29. Vinogradov, E., Maclean, L., Xu, H. H., and Chen, W. (2014) The structure of the polysaccharide isolated from *Acinetobacter baumannii* strain LAC-4, *Carbohydr. Res.*, **390**, 42-45, doi: 10.1016/j.carres.2014.03.001.

5,7-DIAMINO-3,5,7,9-TETRADEOXYNON-2-ULOSONIC ACIDS IN CAPSULAR POLYSACCHARIDES OF *Acinetobacter baumannii*

Review

Y. A. Knirel^{1*}, A. A. Kasimova¹, N. P. Arbatsky¹, M. M. Shneider², A. V. Popova³,
F. A. Brovko⁴, A. S. Shashkov¹, S. N. Senchenkova¹, A. V. Perepelov¹, and A. M. Shpirt¹

¹ N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117913 Moscow, Russia; e-mail: yknirel@gmail.com

² Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia

³ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology,
142279 Obolensk, Moscow Region, Russia

⁴ Pushchino Branch, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

The polysaccharide capsule that surrounds the bacterial cell plays an important role in pathogenesis of infections caused by the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii* by providing protection from external factors. Structures of the capsular polysaccharide (CPS) produced by individual *A. baumannii* isolates and the corresponding CPS biosynthesis gene clusters can be highly diverse but many from them are related. A large proportion of the *A. baumannii* CPS types contain an isomer of 5,7-diamino-3,5,7,9-tetraoxynon-2-ulosonic acid. Three of these isomers, namely acinetaminic acid (L-glycero-L-altro isomer), 8-epiacinetaminic acid (D-glycero-L-altro isomer), and 8-epipseudaminic acid (D-glycero-L-manno isomer), have not been found

so far in naturally-occurring carbohydrates from other species. In the CPSs of *A. baumannii*, the higher monosaccharides of this class carry N-acyl substituents at positions 5 and 7, and in some CPSs, the N-acetyl and N-(3-hydroxybutanoyl) groups are both present. The present review addresses the structures and genetics of biosynthesis of the CPSs of *A. baumannii* that contain di-N-acyl derivatives of 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexon-2-ulosonic acids.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, capsular polysaccharide, bacterial polysaccharide, capsule, acyl group, higher monosaccharide, nonulosonic acid

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ MEK1/2–ERK1/2-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В СЕТЧАТКЕ КРЫС С ВОЗРАСТОМ И ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

© 2023 Н.А. Муралёва*, Н.Г. Колосова

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН),
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: myraleva@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.12.2022

После доработки 09.01.2023

Принята к публикации 09.01.2023

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – сложное нейродегенеративное заболевание, которое является основной причиной необратимого нарушения зрения в развитых странах. Возраст является основным фактором риска ВМД, молекулярные механизмы развития которой до конца не известны. Всё больше данных указывает на то, что развитию ВМД и других нейродегенеративных заболеваний способствуют изменения с возрастом в регуляции путей митоген-активируемых протеинкиназ, однако информация о них противоречива. В их числе – ERK1 и ERK2, которые активируются внеклеточными стимулами, в том числе факторами роста, цитокинами, гормонами и различными видами клеточного стресса, включая окислительный стресс и стресс эндоплазматического ретикулума. Целью настоящего исследования явилась оценка вклада изменения активности сигнального пути (SP) ERK1/2 в развитие ВМД. Проведено сравнение её изменений с возрастом в сетчатке крыс Wistar (контроль) и OXYS, у которых спонтанно развивается ретинопатия, аналогичная ВМД у людей. Было показано, что активность ERK1/2-SP увеличивается во время физиологического старения в сетчатке крыс Wistar. Манифестация и активная прогрессия ВМД-подобной патологии у крыс OXYS сопровождается гиперфосфорилированием ERK1/2 и MEK1/2 – ключевых киназ ERK1/2-SP в сетчатке. При прогрессии признаков ВМД в сетчатке крыс OXYS также происходит усиление ERK1/2-зависимого фосфорилирования тау-белка и альфа-В-кристаллина в положении Ser45.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, возрастная макулярная дегенерация, ERK1/2-сигнальный путь, альфа-В-кристаллин, тау-белок, фосфорилирование, крысы OXYS.

DOI: 10.31857/S0320972523020070, **EDN:** QGTGWG

ВВЕДЕНИЕ

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – сложное нейродегенеративное заболевание, которое становится основной причиной необратимой потери зрения у людей старше 60 лет. Согласно анализу метаданных, 8,7% населения мира страдают от ВМД, и их число будет увеличиваться с ростом продолжительности жизни. В основе патогенеза ВМД лежат структурно-функциональные изменения сетчатки, характерные для старения, тогда как молекулярно-генетические предпосылки и механиз-

мы их перехода в патологический процесс остаются неясными, с чем связано отсутствие эффективных методов профилактики и лечения заболевания [1]. Окислительный стресс, воспаление, нарушение протеостаза и апоптоз играют важную роль в патогенезе ВМД. Регуляция этих процессов тесно связана с сигнальными путями (SP) митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK). MAPK представляют собой семейство эволюционно консервативных протеинкиназ, которые критически важны для таких клеточных процессов, как пролиферация, дифференцировка, апоптоз и

Принятые сокращения: Аβ – бета-амилоид; БА – болезнь Альцгеймера; ВМД – возрастная макулярная дегенерация; ДЭГ – гены с дифференциальной экспрессией; CryaB – альфа-В-кристаллин; ERK1 – внеклеточная сигнал-регулируемая протеинкиназа 1; ERK2 – внеклеточная сигнал-регулируемая протеинкиназа 2; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы; SP – сигнальный путь, Тау – тау-белок.

* Адресат для корреспонденции.

выживание. MAPK-SP подразделяются на четыре отдельные группы: пути внеклеточных сигналов-регулируемых протеинкиназ 1 и 2 (ERK1 и 2), JNK1-3, p38 и ERK5 [2], которые активируются внеклеточными стимулами, включая факторы роста, цитокины, гормоны и различные виды клеточного стресса, включая окислительный стресс, ультрафиолетовое излучение и гипоксию. В результате активации трёхуровневого сигнального каскада MAPK фосфорилируют белки и активируют факторы транскрипции, расположенные в цитоплазме и ядре, что приводит к экспрессии генов-мишеней и формированию биологического ответа.

Нарушения MAPK-SP выявляются при ряде нейродегенеративных заболеваний, в том числе при болезни Альцгеймера (БА). Показана зависимость накопления патологических агрегатов бета-амилоида (Аβ) и гиперфосфорилированного тау-белка (Тау), степени нейровоспаления и окислительного стресса, а также других проявлений БА от активности MAPK [3, 4]. Вклад нарушений активности MAPK-SP в патогенез БА подтверждён результатами многочисленных исследований, и эти нарушения рассматриваются как потенциальная мишень для терапевтических воздействий. В то же время информация о влиянии нарушения регуляции MAPK-SP на развитие ВМД крайне ограничена и основана главным образом на результатах, полученных при исследовании культур клеток ретинального пигментного эпителия сетчатки (РПЭ). При этом ещё 10 лет назад Dridi et al. выявили повышенные уровни фосфорилирования ERK1/2 в первичных клеточных культурах РПЭ из глаз пациентов с поздними стадиями ВМД [5]. Более того, были выявлены ассоциации ВМД с однонуклеотидными полиморфизмами в генах, кодирующих элементы активируемых стрессом MAPK-SP [6]. Среди них ERK1/2, участвующие в поддержании протеостаза посредством регуляции агрегации белков, индуцированной стрессом эндоплазматического ретикулаума и другими стрессопосредованными ответами в клетке [7–9].

Становится всё более очевидным, что посттрансляционные модификации сигнальных белков, включая фосфорилирование, являются основным механизмом, контролирующим протеостаз [10], и зависят от белков-субстратов. Одним из них является Тау, гиперфосфорилирование которого вызывает образование патологических агрегатов в головном мозге и сетчатке больных БА, в том числе – у продормальных больных с лёгкими когнитивными нарушениями [11, 12] и в сетчатке пациентов с ВМД [13]. ERK1/2-SP обеспечивает актива-

цию белков-шаперонов, осуществляющих контроль качества белков. Один из них – альфа-В-кристаллин (CryaB), который снижает нейротоксичность белковых агрегатов [14] и становится основным белковым компонентом патологических комплексов в головном мозге пациентов с БА и друз, ассоциированных с ВМД [15].

Несмотря на ограниченность данных о влиянии активности MAPK на развитие ВМД, фармакологическое ингибирование этих SP обсуждается как альтернативный путь профилактики и лечения ВМД и других нейродегенеративных заболеваний [16]. Трудности в исследовании механизмов развития ВМД связаны с дефицитом адекватных моделей. Нами получены убедительные доказательства того, что линия преждевременно стареющих крыс OXYS соответствует критериям как модели БА [17, 18], так и модели ВМД [19]. На основании офтальмоскопических осмотров установлено, что первые клинические проявления ретинопатии, аналогичной ВМД, выявляются у ~20% крыс OXYS в возрасте 5–6 недель, а в возрасте 3–4 месяцев признаки ретинопатии регистрируются у всех животных. Патологические изменения прогрессируют и достигают выраженных стадий, предполагающих потерю или значительное ухудшение остроты зрения, к возрасту 14–18 месяцев. Ретинопатия крыс OXYS соответствует «сухой» форме ВМД и проявляется такими признаками этого заболевания, как дистрофические изменения и истончение сетчатки, нарушение микроциркуляции, изменение нейротрофического обеспечения, накопление липофусцина и Аβ, структурные изменения сетчатки [19–21].

Ранее мы показали, что БА-подобная патология у крыс OXYS развивается и прогрессирует на фоне изменения активности p38–MAPK-и ERK1/2-SP в головном мозге [22–24]. Их активность в сетчатке ранее не исследовалась. Целью настоящей работы явилось сравнение изменений активности ERK1/2-SP в сетчатке при физиологическом старении крыс Wistar и при развитии признаков ВМД у крыс OXYS [25–27].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Самцы преждевременно стареющих крыс OXYS ($n = 24$) и контрольные крысы Wistar ($n = 24$) в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев были получены из Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ ИЦиГ СО РАН. В возрасте 4 недель детёнышей

отнимали от груди, помещали в группы по пять животных в клетке ($57 \times 36 \times 20$ см) и содержали в стандартных лабораторных условиях (22 ± 2 °C и 12-часовой световой цикл/12-часовой цикл темноты). Животные имели доступ к стандартному корму для грызунов (ПК-120-1; ООО «Лабораторснаб», Москва, Россия) и воде *ad libitum*.

Вестерн-блот анализ. Сетчатку крыс OXYS и Wistar в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев ($n = 5$) гомогенизировали с помощью лизирующего буфера RIPA с добавлением ингибиторов протеаз («Sigma-Aldrich», США) и ингибиторов фосфатаз. Концентрацию белка определяли с помощью бикарбонной кислоты (BCA) («Thermo Fisher Scientific», США). Белки в экстрактах разделяли электрофорезом и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США), которую затем блокировали 1%-ным (m/v) BCA в течение 1 ч, а затем инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами к ERK1/2, ERK1/2 (phospho T202, T185) («Thermo Fisher Scientific», разведение 1 : 1000), MEK1/2, MEK1/2 (phospho S218, S222), Tau, Tau (phospho T181), CryaB, антиphospho-S45 CryaB или GAPDH («Abcam», США; разведение 1 : 1000) и в течение 1 ч с вторичными антителами («Abcam», 1 : 5000). Полосы белков обнаруживали с помощью системы визуализации ChemiDoc MP («Bio-Rad»). Интенсивность хемилюминесцентных сигналов полос определяли количественно с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

Анализ экспрессии генов. Сетчатку крыс OXYS и Wistar в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев ($n = 3$) использовали для анализа RNA-Seq и обрабатывали, как описано ранее [19]. Данные секвенирования были предварительно обработаны с помощью инструмента Cutadapt для удаления адаптеров и низкокачественных последовательностей. Полученные прочтения были сопоставлены с эталонной сборкой ге-

нома Rnor_6.0 в программном обеспечении TopHat2 и далее были преобразованы в таблицы количества генов с помощью данных аннотаций генов ENSEMBL и RefSeq. Полученные таблицы подвергали анализу дифференциальной экспрессии генов в программе DESeq. Гены с $p < 0,05$ отбирали как дифференциально экспрессируемые (ДЭГ). В анализ были включены гены, ассоциированные с ERK1/2-SP, согласно базе данных Rat Genome Database (<https://rgd.mcw.edu/>) и Киотской энциклопедии генов и геномов (<http://www.genome.jp/kegg>).

Статистический анализ. Все статистические расчёты производили с помощью программного пакета Statistica 10.0 («Statsoft», США). Использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) с *post hoc* сравнением групповых средних (Newman–Keul test). Как независимые факторы рассматривали генотип (Wistar, OXYS) и возраст (20 дней, 3 и 18 месяцев). Данные представлены в виде медианы (q_1 – q_3). Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ изменения экспрессии генов, ассоциированных с MEK1/2–ERK1/2-SP, в сетчатке крыс OXYS и Wistar с возрастом. Согласно анализу транскриптома сетчаток, среди 54 генов, ассоциированных с MEK1/2–ERK1/2-SP, экспрессия 19 генов изменялась в сетчатке крыс Wistar с возраста 20 дней до 3 месяцев (рис. 1, а). Среди них увеличился уровень мРНК семи генов (*Kras*, *Tsc2*, *Phlpp1*, *Necab2*, *Dcc*, *Spred2* и *Spp1*), а 12 генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Nqo2*, *Cryba1*, *Glpr2*, *Kars*, *Sirt3*, *Araf*, *Ptk2b*, *Map3k1* и *Rps6ka2*) – уменьшился.

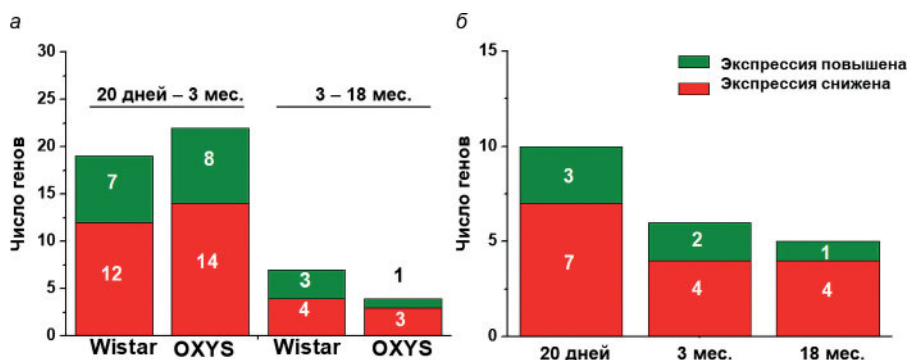


Рис. 1. Возрастные изменения экспрессии генов MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке крыс Wistar и OXYS. Количество ДЭГ в зависимости от возраста у крыс Wistar и OXYS (а). Количество ДЭГ у 20-дневных, 3- и 18-месячных крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar того же возраста (б). $p < 0,05$

С возраста 3 до 18 месяцев выявлено семь ДЭГ. Среди них уровень мРНК трёх генов (*Rps6ka6*, *Hcrtr1* и *Cryba1*) повышался, а генов *Mknk2*, *Rps6ka1*, *Iqgap3* и *Ptk2b* – снижался.

Максимальное количество ДЭГ (22) в сетчатке крыс OXYS выявлено в период манифестации признаков ретинопатии, аналогичной ВМД у людей (в возрасте от 20 дней до 3 месяцев). Среди них увеличился уровень мРНК восьми генов (*Braf*, *Map2k2*, *Tsc2*, *Dstyck*, *Phlpp1*, *Necab2*, *Dcc* и *Spred2*), а 14 генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Nqo2*, *Ace2*, *Glpr2*, *Kars*, *Sirt3*, *Araf*, *Prkcd*, *Ptk2b*, *Slpr1*, *Map3k1* и *Spp1*) – снизился (рис. 1, а). В период активного прогрессирования признаков ВМД с 3 до 18 месяцев у крыс OXYS выявлено 4 ДЭГ: *Ace2* – с повышенной экспрессией, а гены *Map2k1*, *Nqo2* и *Rps6ka2* – с пониженной.

Сравнение возрастной динамики ДЭГ показало, что в возрасте от 20 дней до 3 месяцев у крыс Wistar и OXYS сходным образом изменялась экспрессия мРНК 15 генов. Среди них уровень мРНК 10 генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Nqo2*, *Glpr2*, *Kars*, *Sirt3*, *Araf*, *Ptk2b* и *Map3k1*) снижался, а генов *Tsc2*, *Phlpp1*, *Necab2*, *Dcc* и *Spred2* – увеличивался. Кроме того, у крыс Wistar была подавлена экспрессия *Cryba1* и *Rps6ka2*, а экспрессия *Kras* и *Spp1* возрастала, в то время как у крыс OXYS выявлено снижение уровня мРНК генов *Ace2*, *Prkcd*, *Slpr1* и *Spp1* и повышение экспрессии *Braf*, *Map2k2* и *Dstyck* (рис. 1, а). Согласно анализу транскриптома сетчатки в возрасте от 3 до 18 месяцев, у крыс Wistar и OXYS не было общих ДЭГ, проявляющих однонаправленные изменения экспрессии.

Анализ межлинейных различий показал, что в возрасте 20 дней у крыс OXYS выявлено 10 ДЭГ по сравнению с контрольными крысами (Wistar) (рис. 1, б). Уровни мРНК генов *Map2k2*, *Phlpp1* и *Sirt3* повысились, а семи генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Eif3a*, *Prkcd*, *Map3k1* и *Spp1*) – уменьшились.

Проявление ВМД-подобной патологии у 3-месячных крыс OXYS происходило одновременно с изменением экспрессии шести генов, вовлечённых в MEK1/2–ERK1/2–SP: увеличивался уровень мРНК генов *Raf1* и *Ace2*, а у четырёх генов (*Nqo2*, *Cryba1*, *Rps6ka2* и *Spp1*) – снижался.

Активное прогрессирование ретинопатии у 18-месячных крыс OXYS было связано с пятью ДЭГ, участвующими в MEK1/2–ERK1/2–SP. При этом уровень мРНК гена *Dstyck* оказался повышенным, а экспрессия генов *Mknk2*, *Rps6ka1*, *Ptk2b* и *Spp1* была подавленной (рис. 1, б).

С 20-дневного до 3-месячного возраста у крыс OXYS и Wistar выявлены общие тенденции изменения ДЭГ: повышался уровень мРНК пяти генов (*Tsc2*, *Phlpp1*, *Necab2*, *Dcc*, *Spred2*), а уровень мРНК 10 генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Nqo2*, *Glpr2*, *Kars*, *Sirt3*, *Araf*, *Ptk2b* и *Map3k1*) в этом возрасте снижался. От 3 до 18 месяцев общих ДЭГ между крысами OXYS и Wistar не было.

Изменение содержания ERK1/2 и его фосфорилированной формы (p-ERK1/2) в сетчатке крыс с возрастом. Далее мы сравнили содержание белка ERK1/2 и степень его фосфорилирования в сетчатке крыс Wistar и OXYS. По данным ANOVA, содержание ERK1/2 в сетчатке зависело от генотипа животных ($F_{1,24} = 4,4$; $p < 0,045$) и не менялось с возрастом ($F_{2,24} = 0,069$; $p = 0,93$, рис. 2, а, б). Уровень фосфорилирования ERK1/2 зависел от генотипа крыс ($F_{1,24} = 18,5$; $p < 0,001$) и изменялся с возрастом ($F_{2,24} = 45,7$; $p < 0,001$). Факторы «генотип» и «возраст» взаимодействовали ($F_{1,24} = 9,3$; $p < 0,001$). Сравнение групповых средних показало, что уровень p-ERK1/2 в возрасте 20 дней не различался между линиями крыс ($p > 0,05$); однако к 3-месячному возрасту у крыс OXYS его уровень увеличился ($p < 0,002$) и стал выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,008$, рис. 2, в). К 18-месячному возрасту содержание p-ERK1/2 увеличивалось у крыс обеих линий, но у крыс OXYS оно оставалось выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,002$). Анализ соотношения p-ERK1/2 к ERK1/2 выявил зависимость от генотипа ($F_{1,24} = 4,5$; $p < 0,044$) и роста с возрастом ($F_{2,24} = 35,0$; $p < 0,001$) у крыс Wistar и OXYS. Факторы «генотип» и «возраст» взаимодействовали ($F_{2,24} = 3,8$; $p < 0,037$). Сравнение групповых средних показало, что соотношение p-ERK1/2 / ERK1/2 в сетчатке выше у крыс OXYS, чем у крыс Wistar в возрасте 3 и 18 месяцев ($p < 0,002$ и $p < 0,012$ соответственно, рис. 2, в).

Изменение содержания MEK1/2 и p-MEK1/2 в сетчатке крыс с возрастом. Белки MEK1 и MEK2 регулируют активность ERK1 и ERK2 посредством фосфорилирования. На рис. 2, а, д, е представлены результаты вестерн-блот анализа содержания белков MEK1/2 и p-MEK1/2 в сетчатке крыс Wistar и OXYS. По данным ANOVA-анализа, экспрессия белка MEK1/2 в сетчатке крыс не зависела от генотипа животных ($F_{1,24} = 0,7$; $p = 0,40$) и не изменялась с возрастом ($F_{2,24} = 0,17$; $p = 0,85$). В то же время уровень фосфорилирования MEK1/2 в сетчатке крыс зависел от генотипа животных ($F_{1,24} = 24,4$; $p < 0,001$) и изменялся с возрастом ($F_{2,24} = 27,6$; $p < 0,001$). Факторы «генотип»

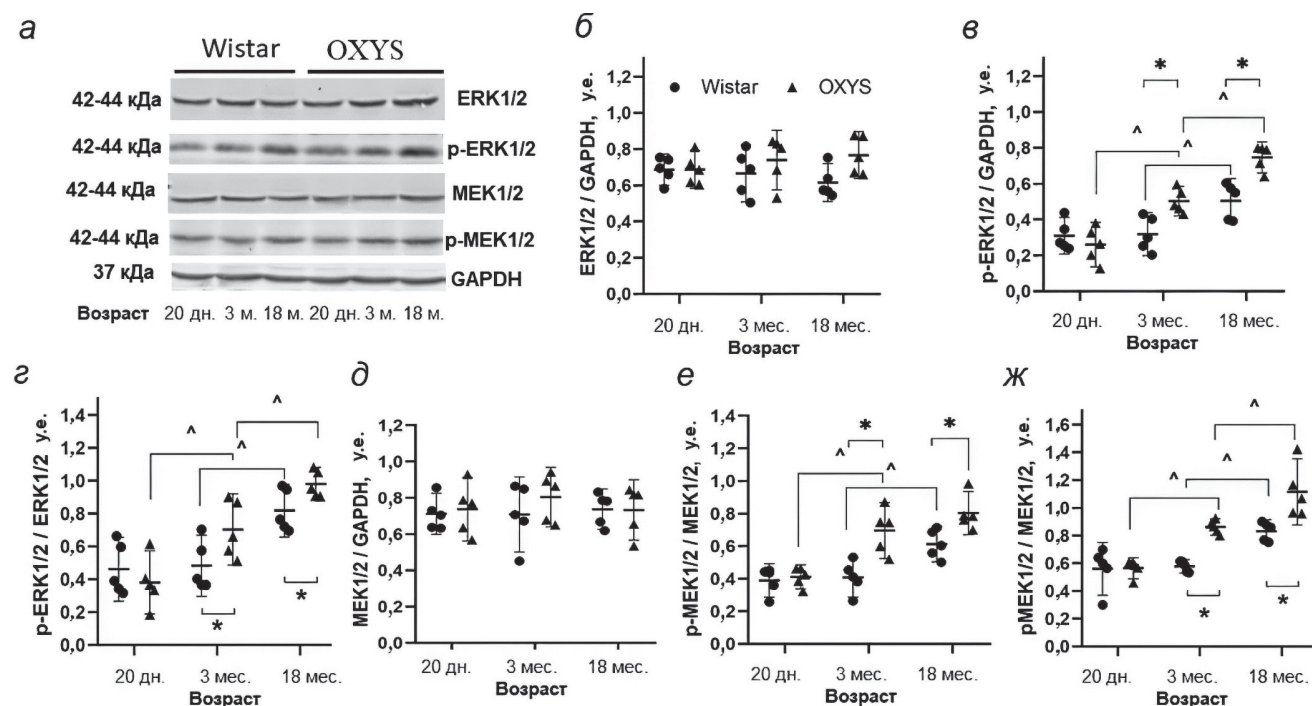


Рис. 2. Изменение содержания ERK1/2, p-ERK1/2, MEK1/2 и p-MEK1/2 в сетчатке крыс Wistar с возрастом и OXYS – при развитии ВМД-подобной патологии. Репрезентативные изображения блотов (а), содержание ERK1/2 (б), p-ERK1/2 (в), соотношение p-ERK1/2 и ERK1/2 (г), содержание MEK1/2 (д), p-MEK1/2 (е) и соотношение p-MEK1/2 и MEK1/2 (ж) в сетчатке крыс Wistar и OXYS с возрастом. В качестве контроля использовали GAPDH. ^ – достоверные изменения с возрастом у крыс одной линии ($p < 0,05$); * – достоверные различия между крысами OXYS и Wistar одного возраста

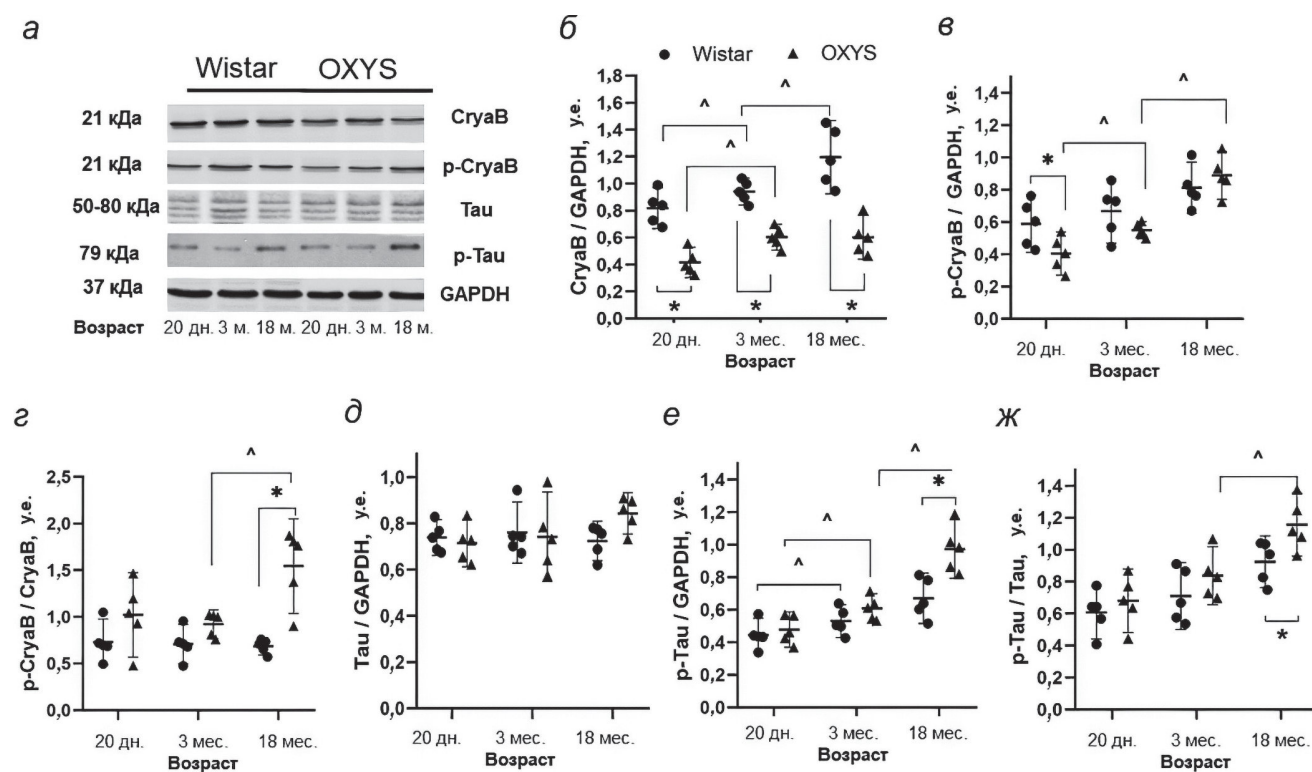


Рис. 3. Изменение содержания CryaB, p-CryaB, Tau и p-Tau в сетчатке крыс Wistar с возрастом и OXYS – при развитии ВМД-подобной патологии. Репрезентативные изображения блотов (а) и содержание CryaB (б), p-CryaB (в), соотношение p-CryaB и CryaB (г), содержание Tau (д), p-Tau (е) и соотношение p-Tau и Tau (ж) в сетчатке крыс Wistar и OXYS с возрастом. В качестве контроля использовали GAPDH. ^ – достоверные изменения с возрастом у крыс одной линии ($p < 0,05$); * – достоверные различия между крысами OXYS и Wistar одного возраста

и «возраст» взаимодействовали ($F_{1,24} = 5,3$; $p < 0,013$). В 20-дневном возрасте содержание p-MEK1/2 у крыс обеих линий не различалось ($p > 0,05$); однако к 3-месячному возрасту у крыс OXYS его уровень увеличился ($p < 0,001$) и стал выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,001$). К 18-месячному возрасту у крыс обеих линий отношение возрастало, но у крыс OXYS оставалось выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,015$).

Анализ соотношения p-MEK1/2 / MEK1/2 показал, что оно зависело от генотипа ($F_{1,24} = 33,7$; $p < 0,001$) и возраста ($F_{2,24} = 52,9$; $p < 0,001$), а факторы взаимодействовали между собой ($F_{1,24} = 8,08$; $p < 0,002$). Сравнение групповых средних показало, что соотношение p-MEK1/2 / MEK1/2 в возрасте 20 дней у двух линий не различалось ($p > 0,05$). Увеличение этого отношения к 3-месячному возрасту привело к достоверному увеличению этого показателя у крыс OXYS относительно крыс Wistar ($p < 0,001$, рис. 2, ж). К 18-месячному возрасту соотношение p-MEK1/2 / MEK1/2 увеличивалось и у крыс Wistar ($p < 0,001$), и у OXYS ($p < 0,020$), причём у крыс OXYS этот показатель превышал таковой у одновозрастных крыс Wistar ($p < 0,004$).

Изменение содержания CryaB и p-CryaB в сетчатке крыс с возрастом. Мы исследовали экспрессию малого шаперона CryaB как целевого белка для MEK1/2–ERK1/2-SP, а также уровень его фосфорилирования в позиции Ser45. По данным ANOVA-анализа, концентрация CryaB в сетчатке крыс Wistar и OXYS зависит от генотипа животных ($F_{1,24} = 104,5$; $p < 0,001$) и изменяется с возрастом ($F_{2,24} = 14,0$; $p < 0,001$). Факторы «генотип» и «возраст» не взаимодействовали ($F_{1,24} = 3,1$; $p = 0,06$). Во всех возрастных группах уровень CryaB был ниже у крыс OXYS, чем у крыс Wistar того же возраста ($p < 0,001$ для всех случаев, рис. 3, а, б).

Уровень фосфорилирования CryaB не зависел от генотипа животных ($F_{2,24} = 3,7$; $p = 0,066$), но менялся с возрастом ($F_{2,24} = 28,0$; $p < 0,033$). Факторы «генотип» и «возраст» взаимодействовали ($F_{1,24} = 4,0$; $p < 0,010$). Сравнение групповых средних показало, что содержание p-CryaB у 20-дневных крыс OXYS было ниже, чем у крыс Wistar ($p < 0,001$, рис. 3, в). К 3-месячному возрасту уровень p-CryaB в сетчатке крыс OXYS достигал значений, наблюдаемых у крыс Wistar, а также достоверно не отличался в возрасте 18 месяцев. Анализ соотношения p-CryaB/CryaB показал, что оно зависело от генотипа ($F_{1,24} = 23,8$; $p < 0,001$) и возраста ($F_{2,24} = 3,9$; $p < 0,035$), при этом факторы взаимодействовали ($F_{1,24} = 4,8$; $p < 0,018$). Сравнение групповых средних показало, что

отношение p-CryaB/CryaB в возрасте 20 дней у двух линий не различалось ($p > 0,05$). В возрасте 3 месяцев у крыс OXYS была выявлена тенденция к увеличению отношения p-CryaB/CryaB относительно крыс Wistar ($p < 0,056$), к возрасту 18 месяцев этот показатель у крыс OXYS достоверно превышал значения контрольных крыс Wistar ($p < 0,001$) (рис. 3, г).

Изменение содержания Тау и p-TauT181 в сетчатке крыс с возрастом. По данным ANOVA, содержание белка Тау в сетчатке крыс Wistar и OXYS не зависело от генотипа животных ($F_{1,24} = 0,56$; $p = 0,46$) и достоверно не менялось с возрастом ($F_{2,24} = 0,93$; $p = 0,41$). Однако в возрасте 18 месяцев уровень Тау в сетчатке крыс OXYS был выше, чем у крыс Wistar того же возраста ($p < 0,028$, рис. 3, а, д–ж).

Уровень фосфорилирования Тау зависел от генотипа животных ($F_{1,24} = 15,4$; $p < 0,001$) и изменялся с возрастом ($F_{2,24} = 36,6$; $p < 0,001$). Факторы «генотип» и «возраст» взаимодействовали ($F_{1,24} = 5,5$; $p < 0,010$). Сравнение групповых средних показало, что в возрасте 20 дней и 3 месяцев уровень p-Tau не различался между крысами двух линий ($p > 0,05$, рис. 3, е). К 18-месячному возрасту содержание p-Tau увеличивалось у крыс Wistar и OXYS, но оставалось более высоким у крыс OXYS ($p < 0,008$). ANOVA показал, что отношение p-Tau/Тау зависит от генотипа ($F_{1,24} = 7,9$; $p < 0,010$) и увеличивается с возрастом ($F_{2,24} = 20,8$; $p < 0,001$) у крыс Wistar и OXYS. Факторы «генотип» и «возраст» не взаимодействовали ($F_{1,24} = 0,8$; $p = 0,448$). Быстрый рост отношения p-Tau/Тау в сетчатке крыс OXYS к 18-месячному возрасту привёл к увеличению этого показателя у крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar ($p < 0,036$, рис. 3, ж).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растёт количество данных, свидетельствующих о том, что с нарушением регуляции MAPK-путей связаны изменения в биологических процессах, способствующих старению и развитию связанных с ним заболеваний, однако данные об изменениях активности MAPK с возрастом крайне противоречивы [28]. В настоящем исследовании впервые проведена оценка изменений активности MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке с возрастом и их возможного вклада в развитие ВМД. Мы показали, что активность MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке при физиологическом старении крыс Wistar повышается с возрастом, а манифестация и активная прогрессия у крыс OXYS признаков ретинопатии,

аналогичной ВМД у людей, происходит на фоне гиперфосфорилирования ключевых киназ этого сигнального пути — ERK1/2 и MEK1/2.

На первом этапе мы оценили изменения с возрастом уровней мРНК ключевых генов MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке крыс Wistar и крыс OXYS на основании данных транскриптомов. Сетчатка содержит более 60 видов клеток, образующих различные структуры, которые могут стареть с разной скоростью [1], что неизбежно приводит к изменению их соотношения. Наши предыдущие исследования указывают на то, что соотношение различных типов клеток сетчатки с возрастом у крыс Wistar и OXYS изменяется по-разному. Так, у крыс OXYS на фоне нейродегенеративных изменений с возрастом усиливается гибель фоторецепторов, развивается глиоз [27]. Однако в настоящем исследовании мы не выявили межлинейных различий в уровнях мРНК ключевых генов-участников MEK1/2–ERK1/2-SP. Анализ профиля экспрессии генов, ассоциированных с MEK1/2–ERK1/2-SP, также не выявил существенных изменений с возрастом уровней мРНК этих генов как у крыс Wistar, так и у крыс OXYS. В сетчатке крыс OXYS среди ДЭГ количество генов с подавленной регуляцией превышало количество генов с повышенной регуляцией в каждой возрастной группе. В их числе ген *Map2k1* (митоген-активируемая протеинкиназа-киназа 1; генный продукт: MEK1), уровень мРНК которого был снижен в сетчатке 20-дневных крыс OXYS. *Map2k1* — киназа двойной специфичности, которая участвует в активации ERK1 и ERK2. Такой результат может указывать на снижение активности SP, но мы выявили гиперэкспрессию гена *Map2k2* (митоген-активируемая протеинкиназа 2; продукт гена: MEK2), который является паралогом гена MAP2K1. ERK1/2 — это единственные субстраты MAP2K1/2. Таким образом, противоположные изменения экспрессии генов *Map2k1* и *Map2k2* не приводят к изменению экспрессии ERK1 и ERK2. Кроме того, в сетчатке крыс OXYS снижен уровень мРНК гена *Map3k1* (митоген-активируемая протеинкиназа киназы киназы киназы 1), белковый продукт которого функционирует выше по ERK-SP и активирует его посредством активации MAP2K1.

Интересно, что в сетчатке крыс OXYS снижен уровень мРНК гена *Rps6ka3* (рибосомальной протеинкиназы S6 A3). RPS6KA3 действует ниже по ERK1/2-SP и опосредует пролиферации, выживанию и дифференцировке клеток путём модулирования передачи сигналов mTOR. Эти данные согласуются с тем, что в

сетчатке крыс OXYS подавлена активность сигнального пути mTOR [29], и подтверждают связь между этими редокс-зависимыми SP. Среди генов, экспрессия которых повышена в сетчатке крыс OXYS, ген *Phlpp1* (домен PH и лейцин-богатые повторы протеинфосфатазы 1). Его продукт дефосфорилирует RAF1, тем самым ингибируя его киназную активность и действуя как негативный регулятор передачи сигналов. Среди ДЭГ, экспрессия которых снижена, следует отметить секретируемый фосфопротеин 1 (*Spp1*, также известный как остеопонтин). Недавно было показано, что он играет потенциальную роль в опосредованном макрофагами клиренсе Aβ [30]. Следовательно, недостаточная экспрессия *Spp1* может способствовать характерному для крыс OXYS накоплению патологических агрегатов Aβ в сетчатке и/или усугублять его, усиливая таким образом прогрессию нейродегенеративных изменений. Важно отметить, что большинство ДЭГ со сниженной экспрессией находятся ниже ключевых киназ рассматриваемого сигнального каскада и не влияют на его активность в целом.

На активность MEK1/2–ERK1/2-SP могут влиять мутации в генах, ассоциированных с этим SP, например, *BRAF* или *RAS* [31]. В недавнем исследовании мы обнаружили у крыс OXYS полиморфизмы в генах *Nqo2*, *Glipr2* и *Spred2*, которые участвуют в MEK1/2–ERK1/2-SP [32]. Тем не менее эти полиморфизмы являются синонимичными аминокислотными заменами и не влияют на структуру, функцию транскрипта и/или белка или на активность SP в целом.

Результаты анализа транскриптома были подтверждены исследованием на белковом уровне. Содержание ERK1/2 в сетчатке крыс Wistar и OXYS с возрастом существенно не менялось. Наши результаты согласуются с выводами единственного исследования содержания этого белка в сетчатке при ВМД, в котором не была выявлена разница в содержании ERK1/2 в сетчатке у пациентов с поздними стадиями ВМД по сравнению с пациентами без ВМД [5]. В настоящем исследовании мы не выявили изменений в содержании ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS как в период выраженных патологических изменений, так и на «доклинической», и на стадии манифестации признаков ВМД.

Передача сигнала по каскаду ERK1/2 происходит посредством последовательного фосфорилирования нижестоящих киназ, что является важной характеристикой активности SP. Соответственно, именно повышение уровня фосфорилированного ERK1/2 свидетельствует об активации этого сигнального пути.

Мы выявили повышение этого показателя с возрастом в сетчатке крыс обеих линий. При этом уровень фосфорилирования ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS был выше, чем у крыс Wistar, начиная с молодого возраста. Таким образом, наши результаты согласуются с данными Dridi о гиперфосфорилировании ERK1/2 в сетчатке на поздних стадиях ВМД [5]. Также мы выявили повышенное фосфорилирование ERK1/2 уже на стадии манифестации ВМД-подобной патологии у крыс OXYS. Более того, в сетчатке 3- и 18-месячных крыс OXYS повышено, по сравнению с одновозрастными крысами Wistar, фосфорилирование MEK1/2. Киназы MEK1/2 являются активаторами ERK1/2 и обладают узкой субстратной специфичностью. Гиперфосфорилирование MEK1/2 указывает на активацию исследуемого нами SP.

Дополнительно в качестве критерия оценки активности ERK1/2-SP мы оценили изменения ERK1/2-зависимого фосфорилирования небольшого белка-шаперона CryaB. Этот белок защищает клетки сетчатки от окислительного стресса и препятствует нарушениям протеостаза, которым отводится важная роль в патогенезе ВМД [33]. В достаточно многочисленных исследованиях было показано, что эндогенный CryaB активируется при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе при ВМД [34]. Тем не менее здесь мы подтвердили, что уровень CryaB в сетчатке крыс OXYS ниже, чем у крыс Wistar на протяжении всей жизни [35]. Такой результат, на первый взгляд, противоречит предыдущим исследованиям. В то же время в ряде работ было показано, что ингибирование CryaB повышает чувствительность клеток к окислительному стрессу, тогда как его избыточная экспрессия — защищает. Клетки РПЭ, лишённые CryaB, оказались более восприимчивыми к окислительному и эндоплазматическому стрессу [36–38].

Мутация R120G в CryaB индуцирует агрегацию белка, которая принимает участие в патогенезе ВМД. Активно обсуждается терапевтический потенциал CryaB в отношении ВМД [39]. Так, введение мышам экзогенного полноразмерного CryaB уменьшает нейровоспаление, нейропатию зрительного нерва и острое повреждение спинного мозга. Предварительная обработка CryaB оказалась эффективной в подавлении активации маркеров старения в клетках РПЭ [40]. Можно полагать, что увеличение с возрастом содержания CryaB в сетчатке крыс Wistar обусловлено адаптивной реакцией на накопление стрессовых раздражителей при физиологическом старении.

Исследование ERK1/2-зависимого фосфорилирования CryaB в положении Ser45 в сетчатке, его изменений с возрастом и при развитии ВМД ранее не проводилось. Примечательно, что гиперфосфорилирование CryaB совпало с усилением фосфорилирования ERK1/2 в сетчатке крыс Wistar и OXYS, что подтверждает активацию MEK1/2–ERK1/2-SP. Фосфорилирование CryaB повышает его способность образовывать прочные связи с нейротоксическими белками, включая A β , и делает CryaB нерастворимым. Усиленное накопление таких агрегатов было выявлено в гомогенатах головного мозга пациентов с БА [41]. Сходство патогенеза ВМД и БА в настоящее время активно обсуждается. Дегенеративные изменения сетчатки при ВМД, как и мозга при БА, связаны с воспалением, патологической агрегацией A β и окислительным стрессом [42]. Их регуляция MAPK-SP предполагает сходные изменения активности этого пути при развитии заболеваний. Активация пути MEK1/2–ERK1/2-SP с гиперфосфорилированием ERK1 и ERK2 обнаружена у больных деменцией [43]. Эти изменения связаны с нейротоксическим действием патологических агрегатов A β , отложения которых выявляются также в сетчатке пациентов с ВМД и считаются дополнительным фактором риска развития потери зрения. Результаты наших исследований на крысах OXYS, у которых одновременно развиваются признаки БА и ВМД, подтверждают эту гипотезу. В сетчатке крыс OXYS усиленное накопление A β регистрируется в возрасте около 12 месяцев — в период, когда признаки ВМД достаточно ярко выражены и прогрессируют [19]. В головном мозге крыс OXYS повышенный уровень A β начинает определяться с ~7 месяцев, его накопление прогрессирует с возрастом параллельно с другими признаками БА [17] на фоне усиления активности MEK1/2–ERK1/2-SP [24]. Аналогичные данные были получены на других животных моделях БА [44].

Тау является белком-мишенью ERK1/2-SP. Гиперфосфорилирование Тау — один из ключевых патоморфологических признаков заболевания — выявляется не только в мозге, но и в сетчатке как у пациентов с БА, так и у крыс OXYS [17]. Накопление этого белка в нейрофибриллярных клубках в структурах головного мозга усугубляет нейротоксическое действие на нейроны, запуская петлю обратной связи, которая приводит к гиперактивации MAPK-SP. Ранее мы выявили увеличение активности p38 MAPK-SP в мозге крыс OXYS уже на стадии манифестации признаков БА [22, 23] на фоне гиперфосфорилирования Тау, которое

предшествует накоплению Аβ и регистрируется уже в возрасте 3 месяцев [17]. Как показало настоящее исследование, развитие признаков ВМД у крыс OXYS происходит на фоне усиления в сетчатке ERK1/2-зависимого фосфорилирования Тау.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наши данные свидетельствуют о повышении активности MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке здоровых животных с возрастом. У крыс OXYS манифестация и прогрессия признаков ВМД происходит на фоне повышенной, по сравнению с крысами Wistar, активности MEK1/2–ERK1/2-SP. Прогрессия признаков ВМД сопровождается усилением в сетчатке крыс OXYS MEK1/2–ERK1/2-зависимого фосфорилирования Тау и CrysB (p-Ser45) и, как было показано ранее, накоплением патологических агрегатов Аβ.

Вклад авторов. Н. А. Муралёва — концепция исследования, проведение экспериментов; Н. Г. Колосова — обсуждение результатов

исследования; Н. А. Муралёва и Н. Г. Колосова — подготовка и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 22-25-00224).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа выполнена на крысах линии OXYS и Wistar (контрольная линия) на базе Центра коллективного пользования «Виварий конвенциональных животных» Института цитологии и генетики СО РАН. Содержание животных (включая соответствующие помещения, квалифицированный персонал, необходимую документацию) и все эксперименты с животными проводились в соответствии с позицией по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке Российского научного фонда, а также в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. и одобрены Комиссией по биоэтике ИЦИГ СО РАН (№ 85/1 от 18.06.2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blasiak, J., Sobczuk, P., Pawlowska, E., and Kaarniranta, K. (2022) Interplay between aging and other factors of the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Ageing Res. Rev.*, **81**, 101735, doi: 10.1016/j.arr.2022.101735.
2. Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update, *Physiol. Rev.*, **92**, 689–737, doi: 10.1152/physrev.00028.2011.
3. Kirouac, L., Rajic, A. J., Cribbs, D. H., and Padmanabhan, J. (2017) Activation of Ras-ERK signaling and GSK-3 by amyloid precursor protein and amyloid beta facilitates neurodegeneration in Alzheimer's disease, *eNeuro*, **4**, ENEURO.0149-16.2017, doi: 10.1523/ENEURO.0149-16.2017.
4. Ahmed, T., Zulfiqar, A., Arguelles, S., Rasekhian, M., Nabavi, S. F., et al. (2020) Map kinase signaling as therapeutic target for neurodegeneration, *Pharmacol. Res.*, **160**, 105090, doi: 10.1016/j.phrs.2020.105090.
5. Dridi, S., Hirano, Y., Tarallo, V., Kim, Y., Fowler, B. J., et al. (2012) ERK1/2 activation is a therapeutic target in age-related macular degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13781–13786, doi: 10.1073/pnas.1206494109.
6. SanGiovanni, J. P., and Lee, P. H. (2013) AMD-associated genes encoding stress-activated MAPK pathway constituents are identified by interval-based enrichment analysis, *PLoS One*, **8**, e71239, doi: 10.1371/journal.pone.0071239.
7. Jung, S., Nah, J., Han, J., Choi, S. G., Kim, H., et al. (2016) Dual-specificity phosphatase 26 (DUSP26) stimulates Aβ42 generation by promoting amyloid precursor protein axonal transport during hypoxia, *J. Neurochem.*, **137**, 770–781, doi: 10.1111/jnc.13597.
8. Calderwood, S. K., Xie, Y., Wang, X., Khaleque, M. A., Chou, S. D., et al. (2010) Signal transduction pathways leading to heat shock transcription, *Signal Transd. Ins.*, **2**, 13–24, doi: 10.4137/STI.S3994.
9. Darling, N. J., and Cook, S. J. (2014) The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 2150–2163, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.009.
10. Hutt, D. M., and Balch, W. E. (2013) Expanding proteostasis by membrane trafficking networks, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a013383, doi: 10.1101/cshperspect.a013383.
11. Du, X., Koronyo, Y., Mirzaei, N., Yang, C., Fuchs, D. T., et al. (2022) Label-free hyperspectral imaging and deep-learning prediction of retinal amyloid β-protein and phosphorylated tau, *PNAS Nexus*, **1**, pgac164, doi: 10.1093/pnasnexus/pgac164.

12. Den Haan, J., Morrema, T., Verbraak, F. D., de Boer, J. F., Scheltens, P., et al. (2018) Amyloid-beta and phosphorylated tau in post-mortem Alzheimer's disease retinas, *Acta Neuropath. Com.*, **6**, 147, doi: 10.1186/s40478-018-0650-x.
13. Löffler, K. U., Edward, D. P., and Tso, M. O. (1995) Immunoreactivity against tau, amyloid precursor protein, and beta-amyloid in the human retina, *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*, **36**, 24-31.
14. Tenreiro, S., Eckermann, K., and Outeiro, T. F. (2014) Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Front. Mol. Neurosci.*, **7**, 42, doi: 10.3389/fnmol.2014.00042.
15. Crabb, J. W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K. A., et al. (2002) Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14682-14687, doi: 10.1073/pnas.222551899.
16. Kyosseva, S. V. (2016) Targeting MAPK signaling in age-related macular degeneration, *Ophthalmol Eye Dis.*, **8**, 23-30, doi: 10.4137/OED.S32200.
17. Stefanova, N. A., Kozhevnikova, O. S., Vitovtov, A. O., Maksimova, K. Y., Logvinov, S. V., et al. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer's disease, *Cell Cycle*, **13**, 898-909, doi: 10.4161/cc.28255.
18. Stefanova, N. A., Ershov, N. I., Maksimova, K. Y., Muraleva, N. A., Tyumentsev, M. A., and Kolosova, N. G. (2019) The rat prefrontal-cortex transcriptome: effects of aging and sporadic Alzheimer's disease-like pathology, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **74**, 33-43, doi: 10.1093/gerona/gly198.
19. Kozhevnikova, O. S., Korbolina, E. E., Ershov, N. I., and Kolosova, N. G. (2013) Rat retinal transcriptome: effects of aging and AMD-like retinopathy, *Cell Cycle*, **12**, 1745-1761, doi: 10.4161/cc.24825.
20. Zhdankina, A. A., Fursova, A. Zh, Logvinov, S. V., and Kolosova, N. G. (2008) Clinical and morphological characteristics of chorioretinal degeneration in early aging OXYS rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 455-458, doi: 10.1007/s10517-009-0298-4.
21. Колосова Н. Г., Кожевникова О. С., Муралёва Н. А., Рудницкая Е. А., Румянцева Ю. В., Стефанова Н. А., Телегина Д. В., Тюменцев М. А., Фурсова А. Ж. (2022) SkQ1 как инструмент воздействия на программу преждевременного старения: опыт исследований на крысах OXYS, *Биохимия*, **87**, 1916-1927, doi: 10.31857/S0320972522120119.
22. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2019) p38 MAPK-dependent alphaB-crystallin phosphorylation in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *Exp. Gerontol.*, **119**, 45-52, doi: 10.1016/j.exger.2019.01.017.
23. Muraleva, N. A., Stefanova, N. A., and Kolosova, N. G. (2020) SkQ1 suppresses the p38 MAPK signaling pathway involved in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *Antioxidants*, **9**, 676, doi: 10.3390/antiox9080676.
24. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2021) MEK1/2-ERK pathway alterations as a therapeutic target in sporadic Alzheimer's disease: a study in senescence-accelerated OXYS rats, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1058, doi: 10.3390/antiox10071058.
25. Saprunova, V. B., Lelekova, M. A., Kolosova, N. G., and Bakeeva, L. E. (2012) SkQ1 slows development of age-dependent destructive processes in retina and vascular layer of eyes of Wistar and OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 648-658, doi: 10.1134/S0006297912060120.
26. Markovets, A. M., Saprunova, V. B., Zhdankina, A. A., Fursova, A. Zh., Bakeeva, L. E., and Kolosova, N. G. (2011) Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats, *Aging*, **3**, 44-54, doi: 10.18632/aging.100243.
27. Tegelina, D. V., Kozhevnikova, O. S., Bayborodin, S. I., and Kolosova, N. G. (2017) Contributions of age-related alterations of the retinal pigment epithelium and of glia to the AMD-like pathology in OXYS rats, *Sci. Rep.*, **7**, 41533, doi: 10.1038/srep41533.
28. Cano, M., Guerrero-Castilla, A., Nabavi, S. M., Ayala, A., and Argüelles, S. (2019) Targeting pro-senescence mitogen activated protein kinase (Mapk) enzymes with bioactive natural compounds, *Food Chem. Toxicol.*, **2**, 110544, doi: 10.1016/j.fct.2019.05.052.
29. Kolosova, N. G., Muraleva, N. A., Zhdankina, A. A., Stefanova, N. A., Fursova, A. Z., and Blagosklonny, M. V. (2012) Prevention of age-related macular degeneration-like retinopathy by rapamycin in rats, *Am. J. Pathol.*, **181**, 472-477, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.04.018.
30. Rentsendorj, A., Sheyn, J., Fuchs, D. T., Daley, D., Salumbides, B. C., et al. (2018) A novel role for osteopontin in macrophage-mediated amyloid-β clearance in Alzheimer's models, *Brain Behav. Immun.*, **67**, 163-180, doi: 10.1016/j.bbi.2017.08.019.
31. Xu, J., Pfarr, N., Endris, V., Mai, E. K., Hanafiah, N. H., et al. (2017) Molecular signaling in multiple myeloma: association of RAS/RAF mutations and MEK/ERK pathway activation, *Oncogenesis*, **6**, e337, doi: 10.1038/oncsis.2017.36.
32. Devyatkin, V. A., Redina, O. E., Kolosova, N. G., and Muraleva, N. A. (2020) Single-nucleotide polymorphisms associated with the senescence-accelerated phenotype of OXYS rats: a focus on Alzheimer's disease-like and age-related-macular-degeneration-like pathologies, *J. Alzheimer's Dis.*, **73**, 1167-1183, doi: 10.3233/JAD-190956.
33. Maksimiuk, M., Sobiborowicz, A., Tuzimek, A., Deptała, A., Czerw, A., et al. (2020) αB-crystallin as a promising target in pathological conditions – A review, *Ann. Agric. Environ. Med.*, **27**, 326-334, doi: 10.26444/aaem/111759.

34. Kannan, R., Sreekumar, P. G., and Hinton, D. R. (2016) Alpha crystallins in the retinal pigment epithelium and implications for the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 258-268, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.05.016.
35. Muraleva, N. A., Kozhevnikova, O. S., Zhdankina, A. A., Stefanova, N. A., Karamysheva, T. V., et al. (2014) The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 restores α B-crystallin expression and protects against AMD-like retinopathy in OXYS rats, *Cell Cycle*, **13**, 3499-3505, doi: 10.4161/15384101.2014.958393.
36. Dou, G., Sreekumar, P. G., Spee, C., He, S., Ryan, S. J., et al. (2012) Deficiency of α B crystallin augments ER stress-induced apoptosis by enhancing mitochondrial dysfunction, *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 1111-1122, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.042.
37. Yaung, J., Jin, M., Barron, E., Spee, C., Wawrousek, E. F., et al. (2007) α -Crystallin distribution in retinal pigment epithelium and effect of gene knockouts on sensitivity to oxidative stress, *Mol. Vis.*, **13**, 566-577.
38. Zhou, P., Kannan, R., Spee, C., Sreekumar, P. G., Dou, G., and Hinton, D. R. (2014) Protection of retina by α B crystallin in sodium iodate induced retinal degeneration, *PLoS One*, **9**, e98275, doi: 10.1371/journal.pone.0098275.
39. Sreekumar, P. G., Li, Z., Wang, W., Spee, C., Hinton, D. R., Kannan, R., MacKay, J. A. (2018) Intra-vitreous α B crystallin fused to elastin-like polypeptide provides neuroprotection in a mouse model of age-related macular degeneration, *J. Control. Rel.*, **283**, 94-104, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.05.014.
40. Sreekumar, P. G., Reddy, S. T., Hinton, D. R., and Kannan, R. (2022) Mechanisms of RPE senescence and potential role of α B crystallin peptide as a senolytic agent in experimental AMD, *Exp. Eye Res.*, **215**, 108918, doi: 10.1016/j.exer.2021.108918.
41. Kato, K., Inaguma, Y., Ito, H., Iida, K., Iwamoto, I., et al. (2001) Ser-59 is the major phosphorylation site in α B-crystallin accumulated in the brains of patients with Alexander's disease, *J. Neurochem.*, **76**, 730-736, doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00038.x.
42. Ashok, A., Singh, N., Chaudhary, S., Bellamkonda, V., Kritikos, A. E., et al. (2020) Retinal degeneration and Alzheimer's disease: an evolving link, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7290, doi: 10.3390/ijms21197290.
43. Zhu, X., Castellani, R. J., Takeda, A., Nunomura, A., Atwood, C. S., et al. (2001) Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer's disease: the 'two hit' hypothesis, *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 39-46, doi: 10.1016/s0047-6374(01)00342-6.
44. Faucher, P., Mons, N., Micheau, J., Louis, C., and Beracochea, D. J. (2016) Hippocampal injections of oligomeric amyloid β -peptide (1-42) induce selective working memory deficits and long-lasting alterations of ERK signaling pathway, *Front. Aging Neurosci.*, **7**, 245, doi: 10.3389/fnagi.2015.00245.

ALTERATION OF THE MEK1/2–ERK1/2 SIGNALING PATHWAY IN THE RETINA WITH AGE AND WITH THE DEVELOPMENT OF AMD-LIKE RETINOPATHY

N. A. Muraleva* and N. G. Kolosova

*Institute of Cytology and Genetics (ICG), Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: myrалева@bionet.nsc.ru*

Age-related macular degeneration (AMD) is a complex neurodegenerative disease that is a major cause of irreversible visual impairment in developed countries. Although age is the greatest risk factor for AMD, molecular explanations of this clinical observation are not known. Growing evidence shows that dysregulation of MAPK pathways contributes to aging and neurodegenerative diseases; however, information about the upregulation of MAPKs in this context is still controversial. Among these kinases, ERK1 and ERK2 participate in the maintenance of proteostasis through the regulation of protein aggregation induced by endoplasmic-reticulum stress and other stress-mediated responses in the cell. Here, to assess the contribution of alterations of MEK1/2-ERK1/2 signaling-pathway activity to the development of AMD, we compared its changes with age in the retina of control (Wistar) rats and OXYS rats, which develop AMD-like retinopathy spontaneously. We showed that ERK1/2 signaling-pathway activity increases during physiological aging in the Wistar retina. The manifestation and dramatic progression of AMD-like pathology in OXYS rats co-occurred with hyperphosphorylation of ERK1/2 and MEK1/2 as key ERK1/2 signaling-pathway kinases in the retina. Besides, progression of the retinopathy was accompanied by ERK1/2-dependent tau protein hyperphosphorylation and enhancement of ERK1/2-dependent phosphorylation of CryaB at Ser45 in the retina.

Keywords: aging, age-related macular degeneration, ERK1/2 signaling pathway, α B-crystallin, tau protein, phosphorylation, OXYS rat

ЭВОЛЮЦИЯ СИСТЕМ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ, СОДЕРЖАЩИХ ОДНУ ЭНДОНУКЛЕАЗУ РЕСТРИКЦИИ И ДВЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ

© 2023 А.С. Фокина¹, А.С. Карягина^{2,3,4}, И.С. Русинов³, Д.М. Мошенский^{1,3},
С.А. Спирин^{3,5,6*}, А.В. Алексеевский^{1,3,6}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: sas@belozersky.msu.ru

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
127550 Москва, Россия

⁵ НИУ «Высшая школа экономики», 109028 Москва, Россия

⁶ ФГУ ФНЦ НИИСИ РАН, 117218 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.11.2022

После доработки 15.01.2023

Принята к публикации 15.01.2023

Некоторые системы рестрикции-модификации содержат две ДНК-метилтрансферазы. В настоящей работе проведена классификация таких систем по присутствующим в белках систем каталитическим доменам, характерным для эндонуклеаз рестрикции и ДНК-метилтрансфераз. Подробно исследована эволюция белков из систем рестрикции-модификации, содержащих эндонуклеазный домен семейства NOV_C и две ДНК-метилтрансферазы, обе с доменами семейства DNA_methylase. Выяснено, что ДНК-метилтрансферазы таких систем разделяются на филогенетическом дереве на две клады так, что ферменты одной системы оказываются в разных кладах, что свидетельствует о независимой эволюции двух метилтрансфераз. Обнаружены свидетельства множественных межвидовых горизонтальных переносов систем в целом, а также случаи переноса генов между системами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: система рестрикции-модификации, эндонуклеаза рестрикции, ДНК-метилтрансфераза, эволюционные домены, эволюция белков, горизонтальный перенос генов.

DOI: 10.31857/S0320972523020082, EDN: QGVWOU

ВВЕДЕНИЕ

Системы рестрикции-модификации (системы Р-М) защищают бактерии и археи от внедрения чужеродной ДНК, прежде всего от ДНК-содержащих бактериофагов [1]. Системы Р-М подразделяются на несколько типов [2], из которых самым хорошо изученным является тип II. Как правило, такие системы содержат белки с двумя ферментативными активностями: эндонуклеазу рестрикции (ЭР), узнающую специфическую последовательность ДНК и гидролизующую её, и ДНК-метилтрансферазу

(МТазу), модифицирующую хозяйскую ДНК в пределах узнаваемой последовательности, что препятствует её гидролизу ЭР. Модификация ДНК представляет собой метилирование цитозина с образованием С5-метилцитозина либо N4-метилцитозина, или же метилирование аденина с образованием N6-метиладенина.

Среди систем Р-М типа II можно выделить содержащие одну ЭР и две различных МТазы. Большинство таких систем относятся к подтипу IIA [3], т.е. их узнаваемая последовательность асимметрична (не является палиндромом), многие из них одновременно относятся

Принятые сокращения: МТаза — ДНК-метилтрансфераза; системы Р-М — системы рестрикции-модификации; ЭР — эндонуклеаза рестрикции.

* Адресат для корреспонденции.

к подтипу IIS, то есть гидролиз ДНК происходит вне узнаваемой последовательности [4]. Две отдельные МТазы обеспечивают метилирование обеих цепей асимметричных последовательностей, что предотвращает образование немодифицированных сайтов после репликации [5, 6]. Две МТазы могут метилировать различные типы оснований в различных цепях [5], как это было показано для систем MboII [7] и MnlII [8] — одна МТаз метилирует аденин в одной цепи, другая — цитозин в другой. В системе BfiI обе МТазы модифицируют цитозин с образованием C5-метилцитозина, но метилируемые цитозины расположены на разных цепях ДНК [9]; подобную же активность проявляют МТазы системы HgaI [10]. Такого рода системы могут представлять интерес с точки зрения их эволюции, а именно изучения связи между эволюционными путями двух МТаз в различных системах и роли двух отдельных МТаз в жизни бактериальной клетки и в ходе эволюции.

Целью работы было исследование эволюции систем Р-М, содержащих две МТазы. Была проведена классификация всех таких систем на основе семейств эндонуклеазных и метилтрансферазных доменов согласно банку Pfam [11]. Для подробного анализа мы выбрали один сравнительно небольшой класс таких систем. Для него мы показали, что две МТазы систем этого класса эволюционируют независимо друг от друга, и исследовали возможные горизонтальные переносы генов (ГПГ) компонентов системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор из REBASE систем Р-М, включающих одну эндонуклеазу рестрикции и две МТазы. Из всех 499 311 белков REBASE [12] (версия 206 от 02.06.2022) были отобраны 2002 системы, включающие одну ЭР и две МТазы. Доменная архитектура всех белков была определена с использованием HMM-профилей из базы данных Pfam [11]. В дальнейшем «классом системы» мы называем список каталитических доменов ЭР и МТаз, найденных в последовательностях белков системы. Каталитическими мы считали 99 Pfam-доменов, встречающихся в ЭР, и 15 доменов, характерных для МТаз, отобранных на основании экспертной оценки, полный список см.: https://github.com/belozersky321/NOV_C-DNA_methylaseX2/blob/main/Domains.xlsx. Было обнаружено семь классов систем, удовлетворяющих следующим условиям: (1) класс содержит не менее

15 систем с подтверждённым составом из ЭР и двух МТаз (возможно наличие других белков в системе), (2) обе МТазы содержат каталитические домены из одного и того же семейства согласно Pfam. Эти семь классов представлены в таблице, название класса составлено из идентификаторов (согласно Pfam) семейств каталитических доменов ЭР и МТаз.

На рисунках для систем Р-М, ЭР и МТаз используются названия из REBASE. Многие белки в REBASE (в том числе все, которые исследовались в нашей работе) содержат в названии суффикс «Р», что означает, что они были предсказаны по последовательности генома и их функциональность не доказана экспериментально. Для части систем REBASE содержит информацию о сайтах узнавания, в том числе о предсказанных сайтах для некоторых из предсказанных белков. В ряде случаев указаны также места гидролиза и метилирования ДНК и тип модификации азотистого основания.

Поиск систем Р-М класса NOV_C/DNA_methylase×2, белки которых в REBASE не объединены в систему. В REBASE были найдены системы, состоящие из одной ЭР, содержащей домен NOV_C, и одной МТазы с доменом DNA_methylase. Для тех из таких систем, у которых ген ЭР непосредственно соседствовал в геноме с геном ещё одной МТазы, были найдены эволюционные домены этой МТазы. В случае, если среди этих доменов присутствовал домен семейства DNA_methylase, мы считали такую МТазу входящей в состав системы указанного класса и ошибочно не приписанной к системе в REBASE.

Филогенетические деревья строились в сервисе NGphylogeny.fr [13] с использованием выравнивания программой Muscle и филогенетической реконструкции программой FastME со 100 бутстреп-репликами. Изображения деревьев редактировались и укоренялись в среднюю точку в iTOL [14]. Дерево систем строилось как консенсусное дерево ЭР и 3'-МТаз (см. в разделе «Результаты и обсуждение»), к которому были добавлены положения тех 5'-МТаз, чьё положение на дереве отличалось от положения соответствующих 3'-МТаз.

Кластеризация систем. Последовательности белков систем класса NOV_C/DNA_methylase×2 кластеризовались программой CD-HIT [15] на уровне 98% идентичности при 100%-ном покрытии более короткой последовательности. Системы объединялись в один кластер, если кластеризовались все три белка, то есть в одном кластере оказывались ЭР этих систем, также в одном кластере — по одной МТазе из каждой системы, и ещё в одном кластере — по другой МТазе из каждой системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Классы систем Р-М с двумя метилтрансферазами. В таблице приведены семь классов систем, отобранных по указанным в разделе «Материалы и методы» параметрам. Все они содержат системы, включающие одну ЭР, две МТазы и, возможно, другие белки.

Системы Р-М этих классов содержат МТазы четырёх разных семейств (Pfam ID: N6_Mtase, MethyltransfD12, DNA_methylase, N6_N4_Mtase) и ЭР шести семейств (HSDR_N, RE_AlwI, NOV_C, HNH_2, RE_NgoFVII, RE_EcoO109I). Самый распространённый класс HSDR_N/N6_Mtase×2 содержит 1306 систем.

Для дальнейшего анализа был выбран класс NOV_C/DNA_methylase×2. Этот класс был выбран, так как количество систем в нём достаточно, чтобы проследить эволюционные закономерности, но не так велико, чтобы существенно затруднить визуальный анализ филогенетических деревьев и выравниваний. В дальнейшем планируется исследование остальных классов с использованием подходов, отработанных на классе NOV_C/DNA_methylase×2. Для исследования двух наиболее многочисленных классов потребуются автоматизация филогенетического анализа и выявления горизонтальных переносов, что также входит в планы авторов.

Белки систем класса NOV_C/DNA_methylase×2. Этот класс содержит 57 систем из REBASE. Из дальнейшего рассмотрения мы исключили систему, в которой ген ЭР оказался разделён транспозоном на две части (соответствующие белки в REBASE обозначены как Spn11901ORF903AP и Spn11901ORF903BP). К оставшимся 56 системам мы добавили ещё девять систем, для которых в REBASE была указана только одна МТаза, и включили в со-

став этих систем закодированную рядом «одиночную» МТазу (см. «Материалы и методы»), всего получилось 65 систем. Полученный список был сокращён за счёт оставления по одной системе из каждого 98%-ного кластера по всем белкам (см. «Материалы и методы»); таких кластеров оказалось 38, и вся дальнейшая работа проводилась с получившимся списком из 38 систем. Все кластеры включают системы из близких видов, за одним исключением, из одного рода, поэтому ограничение на 38 систем не должно отразиться на эволюционных выводах. Список систем см.: https://github.com/belozersky321/NOV_C-DNA_methylaseX2/blob/main/Systems.xlsx. В колонке «System in REBASE» на первом листе этой книги значением «ИСТИНА» отмечены системы, включающие, согласно REBASE, две МТазы, а значением «ЛОЖЬ» — девять систем, в чей состав мы включили МТазы, аннотированные в REBASE как одиночные.

ЭР систем этого класса характеризуются наличием домена из семейства, имеющего в банке Pfam идентификатор NOV_C, accession PF13020, название «Protein NO VEIN C-terminal». Ранее этот домен имел в Pfam идентификатор DUF3883 и с этим идентификатором упоминался в литературе [16]; многие ЭР систем нашего класса описаны в REBASE и GenBank как «DUF3883 domain-containing proteins». В последовательностях всех ЭР исследуемого класса диагностируется также домен BpuJI_N, который, согласно статье Sukackaite et al. [17], отвечает за распознавание нуклеотидной последовательности. Домены других семейств Pfam в последовательностях этих ЭР не находятся: все ЭР систем этого класса содержат два эволюционных домена, BpuJI_N в N-концевой части и NOV_C — в C-концевой части белка.

Классы систем Р-М из REBASE, включающие одну ЭР и две МТазы

Класс	Число систем Р-М	Тип метилирования
HSDR_N/N6_Mtase×2	1306	N6-аденин
RE_AlwI/MethyltransfD12×2	494	N6-аденин
NOV_C/DNA_methylase×2	57	C5-цитозин
HNH_2/DNA_methylase×2	42	C5-цитозин
RE_AlwI/N6_N4_Mtase×2	30	N4-цитозин, N6-аденин
RE_NgoFVII/DNA_methylase×2	28	C5-цитозин
RE_EcoO109I/DNA_methylase×2	17	C5-цитозин

Несмотря на то что в описании домена NOV_C в Pfam указано, что его функция неизвестна, в случае ЭР из систем Р-М домен NOV_C, несомненно, является каталитическим доменом с эндонуклеазной активностью. Это следует из сравнения последовательностей ЭР с этим доменом с последовательностью ЭР BpuJI. Для BpuJI в работе Sukackaite et al. [18] экспериментально показана эндонуклеазная активность и определены остатки активного сайта: D348, E367, K369, входящие в домен NOV_C. В последовательности ЭР BpuJI диагностируются домены BpuJI_N и NOV_C, однако в REBASE для неё не указаны МТазы, входящие с ней в одну систему, поэтому нельзя достоверно сказать, относится ли соответствующая система Р-М к нашему классу. Нами было построено совместное выравнивание последовательностей 38 ЭР из систем Р-М класса NOV_C/DNA_methylase×2 и ЭР BpuJI. Три остатка активного центра ЭР BpuJI оказались в абсолютно консервативных колонках выравнивания, что свидетельствует в пользу того, что у всех этих ЭР сохранена эндонуклеазная активность.

МТазы данного класса содержат домен DNA_methylase (PF00145, C-5 cytosine-specific DNA_methylase). Этот домен характерен для всех МТаз, метилирующих цитозин с образованием C5-метилцитозина. Других достоверных находок доменов Pfam в МТазы систем этого класса нет, а домен DNA_methylase, за несколькими исключениями, занимает практически весь белок. Таким образом, подавляющее большинство МТаз данного класса, по всей видимости, содержат только один домен.

Семь систем этого класса содержат С-белки — факторы транскрипции. В этих системах встречаются С-белки с находками профилей семейств Pfam HTH_19, HTH_26 и HTH_3. В большинстве найденных С-белков с достаточно высоким весом находятся все три профиля. В N-концевой части последовательности одной из МТаз одной из систем этого класса, а именно M2.Gva7778BORF1255P, найден домен HTH_17, также характерный для факторов транскрипции, однако вес этой находки ниже порога достоверности. Возможно, эта МТаз имеет дополнительную функцию регуляции транскрипции белков системы. Три системы содержат никазы с каталитическим доменом Vsr.

Для восьми систем класса NOV_C/DNA_methylase×2 в REBASE хотя бы для одного белка системы указана последовательность (сайт) узнавания CCCGT, для 13 других — CCCGC, для остальных сайт узнавания в REBASE не

указан. При этом для ЭР Bal380ORF12195P сайт CCCGT, указанный в REBASE, предсказывается с высокой достоверностью благодаря почти 100%-ной идентичности её последовательности с ЭР BpuJI, для которой такой сайт был подтверждён экспериментально [18]. ЭР BpuJI гидролизует ДНК вне сайта узнавания — непосредственно после, через один или через два нуклеотида после узнаваемой последовательности. В систему FauTH167ORF820 входит МТазы M2.FauTH167ORF820P — близкий гомолог МТазы M.FauI, сайт которой, CCCGC, тоже был определён экспериментально в работе Degtyarev et al. [19]. Тем не менее в REBASE для белков системы FauTH167ORF820 не указан сайт узнавания.

По данным REBASE, среди МТаз с сайтом узнавания CCCGT позиции метилируемых цитозинов в сайтах узнавания экспериментально определены только для метилтрансфераз системы BscGI. Эта система, подобно исследованному нами, содержит две МТазы: M1.BscGI, которая метилирует второй с 5'-конца цитозин в последовательности CCCGT, и M2.BscGI, метилирующую единственный цитозин в комплементарной последовательности ACGGG. К сожалению, данные о последовательностях генов и белков системы BscGI в REBASE и других банках данных отсутствуют, и это не позволяет проверить принадлежность этой системы исследуемому классу. Относительно специфичности метилтрансфераз с сайтом CCCGC экспериментальных данных в REBASE не представлено. Имеются лишь данные об ЭР Bme585I, BstFZ438I, FauI и SmaI, имеющих сайт узнавания CCCGC, при этом гидролиз одной цепи ДНК происходит через четыре нуклеотида, а другой цепи — через шесть нуклеотидов от узнаваемой последовательности («CCCGC (4/6)» в стандартных для систем Р-М обозначениях). Аминокислотные последовательности этих ЭР в REBASE также не представлены. Для ЭР FauI и SmaI представлены данные о чувствительности к метилированию, в частности, о защите от гидролиза при метилировании CG-специфичной метилтрансферазой SssI.

Филогения эндонуклеаз рестрикции. На рис. 1 представлено филогенетическое дерево 38 ЭР из систем класса NOV_C/DNA_methylase×2, на котором обозначены бутстреп-поддержка ветвей, узнаваемые последовательности ЭР, согласно REBASE, и принадлежность ЭР органнизмам из разных отделов, а также отмечены ЭР, входящие в состав систем с С-белком и/или никазой.

На рис. 1 обращают на себя внимание несколько фактов.

2. Четыре ЭР из систем с С-белками образуют единую кладу, включающую ещё ЭР FbaHQM9ORFGP, входящую в систему без аннотированного в REBASE С-белка. Однако

непосредственно перед генами этой системы находится ген С-белка C.FbaHQM9ORFFP, приписанный в REBASE к другой системе, в которой, кроме этого белка, нет никаких других. Можно предположить, что для этих пяти систем (все они — из бактерий отдела Bacteroidetes) важную роль играет регуляция С-белками. Три других системы с С-белками не родственны этим пяти и друг другу. Три системы, относящиеся к двум разным прикорневым кладам, содержат никазы семейства Vpr. Роль этих белков в обсуждаемых системах Р-М неясна.

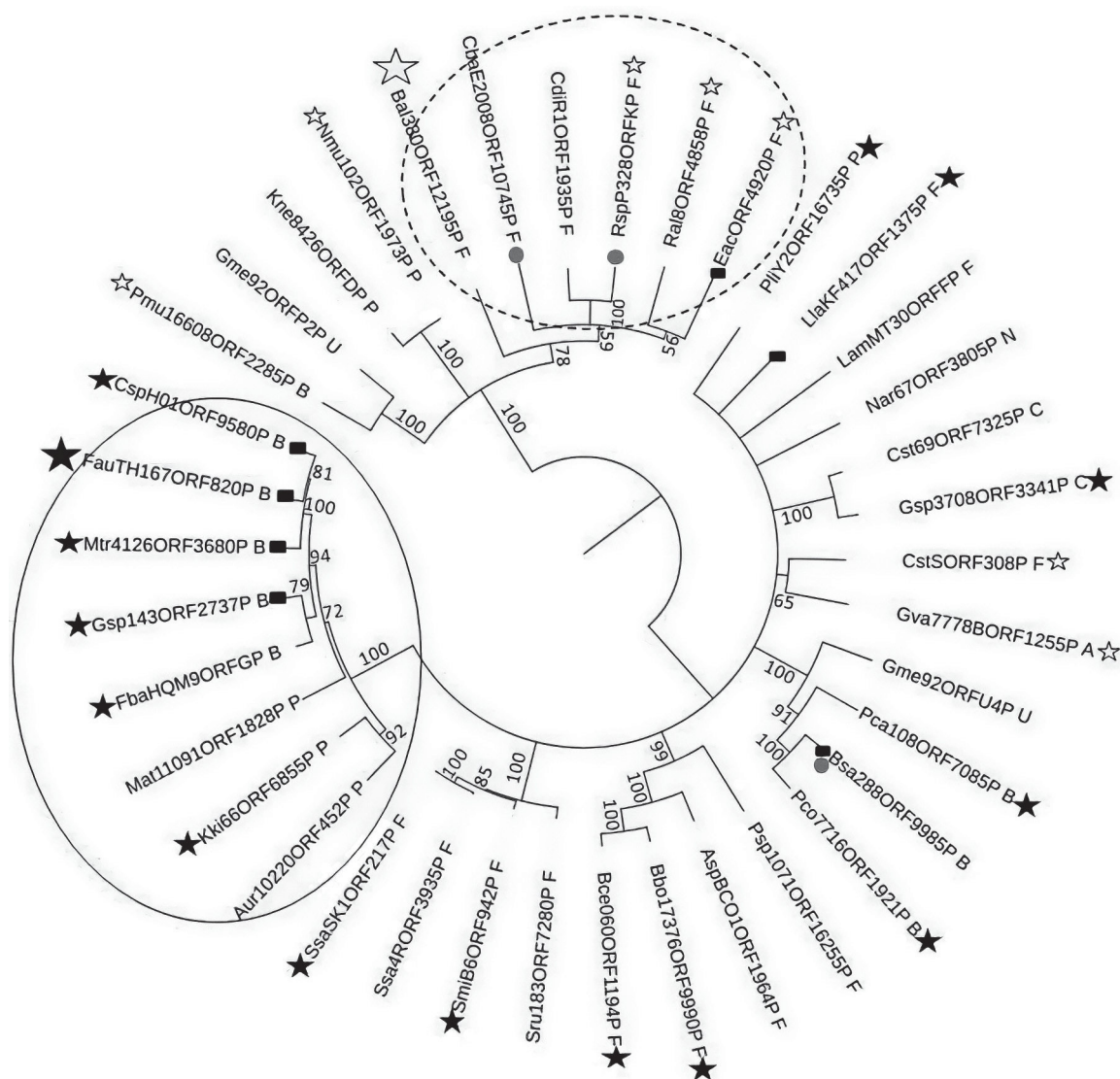


Рис. 1. Филогенетическое дерево 38 ЭР класса NOV_C/DNA_Methylase×2. Названия ферментов из систем с сайтами, указанными в REBASE, отмечены: чёрной звездой – CCCGC и контурной звездой – CCCGT. Звёзды большего размера отмечают ЭР из систем, чьи белки имеют близкие гомологи с экспериментально определёнными сайтами. Овалами обведены клады из ЭР с относительно достоверной аннотацией сайтов по гомологии, прерывистый овал соответствует сайту CCCGT, сплошной – сайту CCCGC. Белки из систем с С-белком отмечены чёрными прямоугольниками, белки из систем с никазой – серыми кружками. Буквы после названия белка соответствуют отделу, к которому принадлежит хозяин системы: F – Firmicutes, C – Cyanobacteria, P – Proteobacteria, B – Bacteroidetes, A – Actinobacteria, N – Nanoarchaeota (Archaea) и U – кишечный метабеном. Ветви, поддерживаемые менее чем половиной бутстреп-реплик, сжаты (т.е. удалены путём сжатия в точку). Числа на ветвях обозначают проценты бутстреп-реплик, поддерживающих данную ветвь.

3. ЭР из отделов Bacteroidetes, Firmicutes и Proteobacteria не группируются на дереве в одну кладу. Те клады дерева, которые содержат ЭР из близких бактерий, включают намного меньше ЭР, чем имеется бактерий той же степени родства с секвенированными геномами. Эти два обстоятельства указывают, на наш взгляд, на особенности эволюции и экологии систем данного класса, а именно: такие системы активно участвуют в ГПП, но в то же время легко утрачиваются их хозяевами.

Филогения МТаз. На рис. 2 изображено филогенетическое дерево МТаз класса NOV_C/DNA_Methylase×2. МТазы из 38 систем формируют две клады со 100%-ной бутстреп-поддержкой их разделения, причём МТазы одной системы всегда принадлежат разным клadam. Это означает, что две МТазы систем данного класса эволюционировали независимо. Непалиндромность сайтов узнавания систем требует различной функциональной роли двух МТаз (вероятно, узнавая один и тот же сайт, две МТазы модифицируют основания разных цепей ДНК), что объясняет такую особенность эволюции. Гены белков всех систем класса NOV_C/DNA_Methylase×2 всегда расположены на одной цепи ДНК в порядке: 5'-ген

МТазы – ген ЭР – ген МТазы-3'. При этом все МТазы, чьи гены расположены до гена соответствующей ЭР, относятся к одной клade дерева, а все МТазы, чьи гены расположены после гена ЭР – к другой. На рис. 2 эти клады обозначены, соответственно, как 5'М и 3'М. Далее мы называем МТазы первой клады 5'-МТазами, а МТазы второй – 3'-МТазами. Префиксы «М1» и «М2» в названиях МТаз не связаны с разделением на клады и отражают порядок расположения генов МТаз в записи банка последовательностей, который может отличаться от порядка в направлении транскрипции, что приводит к тому, что белки с разными префиксами оказываются в одной клade.

Топология клад 3'-МТаз практически (с точностью до небольших различий, которые, вероятнее всего, вызваны ошибками филогенетической реконструкции) совпадает с топологией дерева ЭР (см. рис. 1). В то же время в клade 5'-МТаз четыре белка, обведённые рамками на рис. 2, сближены с белками других систем, чем на дереве ЭР и в клade 3'-МТаз. Из этого можно сделать вывод, что в эволюционной истории систем нашего класса были события переноса белков в другую систему.

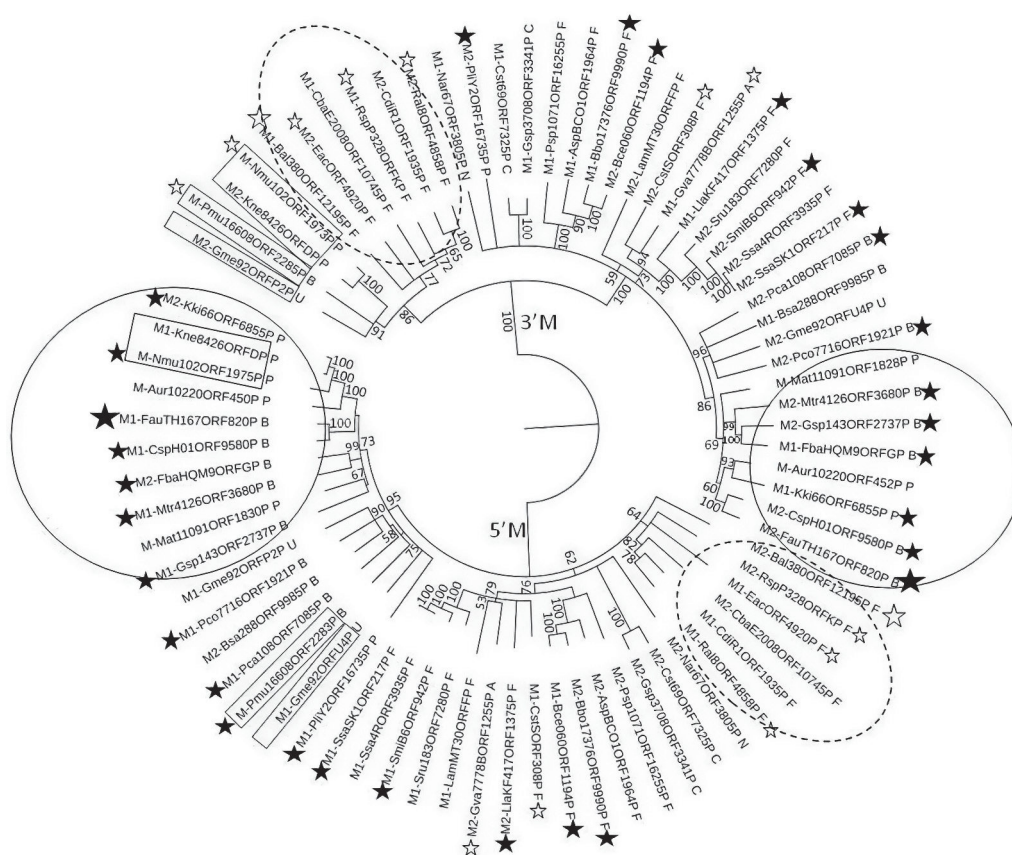


Рис. 2. Филогенетическое дерево МТаз класса NOV_C/DNA_Methylase×2. Три группы МТаз, чьё положение различается в клдах 5'М и 3'М, обведены рамками. Другие обозначения как на рис. 1

Реконструкция филогении систем Р-М.

Чтобы лучше понять эволюцию систем данного класса, мы реконструировали общее филогенетическое дерево систем (рис. 3), основываясь на деревьях ЭР, 5'- и 3'-МТаз. На этом дереве ветви, различающиеся в трёх деревьях предположительно вследствие ошибок реконструкции, сжаты, а случаи предположительно обмена генами между системами отмечены различным положением разных ферментов и стрелками.

Все переносы генов между системами затрагивают системы, ЭР и 3'-МТазы которых на соответствующих деревьях находятся в одной кладе (верхние четыре системы на рис. 3). Эта клада является сестринской по отношению к кладе с относительно достоверно предсказанным сайтом CCCGT (обведена пунктирным овалом на рис. 1, 2 и 3, ЭР Bal380ORF12195P из этой клады имеет почти 100%-ную идентичность с экспериментально охарактеризованной ЭР BpuJI). При этом 5'-МТазы этих систем

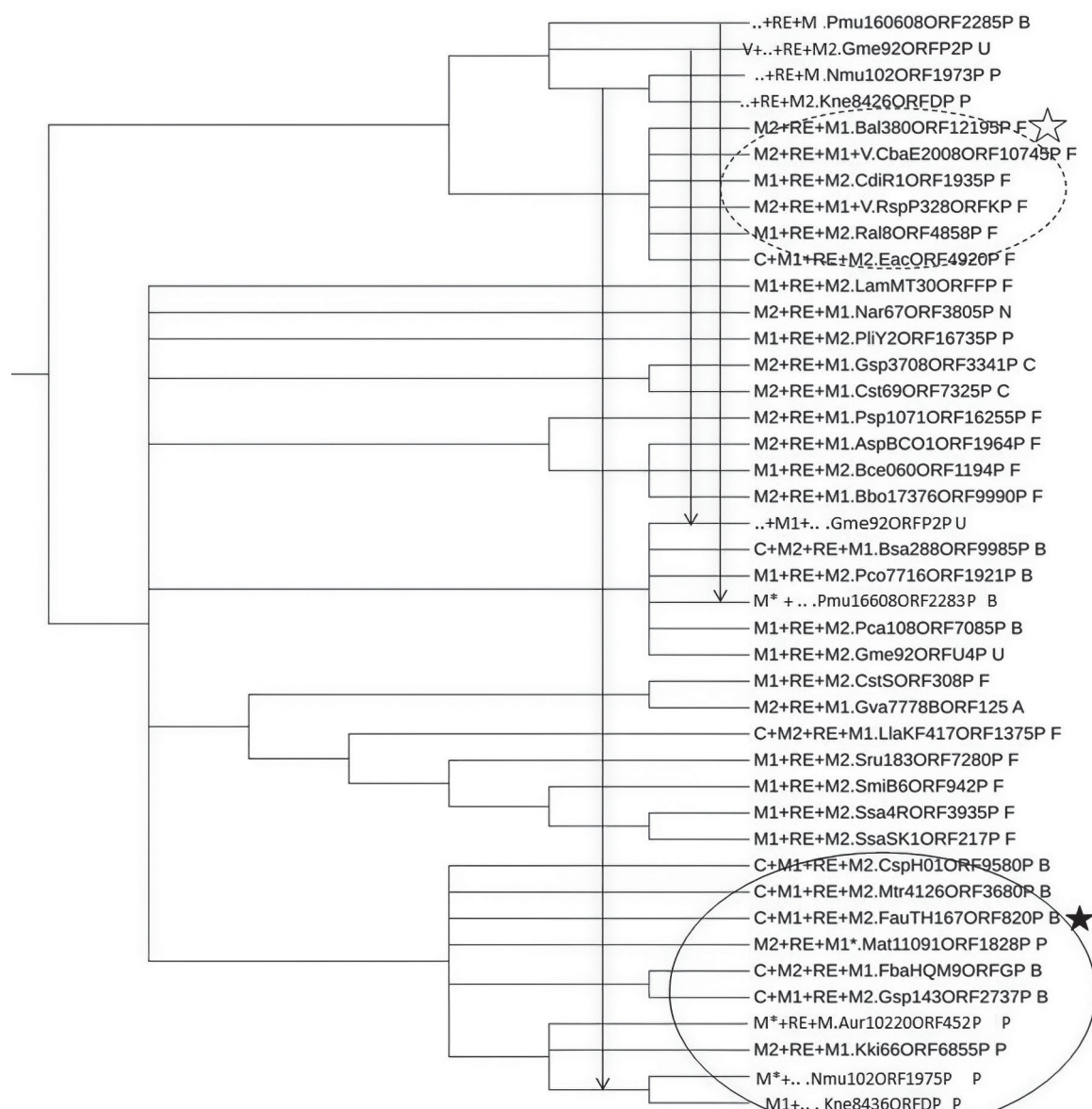


Рис. 3. Филогенетическое дерево систем Р-М класса NOV_C/DNA_Methylase×2. Перед названием каждой системы приведены обозначения белков системы: М, М1 и М2 – для МТаз, чьи названия в REBASE имеют соответствующие префиксы; RE – для ЭР; С – для С-белков, V – для никак. Порядок обозначений белков каждой системы соответствует порядку генов систем на кодирующей цепи ДНК, то есть 5'-МТазы – слева, 3'-МТазы – справа. Звёздочка (*) после обозначения белка указывает, что в REBASE этот белок не приписан к системе. Стрелки обозначают предполагаемые события ГПГ. Остальные обозначения как на рис. 1 и 2

оказываются ближе к 5'-МТазам систем с предсказанным сайтом CCCGC. Это можно объяснить тем, что ЭР и 3'-МТазы этих четырёх систем объединились в одну систему с 5'-МТазой относительно далёких систем, например, благодаря повышенной способности участка ДНК, кодирующего ЭР и 3'-МТазу, к горизонтальным переносам. Число событий таких переносов невозможно точно установить по имеющимся данным, но нам представляются наиболее вероятными три события (обозначены стрелками на рис. 3), а именно: переносы белков системы Pmu16608ORF2285P, независимо — системы Gme92ORFP2P и независимо — общего предка систем Nmu102ORF1973P и Kne8426ORFDP. Возможен также сценарий с двумя событиями, включающий перенос белков общего предка систем Pmu16608ORF2285P и Gme92ORFP2P, или же с четырьмя независимыми событиями. Неясным остаётся различие сайтов узнавания между ближайшими родственниками ЭР и 3'-МТаз, с одной стороны, и 5'-МТаз — с другой, из систем, участвующих в переносе. Можно предложить два объяснения этому. Во-первых, не исключено, что все системы нашего класса, кроме обведённых на рис. 3 пунктирным овалом, имеют специфичность CCCGC. Во-вторых, можно предположить более широкую специфичность (например, CCCGY) для всех или большинства 5'-МТаз класса. Это предположение не противоречит экспериментально установленной специфичности CCCGC для МТазы FauI, родственной 3'-МТазе M2.FauTH167ORF820P.

Роль горизонтальных переносов генов в эволюции систем данного класса. Анализ филогенетических деревьев белков, составляющих системы, вместе с рассмотрением таксономии бактерий — их хозяев, показывает, что в эволюции систем данного класса происходили события двух родов.

Во-первых, это многочисленные горизонтальные переносы системы в целом. Например, системы из бактерий отдела Firmicutes представлены на дереве тремя неродственными кладами (включающими 4, 5 и 6 систем) и ещё двумя изолированными системами. Такое возможно только при условии активного горизонтального переноса систем в целом, сопряжённого с быстрой их утратой. Это подтверждается и другими наблюдениями. Так, в группе шести систем из отдела Firmicutes, обведённой пунктирной линией на рис. 3, хозяева этих систем относятся к трём разным семействам: Bacillaceae, Peptostreptococcaceae, Oscillospiraceae (см. https://github.com/belozersky321/NOV_C-DNA_methylaseX2/blob/main/Systems.xlsx).

Представляется маловероятным, что эти системы унаследованы от общего предка, учитывая отсутствие гомологичных систем в подавляющем большинстве бактерий. Следовательно, системы, скорее всего, получены в результате по крайней мере трёх событий горизонтального переноса.

Во-вторых, мы наблюдаем несколько (от двух до четырёх, см. предыдущий подраздел) событий приобретения системой белков из другой системы (вертикальные стрелки на рис. 3). ЭР и 3'-МТазы четырёх систем, демонстрирующих признаки таких событий, образуют на дереве отдельную кладу (верхние четыре системы на рис. 3). Невозможно установить, представляли ли собой эти события горизонтальный перенос гена 5'-МТазы или же совместный горизонтальный перенос пары генов ЭР и 3'-МТазы. Можно отметить, что хозяева всех этих систем относятся к микробиому человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе выявлены классы систем Р-М, содержащие одну ЭР и две МТазы; классы выделяются в соответствии с каталитическими доменами, присутствующими в ЭР и МТазе. Подробно исследованы системы класса NOV_C/DNA_Methylase×2. МТазы этого класса формируют на филогенетическом дереве две прикорневые клады, при этом ферменты одной системы попадают в разные клады, что говорит об их независимом происхождении. Скорее всего, это отражает разную функциональную роль двух МТаз в системах, а именно метилирование разных цепей ДНК в асимметричном сайте.

Системы этого класса, общим числом 65, присутствуют в геномах бактерий пяти отделов и одной археи, что говорит о большой роли ГПГ и потери генов в эволюции этих систем. Обнаружены свидетельства переноса генов между системами с предположительно различной специфичностью узнавания.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00135).

Вклад авторов. А.В. Алексеевский — концепция и руководство работой; А.С. Фокина — компьютерный анализ данных; И.С. Русинов — подготовка данных по доменам в белках REBASE; Д.М. Мошенский — помощь в поиске генов белков; А.С. Фокина, С.А. Спирин, А.С. Карягина — обсуждение

результатов, написание и редактирование текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Williams, R. J. (2003) Restriction endonucleases: Classification, properties, and applications, *Mol. Biotechnol.*, **23**, 225-244, doi: 10.1385/mb:23:3:225.
- Roberts, R. J. (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1805-1812, doi: 10.1093/nar/gkg274.
- Pingoud, A., Wilson, G. G., and Wende, W. (2014) Type II restriction endonucleases – a historical perspective and more, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7489-7527, doi: 10.1093/nar/gku447.
- Szybalski, W., Kim, S. C., Hasan, N., and Podhajski, A. J. (1991) Class-IIS restriction enzymes – a review, *Gene*, **100**, 13-26, doi: 10.1016/0378-1119(91)90345-c.
- Madhusoodanan, U. K., and Rao, D. N. (2010) Diversity of DNA methyltransferases that recognize asymmetric target sequences, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **45**, 125-145, doi: 10.3109/10409231003628007.
- Vasu, K., and Nagaraja, V. (2013) Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **77**, 53-72, doi: 10.1128/mmbr.00044-12.
- Furmanek-Blaszk, B., Boratynski, R., Zolcinska, N., and Sektas, M. (2009) M1.MboII and M2.MboII type IIS methyltransferases: Different specificities, the same target, *Microbiology*, **155**, 1111-1121, doi: 10.1099/mic.0.025023-0.
- Kriukiene, E., Lubiene, J., Lagunavicius, A., and Lubys, A. (2005) MnlI – The member of H-N-H subtype of Type IIS restriction endonucleases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1751**, 194-204, doi: 10.1016/j.bbapap.2005.06.006.
- Sapranaukas, R., Sasnauskas, G., Lagunavicius, A., Vilkaitis, G., Lubys, A., and Siksnys, V. (2000) Novel subtype of type IIS restriction enzymes, *J. Biol. Chem.*, **275**, 30878-30885, doi: 10.1074/jbc.m003350200.
- Sugisaki, H., Kita, K., and Takanami, M. (1989) The FokI restriction-modification system, *J. Biol. Chem.*, **264**, 5757-5761, doi: 10.1016/s0021-9258(18)83614-6.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., and Bateman, A. (2020) Pfam: The protein families database in 2021, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D412-D419, doi: 10.1093/nar/gkaa913.
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. (2014) REBASE – a database for DNA restriction and modification: Enzymes, genes and genomes, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D298-D299, doi: 10.1093/nar/gku1046.
- Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppl-Azeroual, O., Mareuil, F., Coen-Boulakia, S., and Gascuel, O. (2019) NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists, *Nucleic Acids Research*, **47**, W260-W265, doi: 10.1093/nar/gkz303.
- Letunic, I., and Bork, P. (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Nucleic Acids Res.*, **49**, W293-W296, doi: 10.1093/nar/gkab301.
- Li, W., and Godzik, A. (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences, *Bioinformatics*, **22**, 1658-1659, doi: 10.1093/bioinformatics/btl158.
- Steczkiwicz, K., Muszewska, A., Knizewski, L., Rychlewski, L., and Ginalski, K. (2012) Sequence, structure and functional diversity of PD-(D/E)XK phosphodiesterase superfamily, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 7016-7045, doi: 10.1093/nar/gks382.
- Sukackaite, R., Grazulis, S., Bochtler, M., and Siksnys, V. (2008) The recognition domain of the BpuJI restriction endonuclease in complex with cognate DNA at 1.3-Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **378**, 1084-1093, doi: 10.1016/j.jmb.2008.03.041.
- Sukackaite, R., Lagunavicius, A., Stankevicius, K., Urbanke, C., Venclovas, Č., and Siksnys, V. (2007) Restriction endonuclease BpuJI specific for the 5'-CCCGT sequence is related to the archaeal Holliday junction resolvase family, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 2377-2389, doi: 10.1093/nar/gkm164.
- Degtyarev, S. K., Netesova, N. A., Chizhikov, V. E., and Abdurashitov, M. (1998) Cloning and characterization of the gene encoding M.FauI DNA methyltransferase, *Biol. Chem.*, **379**, 567-568.

EVOLUTION OF RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEMS WITH ONE RESTRICTION ENDONUCLEASE AND TWO DNA METHYLTRANSFERASES

A. S. Fokina¹, A. S. Karyagina^{2,3,4}, I. S. Rusinov³, D. M. Moshensky^{1,3},
S. A. Spirin^{3,5,6*}, and A. V. Alexeevski^{1,3,6}

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia

² N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology,
Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Moscow, 119992 Moscow, Russia; e-mail: sas@belozersky.msu.ru

⁴ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia

⁵ National Research University Higher School of Economics, 109028 Moscow, Russia

⁶ Federal Science Center System Research Institute of the Russian Academy of Sciences, 117218 Moscow, Russia

Some restriction-modification systems contain two DNA methyltransferases. In the present work, we have classified such systems according to the families of catalytic domains present in restriction endonucleases and both DNA methyltransferases. The evolution of restriction-modification systems of one class was studied in detail. Systems in this class include an endonuclease with a NOV_C family domain and two DNA methyltransferases, both with DNA_methylase family domains. The phylogenetic tree of DNA methyltransferases from systems of this class consists of two clades of the same size. Two DNA methyltransferases of each restriction-modification system of the class belong to different clades. This indicates independent evolution of the two methyltransferases. We detected multiple cross-species horizontal transfers of systems as a whole, as well as cases of gene transfer between systems.

Keywords: restriction modification system, DNA methyltransferase, restriction endonuclease, evolutionary domains, protein evolution, horizontal gene transfer

КУМУЛЯТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ ПАРАОКСОНА И ЛЕПТИНА НА ПРОЦЕСС ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ В ТКАНЯХ КРЫС: ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ РОЛЬ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА

© 2023 S. Khazaie¹, M. Jafari^{2*}, M. Golamloo¹, A. Asgari³,
J. Heydari¹, M. Salehi⁴, F. Salem¹

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran; E-mail: m.jafari145@gmail.com

³ Exercise Physiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Neurosciences Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Поступила в редакцию 11.11.2022

После доработки 11.01.2023

Принята к публикации 11.01.2023

Воздействие на живой организм параоксона (POX) и лептина (LP) может привести к возникновению дисбаланса между оксидантами и антиоксидантами. Это можно предотвратить за счет введения экзогенных антиоксидантов, таких как N-ацетилцистеин (NAC). Целью настоящего исследования являлась оценка синергического или аддитивного влияния на антиоксидантный статус введения экзогенного LP и POX, а также профилактической и терапевтической роли NAC в различных тканях крыс. Пятьдесят четыре крысы-самца линии Wistar были разделены на девять групп, подлежащих обработке различными химическими соединениями: 1) контроль (без обработки); 2) POX (0,7 мг/кг); 3) NAC (160 мг/кг); 4) LP (1 мг/кг); 5) POX + LP; 6) NAC-POX; 7) POX-NAC; 8) NAC-POX + LP; 9) POX + LP-NAC. В последних пяти группах различался только порядок введения соединений. Через 24 ч после воздействия у крыс брали и исследовали плазму крови и ткани. Результаты показали, что введение POX + LP достоверно повышало биохимические показатели плазмы и активность антиоксидантных ферментов, снижало содержание восстановленного глутатиона (GSH) в печени, эритроцитах, головном мозге, почках и сердце. Кроме того, в этой группе в печени, эритроцитах и головном мозге была снижена активность холинэстеразы и параоксоназы 1, в то время как уровень малонового диальдегида — повышен. Однако введение NAC исправляло индуцированные изменения, хотя и не полностью. Полученные нами результаты позволяют предположить, что введение POX или LP использует систему окислительного стресса как таковую; однако их комбинация не приводила к значительно большему эффекту. Более того, как профилактическое, так и терапевтическое воздействие NAC на крыс поддерживало антиоксидантную защиту от окислительного повреждения в тканях, скорее всего, благодаря способности удалять свободные радикалы и сохранять внутриклеточный уровень GSH. Таким образом, можно предположить, что NAC оказывает именно защитное действие против токсичности POX и/или LP.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: параоксон, лептин, N-ацетилцистеин, окислительный стресс, биохимические параметры, ткани крысы.

DOI: 10.31857/S0320972523020094, **EDN:** QHABRU

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ФОС — фосфорорганические соединения; ALP — щелочная фосфатаза; ALT — аланинаминотрансфераза; AST — аспаратаминотрансфераза; CAT — каталаза; GSH — восстановленный глутатион; GST — глутатион S-трансфераза; HDL и HDL-C — липопротеины высокой плотности и высокой плотности-холестерин соответственно; LDL, VLDL и LDL-C — липопротеины низкой плотности, очень низкой плотности и низкой плотности-холестерин соответственно; LP — лептин; MDA — малоновый диальдегид; NAC — N-ацетил-L-цистеин; PON1 — параоксоназа 1; POX — параоксон; SOD — супероксиддисмутаза; TG — триглицерид; TC — общий холестерин.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорорганические соединения (ФОС) широко используются во всем мире в различных областях сельского хозяйства, в ветеринарии и промышленности. Более широкое использование ФОС с их способностью взаимодействовать с биологическими системами и проблемой утилизации их остатков в окружающей среде предполагает высокие риски возникновения серьезных проблем со здоровьем населения. Профессиональное и случайное отравление этими токсичными соединениями ежегодно приводит к тысячам смертей во всем мире и является третьей по частоте причиной смерти от отравления в Иране [1, 2].

Параоксон (РОХ) представляет собой окисленный активный метаболит ФОС, паратиона. Нейротоксические эффекты РОХ обычно связывают с ингибированием холинэстеразы, избыточным накоплением ацетилхолина и холинергическим кризом [3, 4]. Кроме того, РОХ, как липофильная молекула, легко проходит через клеточную мембрану в цитоплазму, увеличивая продукцию в ней активных форм кислорода (АФК) и вызывая нарушения бислойной фосфолипидной структуры клеточной мембраны и истощение запасов восстановленного глутатиона (GSH), что приводит к индукции вредных окислительных изменений в различных органах [5, 6]. По этой причине добавки, содержащие экзогенный источник антиоксидантов, таких как N-ацетил-L-цистеин (NAC), играют важную роль в поддержании баланса оксидантов и антиоксидантов в организме. NAC, как терапевтическое средство, является предшественником синтеза GSH и химиопротектором против токсического действия многих соединений. Кроме того, он действует как поглотитель свободных радикалов благодаря прямому взаимодействию с АФК. NAC является очень безопасным и эффективным препаратом для лечения многих заболеваний, связанных с окислительным стрессом и/или дефицитом GSH [7, 8]. Все перечисленные выше полезные свойства NAC позволили нам рассматривать это соединение в качестве сильного кандидата на восстановление нарушенного прооксидантно-антиоксидантного баланса при отравлении ФОС [9]. Ряд исследователей сообщили о профилактической и/или терапевтической роли NAC в отношении острой/хронической токсичности различных ФОС, таких как диазинон [10] и фентион [9].

Параоксоназа 1 (PON1) — кальций-зависимая эстераза, обнаруженная у различных видов млекопитающих. Этот фермент синтезируется

преимущественно в печени и секретируется в кровь, где связывается с липопротеинами высокой плотности (HDL). PON1 обладает антиоксидантными и липофильными свойствами и защищает клетки от вредного воздействия ФОС. Побочными продуктами гидролиза РОХ являются диэтилфосфорная кислота и п-нитрофенол, но ни один из них не способен ингибировать холинэстеразу [5, 11]. PON1 также защищает липопротеины низкой плотности (LDL) от окислительных модификаций и уменьшает накопление продуктов перекисного окисления, тем самым предотвращая возникновение и прогрессирование атеросклероза [11]. Этот фермент необходим для снижения уровня окислительного стресса за счет удаления активных форм кислорода [5].

Лептин (LP) представляет собой секретируемый адипоцитами пептидный гормон, высвобождение которого происходит пропорционально размеру жировых депо. Он играет регулируемую роль в потреблении пищи, расходе энергии, метаболизме углеводов и липидов, провоспалительных иммунных реакциях и ангиогенезе. Уровни LP в плазме крови выше у пациентов с ожирением и диабетом, которые считаются резистентными к LP [12–14]. LP стимулирует воспалительные клетки, увеличивает образование АФК, вызывает окислительный стресс и снижает активность PON1 в плазме крови [12, 15].

Ожирение — это состояние, характеризующееся гиперлептинемией, оно связано с дисфункцией тканей из-за повышенной продукции АФК [13]. Активность системы оксидантно-антиоксидантной защиты от химикатов и лекарств неодинакова в разных тканях [16]. Насколько нам известно, комбинированное влияние РОХ и высокого уровня LP на индукцию окислительного стресса при таких состояниях, как ожирение, не исследовалось. Целями настоящего исследования были: 1) определить степень синергического или аддитивного воздействия экзогенных LP и РОХ на антиоксидантный статус, если таковые имеются; 2) изучить любую корреляцию между окислительными биомаркерами и активностью PON1 и 3) оценить профилактическую и терапевтическую роль NAC в отношении этих эффектов на эритроциты, печень, почки, головной мозг и сердце у самцов крыс линии Wistar. Наша экспериментальная модель позволила нам исследовать влияние гиперлептинемии без других метаболических нарушений, сопровождающих ожирение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использовали нитросиний тетразолий (NBT), восстановленный глутатион (GSH), 1-хлоро-2,4-динитробензол (CDNB), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота) (DTNB), параоксон (чистота 90%), лептин, N-ацетилцистеин («Sigma Chemical Company», Германия). Все остальные использованные реагенты имели квалификацию «ос.ч.» и были получены от фирм «Sigma» и «Merck», (Германия). Непосредственно перед использованием POX растворяли в кукурузном масле до получения концентрированного раствора (4 мг/мл). Концентрированные растворы LP (1 мг/мл) и NAC (160 мг/мл) получали с использованием 10 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,4).

Животные. Крысы-самцы линии Wistar весом 170–230 г были получены из вивария Бакияталлахского медицинского университета (Тегеран, Иран). В одну клетку помещали по 3 крысы и давали им возможность акклиматизироваться в течение по меньшей мере одной недели до использования в экспериментах. Лабораторных животных содержали при контролируемой температуре (20–22 °C) и 12-часовом цикле свет/темнота, они получали без ограничений стандартный корм для крыс и воду.

План экспериментов. Животные были случайным образом разбиты на 9 групп (по 6 крыс в группе); каждой группе однократно внутрибрюшинно вводили POX, LP и NAC в разных комбинациях: 1) контрольной группе вводили кукурузное масло (растворитель POX); 2) группе NAC вводили NAC в концентрации 160 мг/кг [10]; 3) группе POX вводили POX в концентрации 0,7 мг/кг [6]; 4) группе LP вводили LP в концентрации 1 мг/кг [15, 17]; 5) группе POX + LP вводили смесь POX (0,7 мг/кг) и LP (1 мг/кг); 6) группе NAC-POX предварительно вводили NAC в концентрации 160 мг/кг, а затем через 3 ч вводили POX (0,7 мг/кг); 7) группе POX-NAC предварительно вводили POX в концентрации 0,7 мг/кг с последующей дозой NAC (160 мг/кг) через 3 часа; 8) группе NAC-POX + LP предварительно вводили NAC в концентрации 160 мг/кг, а затем через 3 ч одновременно вводили смесь POX (0,7 мг/кг) и LP (1 мг/кг); 9) группе POX + LP-NAC предварительно вводили смесь POX (0,7 мг/кг) и LP (1 мг/кг), а затем через 3 ч вводили NAC (160 мг/кг). Всех крыс взвешивали в начале и в конце исследования.

Получение препаратов плазмы крови и тканей. Крыс забивали через 24 ч после послед-

него введения экспериментальных препаратов [6], после голодания в течение последней ночи. Образцы крови собирали путем пункции сердца в пробирки с гепарином и сразу же центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин при 4 °C. Плазму крови удаляли, а эритроциты промывали 3 раза пятью объемами фосфатно-солевого буфера (PBS); снова центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин при 4 °C, после чего удаляли надосадочную жидкость и белый лейкоцитарный слой; осадок делили на равные порции и хранили в замороженном состоянии при –70 °C до использования. Печень, почки, головной мозг, сердце и селезенку быстро извлекали, промывали в ледяном PBS, сразу же погружали в жидкий азот, после чего хранили при –70 °C до проведения биохимического анализа.

В день проведения эксперимента эритроциты подвергали гемолизу в 10 объемах ледяной дистиллированной воды. После центрифугирования супернатант использовали для биохимического анализа. Кроме того, замороженные образцы тканей быстро взвешивали и гомогенизировали в ледяном PBS в соотношении 1/10 в гомогенизаторе («Heidolph», Германия). Затем гомогенаты центрифугировали при 16 000 g в течение 15 мин при 4 °C. Супернатанты отделяли и использовали для анализа активности ферментов и определения уровней GSH, MDA (малоновый диальдегид) и белка.

Биомаркеры окислительных повреждений. Активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли на основании способности SOD ингибировать восстановление NBT супероксидом. Активность каталазы (CAT) измеряли по скорости деградации H₂O₂ (субстрат этого фермента), регистрируя на спектрофотометре оптическое поглощение образцов при 240 нм. Активность глутатион-S-трансферазы (GST) оценивали, наблюдая за образованием тиоэфирного продукта реакции между GSH и CDNB при 340 нм. Уровень GSH определяли путем регистрации поглощения DTNB при 412 нм. Уровень MDA, индикатора перекисного окисления липидов, определяли с использованием тиобарбитуровой кислоты по поглощению при 532 нм [10]. Активность PON1 определяли путем измерения начальной скорости гидролиза субстрата с образованием п-нитрофенола, поглощение которого контролировали при 412 нм [18]. Активность ферментов в различных тканях выражали в единицах (U) на мг белка.

Уровни общего белка и гемоглобина. Концентрацию общего белка в тканях измеряли по методу Брэдфорда, используя в качестве

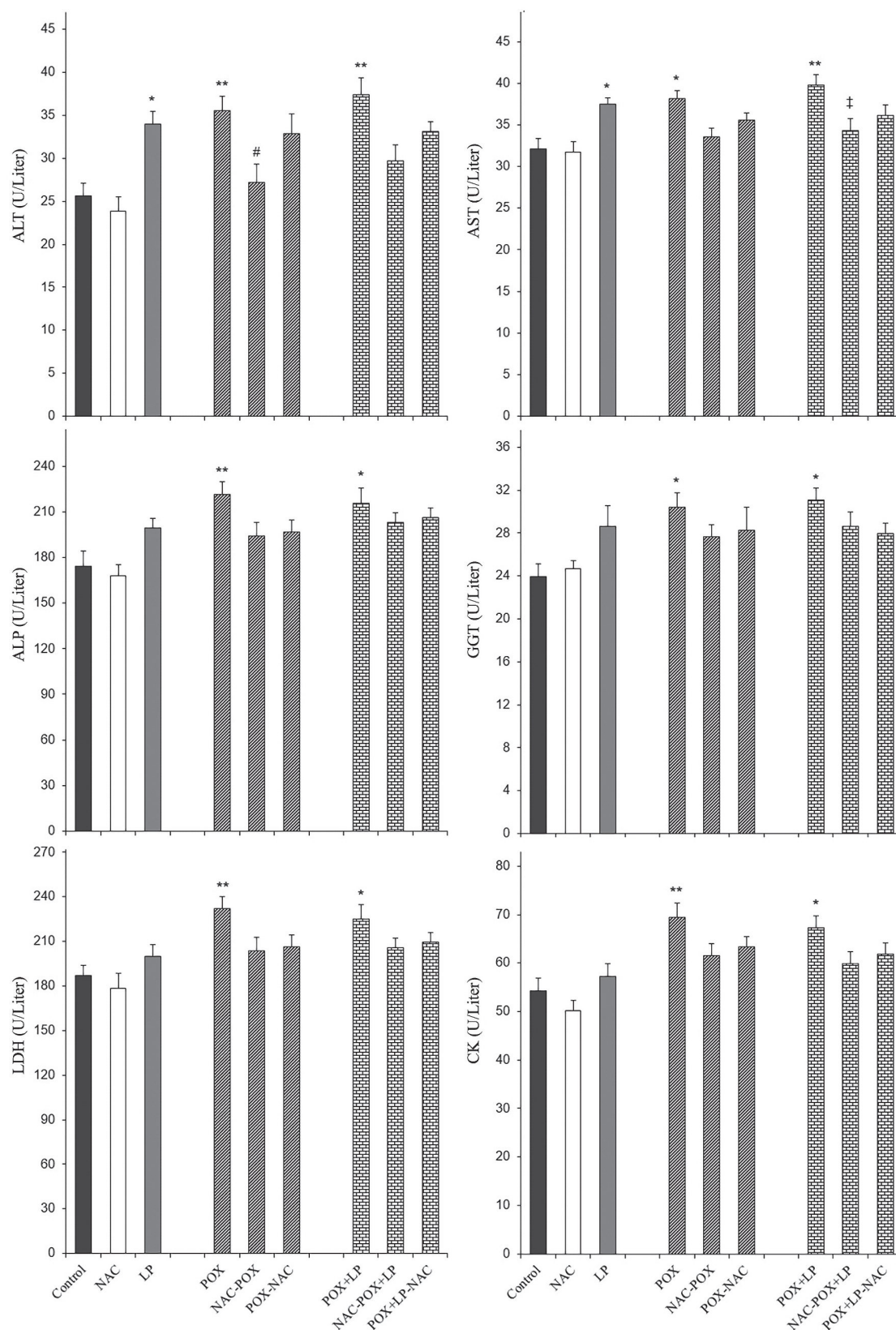


Рис. 1. Эффекты параоксона (POX) и лептина (LP) в присутствии N-ацетилцистеина (NAC) и без него на функциональные показатели плазмы крови, печени и сердца самцов крыс линии Wistar, определяемые через 24 ч после воздействия. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ — достоверные различия по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ — достоверные различия по сравнению с группой POX; † $p < 0,05$ — достоверные различия по сравнению с группой POX + LP. Обозначения: AST — аспартаттрансаминаза; ALT — аланинтрансаминаза; LDH — лактатдегидрогеназа; GGT — γ -глутамилтрансфераза; ALP — щелочная фосфатаза; CK — креатинфосфаткиназа

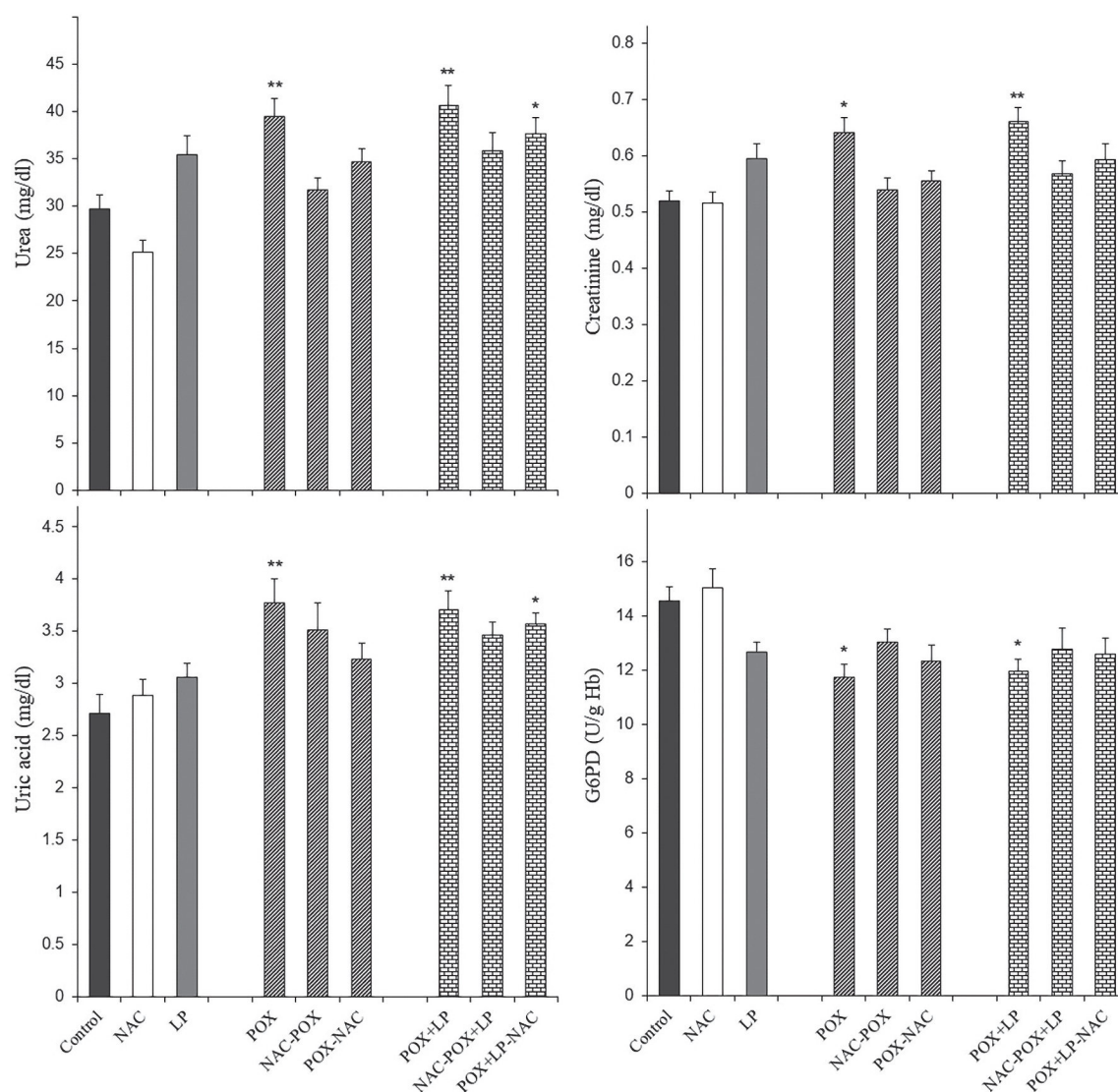


Рис. 2. Эффекты параоксона (POX) и лептина (LP) в присутствии N-ацетилцистеина (NAC) и без него на функциональные показатели плазмы крови и почек у самцов крыс линии Wistar, определяемые через 24 ч после воздействия. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ – достоверные различия по сравнению с контролем. G6PD – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

стандарта бычий сывороточный альбумин [19]. Концентрацию гемоглобина (Hb) в крови измеряли цианметгемоглобиновым методом с раствором Драбкина [20].

Определение биохимических показателей плазмы крови. Активности аспартаттрансаминазы (AST), аланинтрансаминазы (ALT), щелочной фосфатазы (ALP), лактатдегидрогеназы (LDH), креатинфосфаткиназы (СК), γ -глутамилтрансферазы (GGT) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD), а также уровни мочевины, креатинина, мочевой кислоты, общего холестерина (ТС), триглицеридов (TG) и липопротеинов высокой плотности-холестерин (HDL-C) определяли в плазме крови с использованием наборов Parsazmun Company kits («Parsazmun», Иран). Уровни липопротеинов

очень низкой плотности (VLDL) и липопротеинов низкой плотности-холестерин (LDL-C) рассчитывали с помощью уравнения Friedewald et al. [21].

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием статистического программного обеспечения SPSS версии 22 («IBM Corporation», США). Значимость различий определяли с помощью дисперсионного анализа ANOVA с последующим *post-hoc*-анализом с использованием тестов множественного сравнения Тьюки, примененных к различным группам (1–9) крыс для каждой ткани. Результаты выражали в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Уровень значимости основан на $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние различных комбинаций воздействия на биохимические показатели плазмы крови. Активности AST, ALT, ALP, GGT, CK и LDH, а также уровни мочевины, мочевой кислоты, креатинина, TG, TC, VLDL-C, LDL-C и соотношение LDL/HDL в группах POX и POX + LP были значительно повышены, в то время как активность G6PD и уровень HDL-C снижались по сравнению с этими показателями в контрольной группе. Активность ALT и AST в группе LP была повышена по сравнению с активностью этих двух ферментов в контрольной группе. Активность ALT, уровни TG, VLDL-C, LDL-C и LDL/HDL в группе NAC-POX, а также уровни LDL/HDL в группе POX-NAC были понижены по сравнению с группой POX (рис. 1–3).

Влияние различных комбинаций воздействия на активность антиоксидантных ферментов. Активности SOD, CAT и GST в группах POX и POX + LP были значительно повышены во всех протестированных тканях по сравнению с контрольной группой. Активности SOD и CAT в группе LP были значительно повышены во всех тканях, за исключением почек. Активность SOD в головном мозге в группе NAC-POX была значительно снижена по сравнению с группой POX (18,4%; $p = 0,046$). Активность SOD в головном мозге в группе NAC-POX + LP также была снижена по сравнению с группой POX + LP (16%; $p = 0,047$). Введение крысам NAC до и после воздействия POX + LP (21,9%; $p = 0,004$ и 17,2%; $p = 0,046$ соответственно) вызывало значительное снижение активности CAT в эритроцитах по сравнению с группой POX + LP. Введение крысам NAC до и после воздействия POX способно восстановить активность GST в головном мозге (таблица).

Влияние воздействия на уровни GSH и MDA. Уровень GSH в группах POX и POX + LP был снижен во всех протестированных тканях по сравнению со значениями в контрольной группе. LP снижал уровень GSH в печени, головном мозге и эритроцитах по сравнению с контролем. Уровень GSH был значительно повышен в печени (19,9%; $p = 0,02$), эритроцитах (16%; $p = 0,047$) и головном мозге (40,4%; $p = 0,006$) в группе NAC-POX, в печени – в группе POX-NAC (18%; $p = 0,048$) и в головном мозге – в группе NAC-POX + LP (32,3%; $p = 0,047$) по сравнению с группой POX. Кроме того, аналогичные значимые изменения уровня GSH наблюдались в головном мозге (33,8%; $p = 0,0003$) и эритроцитах (17%; $p = 0,01$) в груп-

пе NAC-POX + LP по сравнению с группой POX + LP (рис. 4).

Уровень MDA в группах POX, LP и POX + LP был повышен по сравнению с контролем в печени, мозге и эритроцитах. На рис. 5 показано повышение уровня MDA в протестированных тканях всех групп животных, за исключением группы NAC-POX, в которой уровень малонового диальдегида был достоверно снижен в головном мозге по сравнению с группой POX.

Влияние воздействия на активность PON1. В группах POX, LP и POX + LP активность PON1 была значительно понижена в печени, эритроцитах, головном мозге и плазме крови подвергнутых воздействиям крыс по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе крыс. Активность PON1 в головном мозге в группе NAC-POX значительно превышала активность этого фермента в группе POX (21,8%; $p = 0,048$) (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ожирение – одна из самых серьезных проблем со здоровьем, которая диагностируется по комплексу критериев, включающих инсулинорезистентность, дислипидемию и артериальную гипертензию [12]. Клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ожирение напрямую связано с гиперлептинемией и окислительным стрессом. LP, один из наиболее известных гормональных маркеров ожирения, оказывает плеiotропное действие на многие системы органов [14]. К побочным эффектам лептина относится инициация окислительного стресса, опосредованного активацией NADPH-оксидазы, как основного фермента, ответственного за образование АФК [12]. В организме есть мощные эндогенные антиоксидантные механизмы с участием SOD, CAT, GST и GSH, которые противодействуют вредному воздействию АФК, превращая их в менее реакционноспособные соединения. SOD является ферментом, ответственным за превращение супероксидного радикала в H_2O_2 , а CAT превращает H_2O_2 в воду и кислород. GSH является наиболее распространенным внутриклеточным химическим соединением со свободной тиольной группой, играющим важную роль в организме [16]. GSH, как мощный антиоксидант, напрямую реагирует со свободными радикалами и пероксидами, защищая клетку от окислительных повреждений. Он также действует как субстрат для антиоксидантных ферментов,

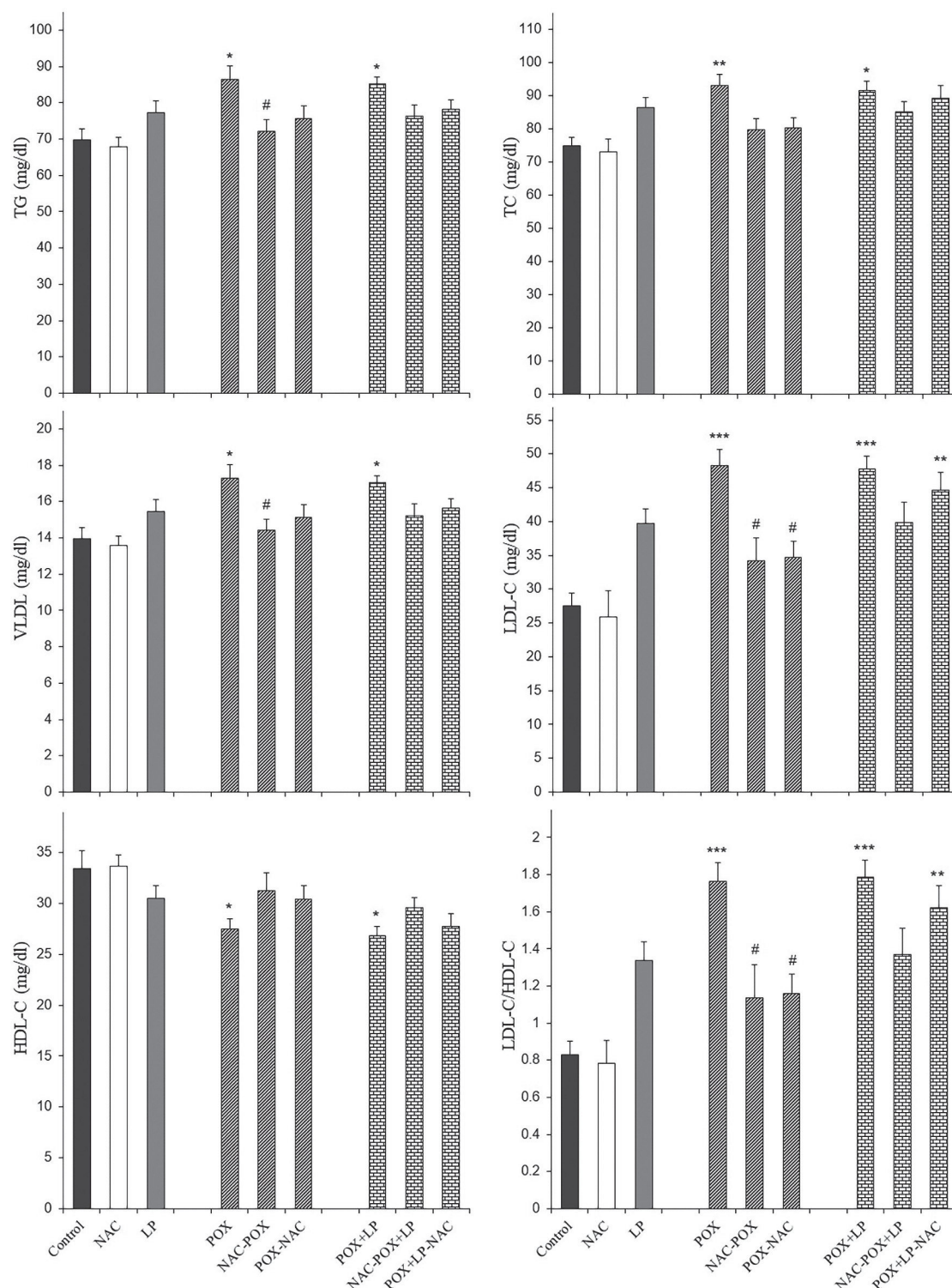


Рис. 3. Действие параоксона (POX) и лептина (LP) в присутствии N-ацетилцистеина (NAC) и без него на состав липидов, определяемый в плазме крови через 24 ч после воздействия. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ – достоверные различия по сравнению с контрольной группой; # $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с группой POX. Обозначения: TG – триглицерид; TC – общий холестерин; LDL-C – липопротеин высокой плотности; VLDL – липопротеин очень низкой плотности; HDL-C – липопротеин высокой плотности

включая глутатионпероксидазу, глутатион-редуктазу и GST, тем самым предотвращая увеличение АФК. GST действует как детоксикант многочисленных токсичных соединений

путем их конъюгации с GSH [22]. Результаты этого исследования указывают на то, что LP индуцирует окислительный стресс, о чем свидетельствует повышение активности SOD,

Влияние параоксона и лептина в присутствии или при отсутствии N-ацетилцистеина на активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатион-S трансферазы в различных тканях крыс линии Wistar через 24 ч после воздействия

Группы	Печень	Эритроциты	Почки	Мозг	Сердце
Активность SOD					
Контроль	53 ± 3	920 ± 40	46 ± 2	30 ± 1	34 ± 2
POX	68 ± 3*	1160 ± 30**	57 ± 3*	39 ± 1**	42 ± 1*
NAC	51 ± 2	840 ± 40	48 ± 2	30 ± 1	30 ± 2
LP	66 ± 3*, ‡	1180 ± 40***	54 ± 2	40 ± 2***	40 ± 1*
POX+LP	70 ± 3**	1200 ± 30***	61 ± 3**	45 ± 2***	43 ± 1**
NAC-POX	63 ± 3	1000 ± 40	55 ± 2	32 ± 2#	37 ± 2
POX-NAC	64 ± 3	1100 ± 40*	59 ± 2*	34 ± 2	38 ± 2
NAC-POX+LP	67 ± 3*	1120 ± 40*	57 ± 2*	38 ± 1*, ‡‡‡‡	36 ± 2
POX+LP-NAC	68 ± 3*	1140 ± 40**	60 ± 2**	39 ± 2**	38 ± 1
Активность CAT					
Контроль	35 ± 2	30 ± 1	49 ± 3	20 ± 1	27 ± 1
POX	49 ± 3**	40 ± 2**	63 ± 3**	29 ± 2**	36 ± 2*
NAC	34 ± 2	30 ± 2	50 ± 2	17 ± 2	28 ± 1
LP	46 ± 2*	38 ± 2**	56 ± 2	28 ± 1*	36 ± 2*
POX+LP	52 ± 3***	50 ± 2***, #	64 ± 3***	30 ± 2**	38 ± 2**
NAC-POX	45 ± 3	34 ± 2	57 ± 2	24 ± 2	36 ± 2*
POX-NAC	48 ± 3*	37 ± 2*	60 ± 2*	28 ± 2*	36 ± 2*
NAC-POX+LP	48 ± 2*	36 ± 2*, ‡‡	59 ± 1*	26 ± 2	36 ± 2*
POX+LP-NAC	49 ± 2**	38 ± 2**, ‡	63 ± 2***	28 ± 1*	36 ± 2*
Активность GST					
Контроль	280 ± 20	20 ± 1	27 ± 1	74 ± 3	37 ± 2
POX	380 ± 20**	30 ± 1**	34 ± 1*	93 ± 4**	46 ± 2*
NAC	290 ± 20	20 ± 1	28 ± 1	73 ± 3	39 ± 2
LP	370 ± 10*	25 ± 1*	29 ± 1	89 ± 3*	45 ± 1*
POX+LP	400 ± 20***	26 ± 1**	35 ± 1**	94 ± 3**	47 ± 2**
NAC-POX	330 ± 20	23 ± 1	30 ± 1	77 ± 3#	44 ± 1
POX-NAC	380 ± 20*	24 ± 1	33 ± 1*	78 ± 4	45 ± 1*
NAC-POX+LP	380 ± 20*	25 ± 1*	33 ± 1*	79 ± 4‡	45 ± 2*
POX+LP-NAC	380 ± 20*	30 ± 1**	34 ± 1*	83 ± 3	45 ± 2*

Примечание. POX – параоксон; LP – лептин; NAC – N-ацетилцистеин; SOD – супероксиддисмутаза; CAT – каталаза; GST – глутатион-S трансфераза. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего ($n = 6$).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – достоверные различия по сравнению с контрольной группой; # $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с группой POX; ‡ $p < 0,05$; ‡‡ $p < 0,01$; ‡‡‡ $p < 0,01$ – достоверные различия по сравнению с группой POX + LP. Активности SOD с CAT представлены в виде U/г Hb в эритроцитах и U/мг белка – в других тканях.

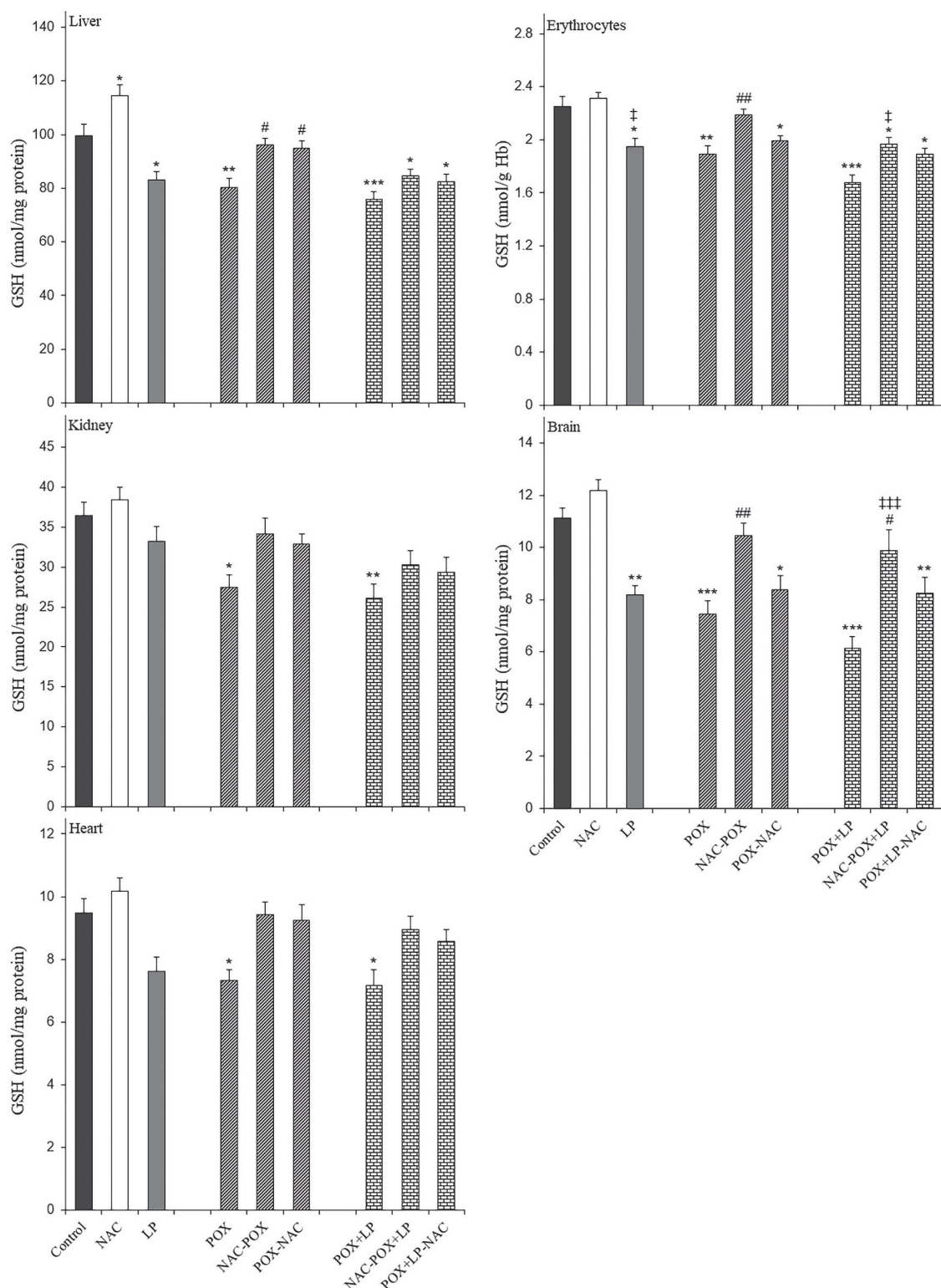


Рис. 4. Эффекты параоксона (POX) и лептина (LP) в присутствии или при отсутствии N-ацетилцистеина (NAC) на уровень глутатиона (GSH) в различных тканях крыс линии Wistar, определяемых через 24 ч после воздействия. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ — достоверные различия по сравнению с контрольной группой; # $p < 0,05$ и ## $p < 0,01$ — достоверные различия по сравнению с группой POX; † $p < 0,05$ и ††† $p < 0,001$ — достоверные различия по сравнению с группой POX + LP

CAT, GST и уровня MDA, а также снижение уровня GSH в различных тканях. Повышенная активность антиоксидантных ферментов,

вероятно, связана с адаптивным ответом на увеличение продукции АФК, что свидетельствует о несостоятельности общего механизма

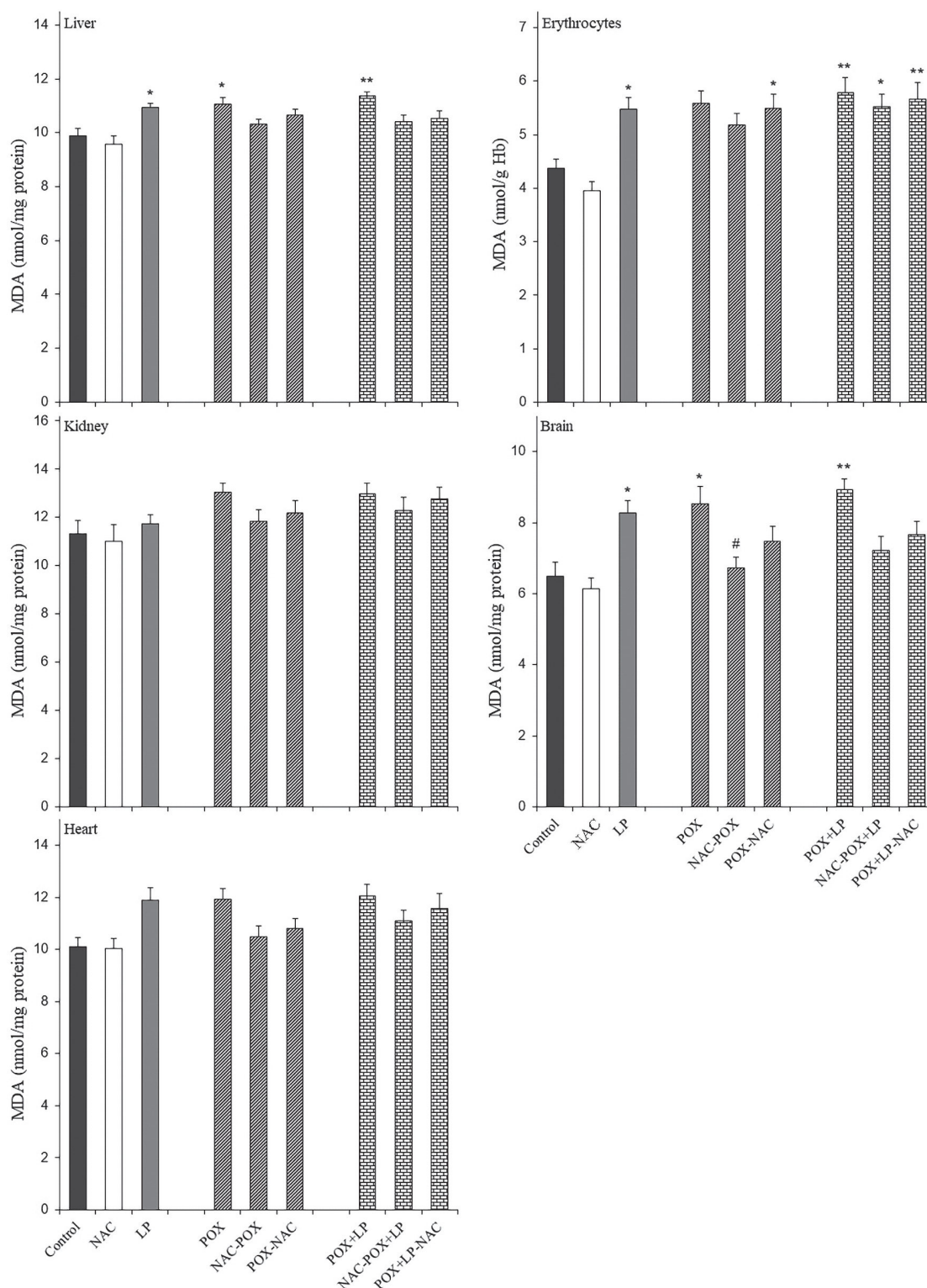


Рис. 5. Эффекты параоксона (POX) и лептина (LP) в присутствии или при отсутствии N-ацетилцистеина (NAC) на уровень малонового диальдегида (MDA) в различных тканях крыс линии Wistar, определяемых через 24 ч после введения препарата. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ – достоверные различия по сравнению с контрольной группой; # $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с группой POX

антиоксидантной защиты для защиты тканей от повреждений, вызванных LP, о чем свидетельствует истощение GSH [6]. У животных окислительные события, опосредованные лепти-

ном, плохо изучены. Он стимулирует продукцию АФК в культивируемых эндотелиальных клетках, возможно, посредством стимуляции митохондриального окисления жирных кислот [23].

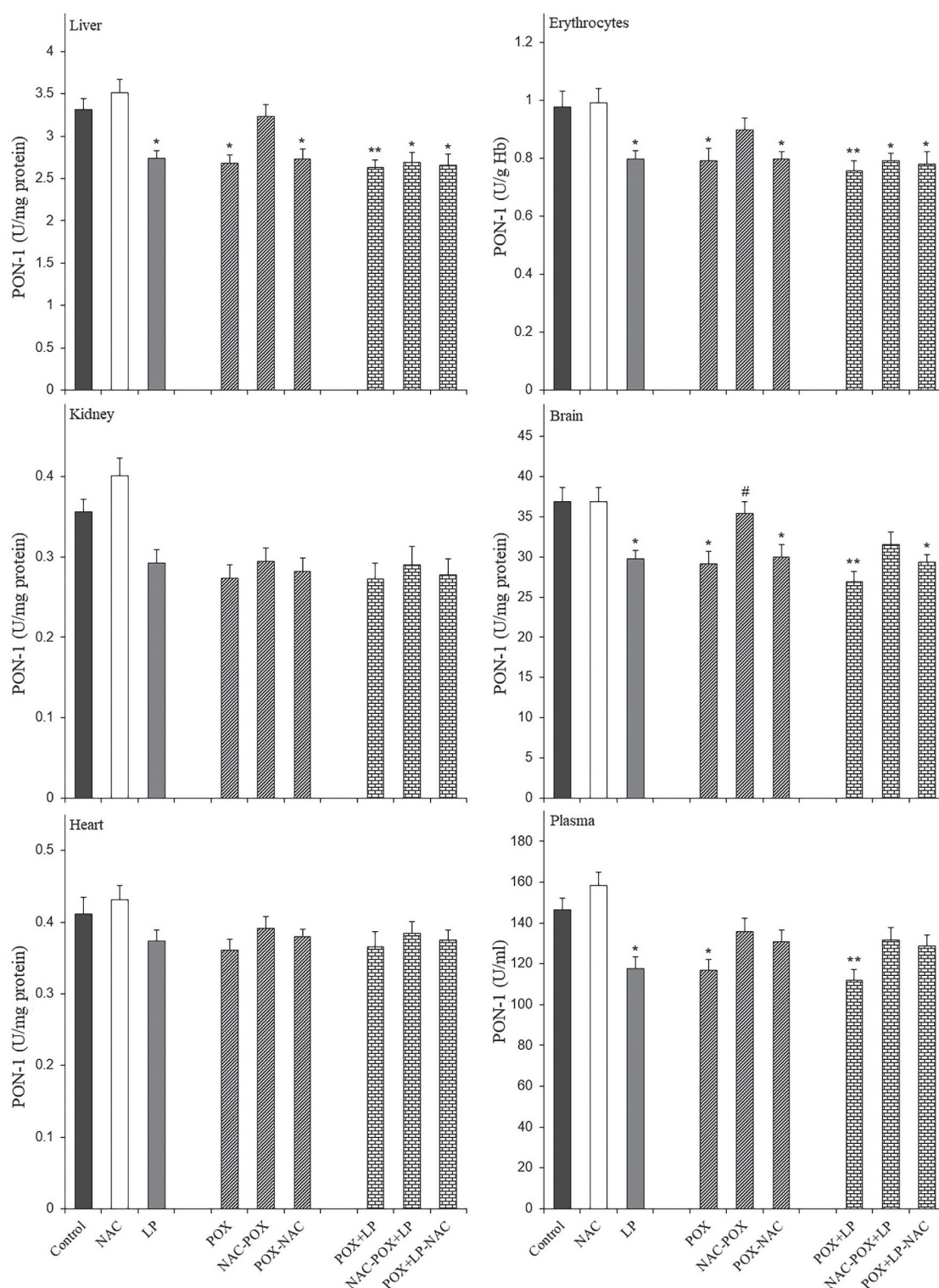


Рис. 6. Эффекты параоксона (POX) и лептина (LP) в присутствии или при отсутствии N-ацетилцистеина (NAC) на активность параоксиназы 1 (PON-1) в различных тканях крыс линии Wistar, определяемые через 24 ч после воздействия. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ – достоверные различия по сравнению с контрольной группой; # $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с группой POX

Кроме того, LP увеличивает образование АФК путем стимуляции провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей альфа (TNF- α), интерлейкин-1 (IL-1) и ин-

терлейкин-6 (IL-6), которые хорошо известны как стимуляторы фагоцитарной NADPH-оксидазы [12, 18]. Исследования по изучению влияния LP на системный и внутрипочечный

окислительный стресс *in vivo* сейчас ограничены [15, 18]. Было показано, что в печени и почках мышей после воздействия лептина (0,23 мг/кг) в течение 2 недель не было изменений картины продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментов [24].

PON1 обладает защитным действием против свободных радикалов, считающихся мощными антиоксидантами [5]. Настоящее исследование показало, что LP снижал активность PON1 в плазме, эритроцитах, печени и мозге крыс, но не влиял на активность этого фермента в почках и сердце. Хотя механизм подавления активности PON1 лептином все еще неизвестен, он может быть связан с окислением и изменением состава частиц HDL и стимуляцией провоспалительных цитокинов. Секреция воспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-6 и IL-12, стимулирует респираторный взрыв фагоцитов и образование АФК, а также индуцирует продукцию в печени белков острой фазы [15, 18]. Результаты этого исследования были подтверждены предыдущими исследованиями. Bełtowski et al. [15, 18] показали, что введение экзогенного LP на протяжении 7 дней снижает активность PON1 в плазме крови и тканях крыс.

Полученные нами данные о повышенной активности SOD, CAT и GST и повышенном уровне MDA в группах POX и POX + LP в сочетании со снижением содержания GSH и активности PON1 свидетельствуют о недостаточности антиоксидантной защиты и индукции окислительного стресса. Окислительная дегградация липидов известна как перекисное окисление липидов, а МДА известен как конечный продукт этого процесса [22]. SOD и CAT первыми реагируют на чрезвычайные ситуации окислительного стресса. Повышенная активность антиоксидантных ферментов рассматривается как нейтрализующие действия в ответ на повышенное образование в тканях активных форм кислорода [16]. Гиперпродукция АФК в тканях животных, подвергшихся воздействию POX и LP, вызывает активацию ядерного фактора каппа-В (NF- κ B), который, в свою очередь, усиливает экспрессию генов цитокинов, таких как TNF- α и IL-6, что в конечном итоге вызывает воспаление [6], а также истощение GSH и повышение уровня MDA [25]. Повышение уровня супероксид-аниона приводит к дальнейшим последствиям. Он реагирует с NO с образованием пероксинитритного радикала и образует гидроксильный радикал вместе с H₂O₂ в реакции Хабера–Вайса и Фентона, что усугубляет

перекисное окисление липидов, повреждение ДНК и гибель клеток [26].

Снижение уровня GSH может быть связано со множеством факторов, включая наличие свободных радикалов, продуцируемых POX и LP, избыточное перекисное окисление липидов и повышенную активность фермента GST (таблица) [6]. Снижение запасов GSH в печени может нарушить гомеостаз GSH во всем организме за счет снижения уровня GSH в других тканях. Также снижение активности G6PD (рис. 2) оказывает влияние на скорость образования NADPH, который является коферментом глутатионредуктазы, превращающим окисленный глутатион (GSSG) в GSH, приводя к снижению уровня соотношения GSH/GSSG в тканях, подвергшихся воздействию POX и LP, что является еще одним признаком возникновения окислительного стресса [6, 10]. Результаты, представленные в данной работе, согласуются с данными ряда исследований [6, 27] и противоречат некоторым другим результатам, в которых сообщалось о снижении активности антиоксидантных ферментов после воздействия ФОС [6, 28]. И все же несколько исследований не обнаружили существенных различий в этой активности в различных тканях после воздействия ФОС [29, 30]. Противоречивые результаты, наблюдаемые в соответствующей литературе, могут быть объяснены различиями в типе, дозе, времени воздействия и способе введения токсина, типе, породе и виде животных, а также типах тканей, взятых в качестве образцов [31].

Окислительный стресс, индуцированный ФОС в различных тканях, можно предотвратить с помощью экзогенных антиоксидантов. NAC проявляет как прямые, так и опосредованные антиоксидантные свойства. Он часто используется в качестве источника сульфгидрильных групп в клетках (в качестве ацетилированного предшественника GSH). Он также может действовать как прямой поглотитель АФК [7, 8]. Настоящее исследование показало, что введение крысам NAC до и после отравления POX имело способность восстанавливать антиоксидантную способность, в основном за счет удаления АФК [10]. Ряд исследователей показали способность NAC снижать повреждение клеток, вызванное такими ФОС, как диазинон [10], параоксон [32] и фентион [9] у животных. Нашими предыдущими исследованиями было показано, что одновременное введение крысам NAC и POX частично восстанавливало активность антиоксидантных ферментов и уровни GSH и MDA в различных тканях [33, 34]. В настоящем исследовании

введение НАС до и после введения комбинации РОХ и LP было до некоторой степени эффективно в восстановлении этих показателей в различных тканях. Было показано, что воздействие НАС на мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, приводило к повышению антиоксидантной способности, а также к снижению уровня LP [7, 13]. Kim et al. [35] обнаружили, что внутрибрюшинное введение НАС не только повышало уровень GSH, но также снижало уровень циркулирующего в крови лептина и массу тела крыс и мышей за счет уменьшения количества висцерального жира. Это можно рассматривать как многообещающий результат для использования НАС в качестве лекарства от ожирения или даже пищевой добавки.

Было показано, что ингибирование активности PON1 происходит из-за снижения продукции PON1 в печени под действием АФК и продуктов перекисного окисления липидов. Однако представленные нами данные показывают, что введение РОХ и LP вызвало снижение активности PON1 только в эритроцитах, печени и головном мозге, в которых они стимулировали перекисное окисление липидов (рис. 5) [18]. НАС был до некоторой степени эффективен в смягчении окислительного стресса, вызванного РОХ/LP, и восстановлении активности PON1. Влияние антиоксидантов на уровень PON1 в плазме крови является спорным. Исследования *in vitro* предполагают, что антиоксиданты защищают изолированный PON1 от инактивации, вызванной свободными радикалами [36]. Jarvik et al. [37] сообщили о положительной корреляции между потреблением витаминов С и Е с пищей и активностью PON1 в плазме крови. Однако в других работах отмечено отсутствие каких-либо изменений [38] или даже предполагается негативное влияние [39] пищевых антиоксидантов на активность PON1 в плазме крови [18].

Повышение активности ферментов ALT, AST, GGT, LDH, ALP и СК, а также повышение уровня мочевины, мочевой кислоты и креатинина свидетельствует о дисфункции и повреждении тканей [10, 26]. В настоящей работе было показано, что уровни всех измеренных показателей плазмы крови были значительно повышены из-за воздействия РОХ и РОХ + LP. Повышенная активность ферментов у крыс может быть связана с их утечкой из пораженных тканей, возникающей после индуцированного РОХ повреждения мембран, опосредованного перекисным окислением липидов [6]. Кроме того, значительное повышение уровня мочевины, креатинина и мочевой

кислоты в плазме крови может указывать на то, что возникшая дисфункция почек может ограничивать их активную экскрецию, приводя к их накоплению в плазме [10, 16]. Однако снижение уровня этих соединений в группах, получавших НАС, косвенно указывает на то, что антиоксидант НАС защищал ткани от перекисного окисления липидов [9]. Точно так же другие исследователи подчеркивали преимущества НАС как достаточные для уменьшения степени повреждения печени и почек, вызванного диазином [10] и малатином [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования позволяют предположить наличие связи между окислительным стрессом и действием РОХ в отдельности или в сочетании с LP в различных тканях, на что указывает повышенная активность антиоксидантных ферментов, истощение GSH и усиленное перекисное окисление липидов в тканях крыс. Эффекты РОХ и LP могут быть аддитивными, особенно в головном мозге и эритроцитах, хотя их комбинация не дает значительно больших эффектов, чем каждый из них по отдельности. Более того, как профилактическое, так и терапевтическое введение крысам НАС может предотвратить вызванный РОХ и LP окислительный стресс в тканях благодаря способности НАС удалять свободные радикалы и поддерживать внутриклеточные уровни GSH. Профилактическое применение (введение НАС) оказывало более сильное защитное действие по сравнению с введением НАС крысам после воздействия РОХ и LP.

Вклад авторов. S. Khazaie, M. Golamloo, J. Heydari, M. Salehi и F. Salem – ресурсы, визуализация, исследование, формальный анализ, программное обеспечение; M. Jafari – администрирование проекта, формальный анализ, концептуализация, методология, написание, рецензирование и редактирование; A. Asgari – руководство, концептуализация, рецензирование и редактирование.

Финансирование. Эта работа была финансирована Исследовательским центром химических травм Бакияталлахского медицинского университета (Тегеран, Иран) (грант № 1393-225).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Н. Mahdavi и J. Rasouli за оказанную техническую помощь.

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

Соответствие этическим стандартам. Все применимые международные, национальные

и/или институциональные рекомендации по уходу и использованию животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jalili, C., Farzaei, M. H., Roshankhah, S., and Salahshoor, M. R. (2019) Resveratrol attenuates malathion-induced liver damage by reducing oxidative stress, *J. Lab. Physicians*, **11**, 212-219, doi: 10.4103/JLP.JLP_43_19.
2. Imam, A., Sulaiman, N. A., Oyewole, A. L., Chenge-tanai, S., Williams, V., Ajibola, M. I., Folarin, R. O., Muhammad, A. U. S., Shittu, S.-T. T., and Ajao, M. S. (2018) Chlorpyrifos-and dichlorvos-induced oxidative and neurogenic damage elicits neuro-cognitive deficits and increases anxiety-like behavior in wild-type rats, *Toxics*, **6**, 71, doi: 10.3390/toxics6040071.
3. Zare, Z., Tehrani, M., Zarbakhsh, S., Farzadmanesh, H., Shafia, S., Abedinzade, M., Ghanaat, A., and Mohammadi, M. (2020) Effects of paraoxon exposure on expression of apoptosis-related genes, neuronal survival, and astrocyte activation in rat prefrontal cortex, *Neurotox. Res.*, **37**, 356-365, doi: 10.1007/s12640-019-00106-x.
4. Faro, L., Costas-Ferreira, C., Pantoja, A., and Durán, R. (2022) Protective effects of antioxidants on striatal dopamine release induced by organophosphorus pesticides, *Pest. Biochem. Physiol.*, **182**, 105035, doi: 10.1016/j.pestbp.2022.105035.
5. Alimohammadi, M., Soodi, M., and Gholami Fesharaki, M. (2019) Organophosphate pesticide exposure reduced serum paraoxonase 1 (PON1) activity which correlated with oxidative stress in pesticide factory workers, *Arch. Hyg. Sci.*, **8**, 88-97, doi: 10.29252/ArchHygSci.8.2.88.
6. Jafari, M., Salehi, M., Asgari, A., Ahmadi, S., Abbasnezhad, M., Hajihoosani, R., and Hajigholamali, M. (2012) Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **34**, 876-887, doi: 10.1016/j.etap.2012.08.011.
7. Charron, M. J., Williams, L., Seki, Y., Du, X. Q., Chaurasia, B., Saghatelian, A., Summers, S. A., Katz, E. B., Vuguin, P. M., and Reznik, S. E. (2020) Antioxidant effects of N-acetylcysteine prevent programmed metabolic disease in mice, *Diabetes*, **69**, 1650-1661, doi: 10.2337/db19-1129.
8. Lasram, M. M., Bini Douib, I., Bouzid, K., Annabi, A., Naziha, E. E., Dhoubi, H., El Fazaa, S., Abdelmoula, J., and Gharbi, N. (2014) Effects of N-acetyl-L-cysteine, *in vivo*, against pathological changes induced by malathion, *Toxicol. Mech. Methods*, **24**, 294-306, doi: 10.3109/15376516.2014.886003.
9. Yurumez, Y., Cemek, M., Yavuz, Y., Birdane, Y. O., and Buyukokuroglu, M. E. (2007) Beneficial effect of N-acetylcysteine against organophosphate toxicity in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 490-494, doi: 10.1248/bpb.30.490.
10. Tahmasebi, K., Jafari, M., Izadi, F., Asgari, A., Bahadoran, H., Heydari, J., and Khazaie, S. (2020) Evaluation of prophylactic and therapeutic roles of N-acetylcysteine on biochemical and oxidative changes induced by acute poisoning of diazinon in various rat tissues, *Curr. Chem. Biol.*, **14**, 100-116, doi: 10.2174/2212796814999200818094328.
11. Shunmoogam, N., Naidoo, P., and Chilton, R. (2018) Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance, *Vasc. Health Risk Manag.*, **14**, 137-143, doi: 10.2147/VHRM.S165173.
12. Blanca, A. J., Ruiz-Armenta, M. V., Zambrano, S., Salsoso, R., Miguel-Carrasco, J. L., Fortuño, A., Revilla, E., Mate, A., and Vázquez, C. M. (2016) Leptin induces oxidative stress through activation of nadph oxidase in renal tubular cells: antioxidant effect of L-Carnitine, *J. Cell Biochem.*, **117**, 2281-2288, doi: 10.1002/jcb.25526.
13. Berry, A., Bellisario, V., Panetta, P., Raggi, C., Magnifico, M. C., Arese, M., and Cirulli, F. (2018) Administration of the antioxidant N-acetyl-cysteine in pregnant mice has long-term positive effects on metabolic and behavioral endpoints of male and female offspring prenatally exposed to a high-fat diet, *Front. Behav. Neurosci.*, **12**, 48, doi: 10.3389/fnbeh.2018.00048.
14. Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Soskic, S., Essack, M., Arya, S., Stewart, A. J., Gojobori, T., and Isenovic, E. R. (2021) Leptin and obesity: role and clinical implication, *Front. Endocrinol.*, **12**, 585887, doi: 10.3389/fendo.2021.585887.
15. Bełtowski, J., Wojcicka, G., and Jamroz, A. (2003) Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia, *Atherosclerosis*, **170**, 21-29, doi: 10.1016/S0021-9150(03)00236-3.
16. Khazaie, S., Jafari, M., Heydari, J., Asgari, A., Tahmasebi, K., Salehi, M., and Abedini, M. S. (2019) Modulatory effects of vitamin C on biochemical and oxidative changes induced by acute exposure to diazinon in rat various tissues: prophylactic and therapeutic roles, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, **103**, 1619-1628, doi: 10.1111/jpn.13144.
17. Fruhbeck, G., and Gómez-Ambrosi, J. (2001) Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide, *Cell Signal.*, **13**, 827-833, doi: 10.1016/S0898-6568(01)00211-X.

18. Bełtowski, J., Jamroz-Wisniewska, A., Borkowska, E., and Wojcicka, G. (2005) Differential effect of anti-oxidant treatment on plasma and tissue paraoxonase activity in hyperleptinemic rats, *Pharmacol. Res.*, **51**, 523-532, doi: 10.1016/j.phrs.2005.01.007.
19. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
20. Van Kampen, E., and Zijlstra, W. G. (1966) Determination of Hemoglobin and Its Derivatives, In *Adv. Clin. Chem.*, pp. 141-187, Elsevier, doi: 10.1016/S0065-2423(08)60414-X.
21. Friedewald, W. T., Levy, R. I., and Fredrickson, D. S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin. Chem.*, **18**, 499-502, doi: 10.1093/clinchem/18.6.499.
22. Gudarzi, S., Jafari, M., Pirzad Jahromi, G., Eshрати, R., Asadollahi, M., and Nikdokht, P. (2020) Evaluation of modulatory effects of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract on oxidative stress in ischemic stroke patients: a randomized clinical trial, *Nutr. Neurosci.*, **25**, 1137-1146, doi: 10.1080/1028415X.2020.1840118.
23. Yamagishi, S.-I., Edelstein, D., Du, X.-L., Kaneda, Y., Guzmán, M., and Brownlee, M. (2001) Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A, *J. Biol. Chem.*, **276**, 25096-25100, doi: 10.1074/jbc.M007383200.
24. Balasubramaniyan, V., Sailaja, J. K., and Nalini, N. (2003) Role of leptin on alcohol-induced oxidative stress in Swiss mice, *Pharmacol. Res.*, **47**, 211-216, doi: 10.1016/S1043-6618(02)00317-1.
25. Mousavi, S. R., Jafari, M., Rezaei, S., Agha-Alinejad, H., and Sobhani, V. (2020) Evaluation of the effects of different intensities of forced running wheel exercise on oxidative stress biomarkers in muscle, liver and serum of untrained rats, *Lab. Animal.*, **49**, 119-125, doi: 10.1038/s41684-020-0503-7.
26. Eshрати, R., Jafari, M., Gudarzi, S., Nazari, A., Samizadeh, E., and Ghafourian Hesami, M. (2021) Comparison of ameliorative effects of *Taraxacum syriacum* and N-acetylcysteine against acetaminophen-induced oxidative stress in rat liver and kidney, *J. Biochem.*, **169**, 337-350, doi: 10.1093/jb/mvaa107.
27. Isik, I., and Celik, I. (2008) Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*), *Pestic. Biochem. Physiol.*, **92**, 38-42, doi: 10.1016/j.pestbp.2008.06.001.
28. Abdou, H., and El Mazoudy, R. (2010) Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats, *J. Hazard Mater.*, **182**, 273-278, doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.026.
29. Astiz, M., de Alaniz, M. J., and Marra, C. A. (2009) Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **28**, 465-473, doi: 10.1016/j.etap.2009.07.009.
30. Varo, I., Navarro, J., Nunes, B., and Guilhermino, L. (2007) Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings, *Aquaculture*, **266**, 87-96, doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.02.045.
31. Jafari, M., Salehi, M., Ahmadi, S., Asgari, A., Abasnezhad, M., and Hajigholamali, M. (2012) The role of oxidative stress in diazinon-induced tissues toxicity in Wistar and Norway rats, *Toxicol. Mech. Methods*, **22**, 638-647, doi: 10.3109/15376516.2012.716090.
32. Nurulain, S. M., Ojha, S., Tekes, K., Shafiullah, M., Kalasz, H., and Adem, A. (2015) Efficacy of N-acetylcysteine, glutathione, and ascorbic acid in acute toxicity of paraoxon to Wistar rats: survival study, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2015**, 329306, doi: 10.1155/2015/329306.
33. Gholamloo, M., and Jafari, M. (2017) Study of effect of N-acetyl cysteine on reduction of paraoxon-induced oxidative stress in brain and heart tissues [in Persian], *Health Res.*, **2**, 77-85.
34. Salehi, M., Jafari, M., Asgari, A., and Rasouli, J. (2016) The impact of N-acetyl cysteine on paraoxon-induced oxidative stress in rat liver and kidney [in Persian], *J. Fasa Univ. Med. Sci.*, **6**, 35-43.
35. Kim, J.-R., Ryu, H.-H., Chung, H. J., Lee, J. H., Kim, S. W., Kwun, W. H., Baek, S.-H., and Kim, J. H. (2006) Association of anti-obesity activity of N-acetylcysteine with metallothionein-II down-regulation, *Exp. Mol. Med.*, **38**, 162-172, doi: 10.1038/emmm.2006.20.
36. Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, C. L., Newton, R. S., and La Du, B. (1999) Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants, *Free Radic Biol. Med.*, **26**, 892-904, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00272-X.
37. Jarvik, G. P., Tsai, N. T., McKinsty, L. A., Wani, R., Brophy, V. H., Richter, R. J., Schellenberg, G. D., Heagerty, P. J., Hatsukami, T. S., and Furlong, C. E. (2002) Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 1329-1333, doi: 10.1161/01.ATV.0000027101.40323.3A.
38. Sarandol, E., Serdar, Z., Dirican, M., and Safak, O. (2003) Effects of red wine consumption on serum paraoxonase/arylesterase activities and on lipoprotein oxidizability in healthy-men, *J. Nutr. Biochem.*, **14**, 507-512, doi: 10.1016/S0955-2863(03)00099-8.
39. Kleemola, P., Freese, R., Jauhiainen, M., Pahlman, R., Alfthan, G., and Mutanen, M. (2002) Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans, *Atherosclerosis*, **160**, 425-432, doi: 10.1016/S0021-9150(01)00594-9.

CUMULATIVE EFFECTS OF PARAOXON AND LEPTIN ON OXIDATIVE DAMAGES IN RAT TISSUES: PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC ROLES OF N-ACETYLCYSTEINE

S. Khazaie¹, M. Jafari^{2*}, M. Golamloo¹, A. Asgari³,
J. Heydari¹, M. Salehi⁴, and F. Salem¹

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran; E-mail: m.jafari145@gmail.com

³ Exercise Physiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Neurosciences Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Exposure to paraoxon (POX) and leptin (LP) could cause an imbalance between oxidants and antioxidants in an organism, which can be prevented by introduction of exogenous antioxidants such as N-acetylcysteine (NAC). The aim of this study was to evaluate synergic or additive effects of administration of exogenous LP plus POX on the antioxidant status, as well as the prophylactic and therapeutic roles of NAC in various rat tissues. Fifty-four male Wistar rats were divided into nine groups treated with different compounds: Control (no treatment), POX (0.7 mg/kg), NAC (160 mg/kg), LP (1 mg/kg), POX + LP, NAC-POX, POX-NAC, NAC-POX + LP, and POX + LP-NAC. In the last five groups, only the order of administered compounds differed. After 24 h, plasma and tissues were sampled and examined. The results showed that administration of POX plus LP significantly increased biochemical indices in plasma and antioxidant enzymes activities and decreased glutathione content in the liver, erythrocytes, brain, kidney, and heart. In addition, cholinesterase and paraoxonase 1 activities in the POX + LP-treated group were decreased and malondialdehyde level was increased in the liver, erythrocytes, and brain. However, administration of NAC rectified induced changes although not to the same extent. Our study suggests that POX or LP administration engage the oxidative stress system *per se*; however, their combination did not produce significantly greater effects. Moreover, both prophylactic and therapeutic treatments of rats with NAC supported the antioxidant defense against oxidative damage in tissues, most probably through both its free radical scavenging ability and maintaining intracellular GSH levels. It can therefore be suggested that NAC has particularly protective effects against POX or/and LP toxicity.

Keywords: paraoxon, leptin, N-acetylcysteine, oxidative stress, biochemical parameters, rat tissues

УЗНАВАНИЕ γ -СУБЪЕДИНИЦЫ β -СУБЪЕДИНИЦЕЙ. СТАБИЛИЗАЦИЯ GTP-СВЯЗАННОГО СОСТОЯНИЯ ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2 АРХЕЙ И ЭУКАРИОТ

© 2023 О.С. Никонов*, Е.Ю. Никонова, А.Г. Тарабарова, А.О. Михайлина,
О.В. Кравченко, Н.А. Невская, С.В. Никонов

Институт белка РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: alik@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 26.10.2022

После доработки 27.01.2023

Принята к публикации 28.01.2023

Фактор инициации трансляции 2 эукариот и архей (e/aIF2) функционирует как гетеротримерный комплекс. Он состоит из трех субъединиц (α , β , γ). Субъединицы α и β связаны с γ -субъединицей водородными связями и Ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, но не контактируют друг с другом. Хотя основные функции фактора выполняет γ -субъединица, надежное формирование $\alpha\gamma$ - и $\beta\gamma$ -комплексов необходимо для его правильного функционирования. В представленной работе мы внесли замены в структуру узнающей части $\beta\gamma$ -интерфейса и показали, что как у эукариот, так и у архей определяющую роль в узнавании субъединиц играет гидрофобный эффект. Форма и свойства ложбины на поверхности γ -субъединицы способствуют переходу неупорядоченной узнающей части β -субъединицы в α -спираль, содержащую примерно одинаковое число остатков у архей и эукариот. Кроме того, на основании вновь полученных данных был сделан вывод, что для архей и эукариот переход γ -субъединицы в активное состояние ведет к дополнительному контакту между ее переключателем 1 и C-концевой частью β -субъединицы, который стабилизирует спиральную конформацию переключателя.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фактор инициации трансляции 2, структура, $\beta\gamma$ -узнавание.

DOI: 10.31857/S0320972523020100, **EDN:** QHAGKH

ВВЕДЕНИЕ

У эукариот и архей фактор инициации трансляции 2 (e/aIF2) в GTP-связанной форме доставляет инициаторную метионил-тРНК на малую субчастицу рибосомы. Структурные перестройки, возникающие в 43S-комплексе, способствуют быстрому гидролизу GTP даже в отсутствие мРНК [1]. Однако только после узнавания старт-кодона и удаления неорганического фосфата (Pi) фактор e/aIF2 в GDP-связанной форме диссоциирует из инициаторного комплекса [2–3], оставляя инициаторную тРНК в Р-сайте малой рибосомной субчастицы и открывая возможности для дальнейших этапов биосинтеза белка.

Фактор инициации 2 функционирует как гетеротримерный комплекс. Он состоит из трех

субъединиц (α , β , γ). Наибольшая – γ -субъединица – отвечает за основные функции фактора. Она взаимодействует как с α -, так и с β -субъединицами, тогда как α - и β -субъединицы не имеют контакта друг с другом. Следовательно, в молекуле e/aIF2 имеются два межсубъединичных интерфейса, стабилизированных водородными связями и Ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. В данной статье мы будем рассматривать только $\beta\gamma$ -интерфейс.

В настоящее время известны кристаллические [4–6] и cryo-ЕМ [7–9] структуры, содержащие $\beta\gamma$ -комплексы архей и эукариот. Все эти комплексы характеризуются наличием в β -субъединице α -спирали, которая взаимодействует с гидрофобным пятном на поверхности γ -субъединицы, имеющим форму ложбины. Дно ложбины сформировано β -тяжем ($\beta 7$),

Принятые сокращения: e/aIF2 – фактор инициации трансляции 2; ZBD – домен цинкового пальца; GDPCP – аналог GTP; SPR – поверхностный плазмонный резонанс; Sce – *Saccharomyces cerevisiae*; Sso – *Sulfolobus solfataricus*; Hsa – *Homo sapiens*; WT – дикий тип.

* Адресат для корреспонденции.

а края — двумя α -спиралями ($\alpha 4$ и $\alpha 5$). Спираль β -субъединицы, содержащая в своем составе более половины гидрофобных остатков, укладывается в эту ложбину. Аминокислотные остатки, формирующие спираль β -субъединицы, располагаются на N -конце архейных последовательностей и в середине эукариотических последовательностей. Как у архей, так и у эукариот за спиралью следует длинная (порядка 20 а.о.) неупорядоченная часть структуры, которая переходит в центральный α/β -домен и домен цинкового пальца (ZBD).

Второй контакт между субъединицами найден на участке поверхности γ -субъединицы в месте расположения переключателя 1. Здесь с γ -субъединицей взаимодействует или центральный домен β -субъединицы [4], или цинк-связывающий домен [5, 8]. Контакт зависит от состояния субъединицы, поскольку переключатель 1 меняет свою конформацию при ее переходе из активной формы в пассивную [4–5]. Длинная N -концевая часть эукариотических β -субъединиц, по-видимому, не играет существенной роли в связывании γ -субъединиц, так как ранее было показано, что архейные β -субъединицы и C -концевая часть последовательностей эукариотических β -субъединиц содержат около 80 гомологичных остатков, и этой части структуры эукариотической β -субъединицы достаточно для связывания eIF2 γ [10]. Известно, что N -концевая часть человеческой β -субъединицы содержит 4 сайта фосфорилирования и 3 лизиновых кластера, которые необходимы для взаимодействия с eIF2B и мРНК [11–12]. О пространственной структуре N -концевой части β -субъединицы эукариот и ее контактах с γ -субъединицей информация полностью отсутствует.

Таким образом, имеющаяся структурная информация показывает, что узнавание и первичное связывание γ -субъединицы осуществляется областью β -субъединицы, соответствующей спирали $\alpha 1$ архейных субъединиц, так как только эта спираль сохраняет неизменное положение на поверхности γ -субъединицы во всех известных комплексах. Этот вывод подтверждается точечными мутациями в области остатков 128–150 β -субъединицы из *Saccharomyces cerevisiae* (SceIF2 β), которые показали, что замена 6 остатков на аланины исключает связывание субъединиц и летальна для клеток [13]. Единичные замены в цинковом пальце SceIF2 β ведут к изменению функции eIF2 в клетке [14–16].

Роль остатков ложбины γ -субъединицы в связывании β -субъединицы исследована недостаточно. Известно, что миссенс-мутация

I222T в γ -субъединице *Homo sapiens* (HsaIF2 γ) ведет к X-хромосомному неврологическому заболеванию, которое характеризуется умственной отсталостью и микроцефалией [17]. Замена находится в области, соответствующей участку архейной IF2 γ , который взаимодействует со спиралью $\alpha 1$. У дрожжей аналогичная мутация (V281T в SceIF2 γ) практически не влияет на рост клеток, но ухудшает правильный выбор старт-кодона и функционирование eIF2 *in vivo*, причем негативная роль указанной мутации может быть минимизирована оверэкспрессией гена, кодирующего eIF2 β . Исключающей образование $\beta\gamma$ -комплекса у дрожжей является замена V281K. В γ -субъединице фактора инициации 2 археи *Sulfolobus solfataricus* (SsoIF2 γ) миссенс-мутации соответствует замена I181T [17]. Определенная нами структура SsoIF2 γ , содержащая эту замену [18], показала отсутствие каких-либо видимых изменений в области, не подвергшейся мутации. Более того, мутант I181T связывался с β -субъединицей примерно с тем же сродством, что и дикий тип [18]. Таким образом, можно сделать вывод, что указанная замена по-разному влияет на формирование $\beta\gamma$ -комплексов в различных организмах. Структурные особенности субчастиц, ответственные за это, пока не выявлены.

В данной работе мы внесли замены в структуру узнающей части $\beta\gamma$ -интерфейса SsoIF2 γ и исследовали методом SPR связывание полученных мутантных форм с β -субъединицами IF2 *S. solfataricus*, *S. cerevisiae* и *H. sapiens*. В биохимических экспериментах использовались свободная γ -субъединица и комплекс SsoIF2 γ с аналогом GTP (GDPCP). Кроме того, нами была определена кристаллическая структура мутантной формы SsoIF2 γ I181K и сгенерирована процедурой AlphaFold2 модель мутантной формы V281K γ -субъединицы дрожжей.

Полученные биохимические и структурные данные показывают, что определяющее влияние на узнавание субъединиц оказывает изменение гидрофобности связывающихся поверхностей в узнающей части интерфейса. Так, заряженный атом лизина, отрицательно влияющий на формирование $\beta\gamma$ -комплекса в дрожжах, разрушает гидрофобное пятно ложбины SsoIF2 γ и SceIF2 γ без образования стерически недопустимых контактов с β -субъединицей. В то же время замена глицина на тирозин в этой части структуры (SsoIF2 γ G197Y) расширяет гидрофобное пятно и увеличивает сродство субъединиц.

Сродство субъединиц увеличивается также при использовании для образования ком-

плекса γ-субъединицы в активном состоянии за счет упорядочения переключателя 1 и его контакта с С-концевой частью β-субъединицы. По-видимому, этот контакт необходим для стабилизации структуры переключателя и минимизации неконтролируемого выхода монофосфата Pi из нуклеотид-связывающего кармана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение β-субъединиц и мутантных форм γ-субъединиц фактора инициации трансляции 2. Сайт-направленный мутагенез осуществляли методом QuikChange®. В качестве матриц использовали плазмиду pET-11a с геном, кодирующим полноразмерную γ-субъединицу фактора инициации трансляции 2 археи *S. solfataricus* дикого типа (SsoIF2γ WT), плазмиду pET-11a с геном γ-субъединицы фактора инициации трансляции 2 археи *S. solfataricus*, мутантной по 181 положению (SsoIF2γ I181T), а также плазмиду pET-11c с геном *EIF2S2* (ген полноразмерной β-субъединицы).

Для аминокислотной замены глицина на тирозин в 197-положении в генах белков SsoIF2γ WT и SsoIF2γ I181T использовали праймеры F1 и R1; для внесения последовательности из шести гистидинов (6× His-tag) на С-конец белка HsaIF2β использовали праймеры F2 и R2. Последовательности используемых праймеров («Евроген», Россия) указаны в табл. 1.

Полученными плазмидами трансформировали клетки *Escherichia coli* штамма XL1-blue. Наличие необходимых замен/вставок оценивали по результатам секвенирования.

Клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3)/Rosetta, трансформированные плазмидами, содержащими гены целевых белков, растили на аутоиндукционной среде, содержащей селективные антибиотики (ампициллин и хлорамфеникол) при 37 °С до оптической плотности (A600)

1,2–1,5 о.е./мл. По достижении нужного значения оптической плотности инкубацию клеток останавливали и удаляли жидкую культуральную среду путем центрифугирования при 11 000 g и 4 °С в течение 15 мин.

Клетки штаммов-суперпродуцентов ресуспендировали в буфере для лизиса клеток (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM β-МЭ, 10 mM MgCl₂, 5 mM ЭДТА, 1 M NaCl — для SsoIF2γ и SsoIF2β; 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 20 mM имидазола, 10 mM βМЭ — для HsaIF2β) в соотношении 1 г клеток на 5 мл буфера и разрушали ультразвуком («Fisher Scientific», США). Дебрис осаждали путем центрифугирования при 12 300 g в течение 30 мин при 4 °С. Для выделения SsoIF2γ, ее мутантных форм и SsoIF2β из супернатанта удаляли рибосомы (60 мин при 162 000 g, 4 °С) и прогревали при 60 °С в течение 10 мин. Денатурировавшие белки осаждали путем центрифугирования в течение 30 мин при 12 300 g, 4 °С. К супернатанту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,5 M, после чего проводили последовательную хроматографическую очистку в несколько этапов (очистка на бутил-сефарозе и гепарин-сефарозе) («GE Healthcare», Швеция). HsaIF2β очищали с помощью хроматографической очистки на Ni-сефарозе («GE Healthcare»). Финальной стадией очистки всех белков была гельфильтрационная хроматография на Superdex 200 («GE Healthcare»).

Получение комплексов мутантных форм SsoIF2γ с GDPCP. SsoIF2γ смешивали с GDPCP в молярном соотношении 1/1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин.

Оценка связывания β- и γ-субъединиц методом SPR. Мониторинг взаимодействия SsoIF2γ и ее мутантных форм с IF2β осуществляли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса на приборе ProteOn XPR36 («Bio-Rad», США). Эксперименты проводили при 25 °С. Для анализа кинетики белок-белкового взаимодействия методом SPR использовали ProteOn™ GLH Sensor Chip («Bio-Rad»).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров 5'→3'
F1	CATAAGATTAATATAGATTCTCTAATCGAATATATAGAAGAGTATATAAAAACTCCTTACAG
R1	CTGTAAGGAGTTTTTATATACTCTTCTATATATATTCGATTAGAGAATCTATATTAATCTTATG
F2	CCGTGCCAAAGCTAATCATCATCATCATCACTAAGGATCCGGCTGCTAACAAAGC
R2	GCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTTAGTGATGATGATGATGATGATGATTAGCTTTGGCACGG

Связывающая поверхность данного чипа состоит из уникальных модифицированных полисахаридов. Их карбоксильные группы активируются EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид) и сульфо-N-гидроксисукцинимидом для повышения эффективности связывания и для стабилизации аминокислотного продукта. Белок взаимодействует с чипом через аминокислотную группу, образуя амидную связь. Таким образом, обеспечивается высокая связывающая емкость чипа, а также высокое сохранение биологической активности белка. Концентрации белка, соответствующие каждой сенсограмме, различались не менее, чем в 3 раза. Скорость потока жидкости, содержащей белок, составляла 30 мкл/мин. Непосредственно после активации на чип иммобилизовали белок-лиганд в концентрации 0,1 мг/мл до 10 000 резонансных единиц в буфере, содержащем 10 мМ NaAc (pH 4,5). Свободные карбоксильные группы на чипе, с которыми не связался белок, деактивировали раствором 1 М EtHN₂-HCl (pH 8,5). Взаимодействие аналита с лигандом изучали в буфере, содержащем 20 мМ Hepes-NaOH (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0,05% (v/v) Tween-20. Отмывание исследуемого аналита от лиганда перед нанесением следующего проводили раствором 10 мМ Глицин-HCl (pH 2,2).

Кинетический анализ проводили с использованием 4–5 сенсограмм для одностадийной реакции с помощью обсчета (по Лангмюру) с коррекцией масс-транспорта. Обсчет каждого набора данных давал нам константы скоростей ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также рассчитываемую из них равновесную константу диссоциации ($K_D = k_a/k_d$). Полученный набор сенсограмм обсчитывали в программе BIAEvaluation с использованием модели гетерогенного лиганда.

Определение кристаллической структуры мутантной формы SsoIF2γ I181K. Процедура получения мутантной формы SsoIF2γ I181K, ее кристаллизация и определение структуры полностью аналогична процедуре, описанной для мутантной формы I181T [18]. Статистические характеристики дифракционного набора данных и кристаллографического уточнения даны в табл. 2.

Генерация модели мутантной формы IF2γ S. cerevisiae (SceIF2γ V281K). Модель была получена при помощи онлайн-сервиса: «ColabFold: AlphaFold2 using MMseqs2» [19]. Данный сервис предсказывает трехмерные структуры белков на основе их аминокислотных последовательностей, используя процедуру AlphaFold2 [20] с модифицированным

Таблица 2. Статистические характеристики набора дифракционных данных и кристаллографического уточнения SsoIF2γ I181K

Сбор и обработка данных	
Группа симметрии	I23
Параметры ячейки	
$a = b = c$, Å	186,86
$\alpha = \beta = \gamma$, °	90, 90, 90
Источник излучения	Bessy BL 14,1
Длина волны источника излучения, Å	0,9184
Число молекул в асимметричной части	1
Пределы разрешения, Å	40,71–2,18 (2,20–2,18)
Общее число отражений	56 426 (2851)
Полнота набора, %	100 (100)
Избыточность	11,39
Среднее $I/\sigma(I)$	14,24 (1,35)
Статистика уточнения	
Диапазон разрешения, Å	46,70–2,18 (2,20–2,18)
Число отражений	56 420 (2851)
Размер тестовой выборки, %	4,75
Rwork, %	16,8 (24,7)
Rfree, %	19,0 (28,6)
Средний температурный фактор, Å ²	29,1
Средние квадратичные отклонения	
Длины связей, Å	0,008
Валентные углы, °	1,136
Остатки на карте Рамачандрана	
Наиболее предпочтительные районы, %	98,0
Дополнительно разрешенные районы, %	2,0
PDB ID	6R8S

Примечание. Данные в скобках соответствуют интервалу наиболее высокого разрешения.

этапом поиска гомологичных последовательностей на основе процедуры MMseqs2 [21]. При построении модели для поиска шаблонов использовалась база данных PDB70 [22]. Минимизация энергии и уточнение геометрии полученной модели в рамках работы сервиса ColabFold производились с использованием силового поля AMBER [23]. Анализ и ручная правка всех молекулярных моделей проводились в программе Coot [24]. Иллюстрации созданы в программах Inkscape (Inkscape: Open Source Scalable Vector Graphics Editor, <https://www.inkscape.org>) и PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0 Schrödinger, LLC.)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор места точечных замен. Доступная в настоящее время структурная информация показывает, что ответственная за узнавание и первичное связывание часть $\beta\gamma$ -интерфейса содержит область β -субъединицы, соответствующую спирали $\alpha 1$ архейных субъединиц и гидрофобную ложбину на поверхности γ -субъединиц (рис. 1).

Точечные замены аминокислотных остатков в этой области способны оказать наибольшее влияние на связывание субъединиц. В наших экспериментах мутациям подвергались участки поверхности ложбины $\alpha\text{IF}2\gamma$, находящиеся на

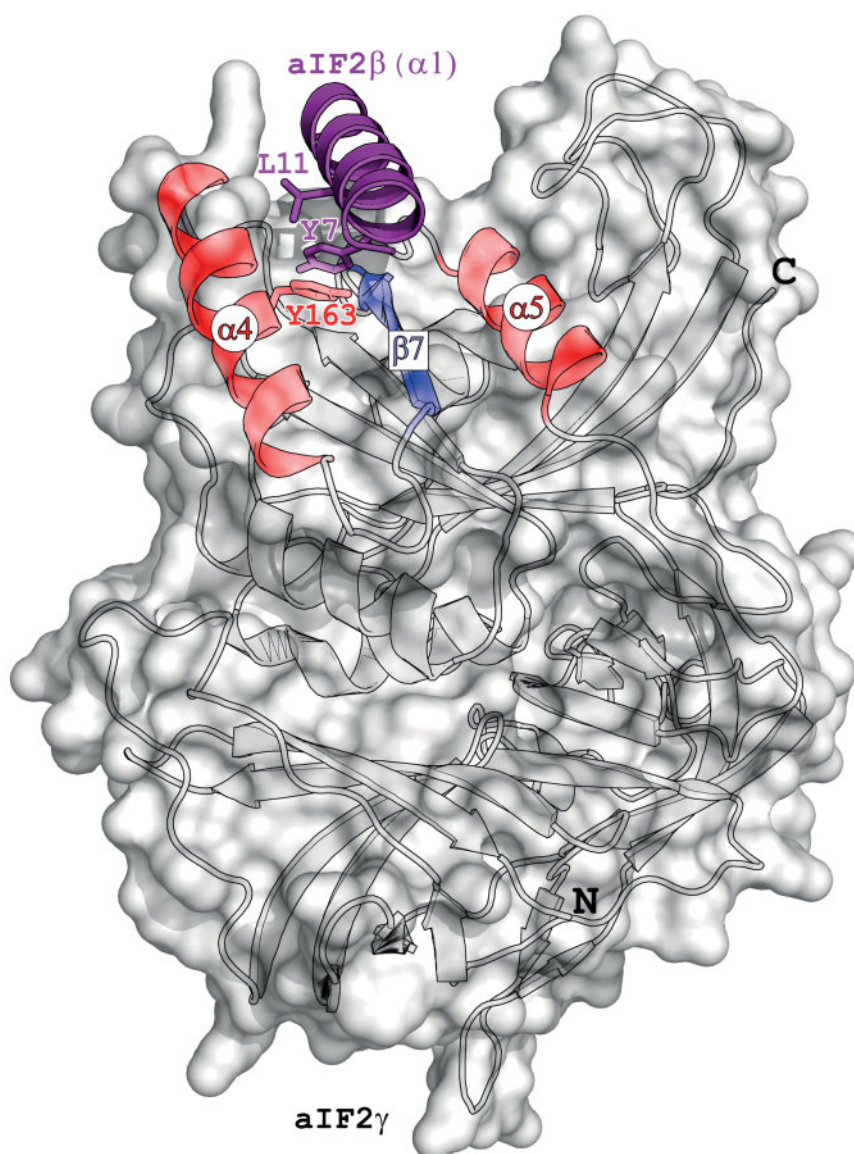


Рис. 1. Место специфического контакта SsoIF2 γ и SsoIF2 β (PDB ID: 2qmu, [18]). Гидрофобная поверхность специфического контакта со стороны γ -субъединицы формируется остатками β -тяжа $\beta 7$ и α -спиралей $\alpha 4$ и $\alpha 5$. Со стороны β -субъединицы в образовании контакта участвует N-концевая спираль $\alpha 1$. Показаны остатки, предположительно, ответственные за формирование первого зародышевого витка спирали $\alpha 1$ β -субъединицы при ее взаимодействии с γ -субъединицей

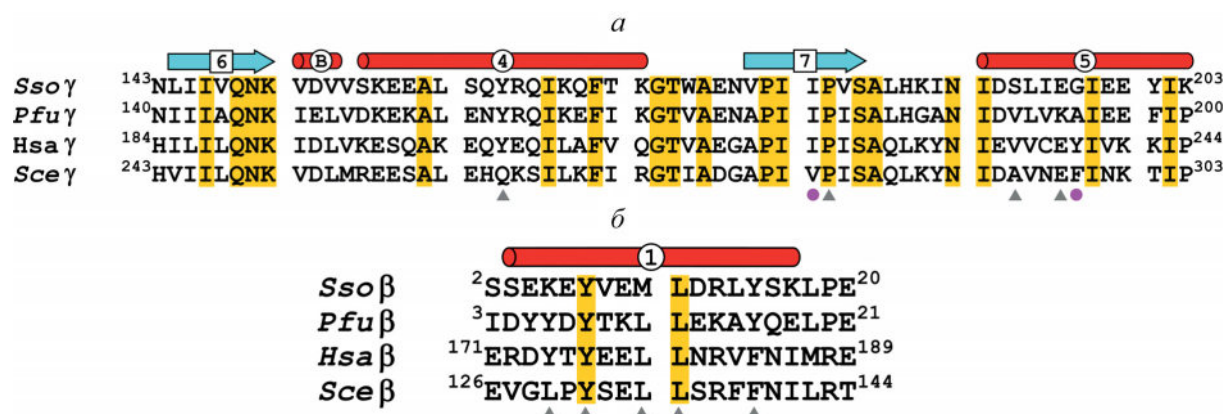


Рис. 2. Сравнение последовательностей фрагментов αIF2 и eIF2, ответственных за формирование βγ-интерфейса. Для фрагментов аминокислотной последовательности SsoIF2 указано расположение и нумерация элементов вторичной структуры (стрелки — для β-тяжей и цилиндры — для α-спиралей). *a* — Сравнение последовательностей части G-домена архейных и эукариотических белков. Для SsoIF2 (*Sulfolobus solfataricus*), PfuIF2 (*Pyrococcus furiosus*), MjaIF2 (*Methanococcus jannaschii*) и PabIF2 (*Pyrococcus abyssi*) доступны кристаллические структуры; для SceIF2 (*Saccharomyces cerevisiae*) и HsaIF2 (*Homo sapiens*) — ЕМ-структуры низкого разрешения. Желтым цветом показаны идентичные остатки. Помечены остатки, подвергавшиеся мутациям (I181T, I181K, G197Y) в SsoIF2γ (розовые кружочки) и остатки, рассматриваемые в тексте (серые треугольники). *b* — Сравнение последовательностей участка β-субъединицы архейных и эукариотических белков, ответственного за связывание γ-субъединицы. Раскраска остатков на обеих панелях идентична.

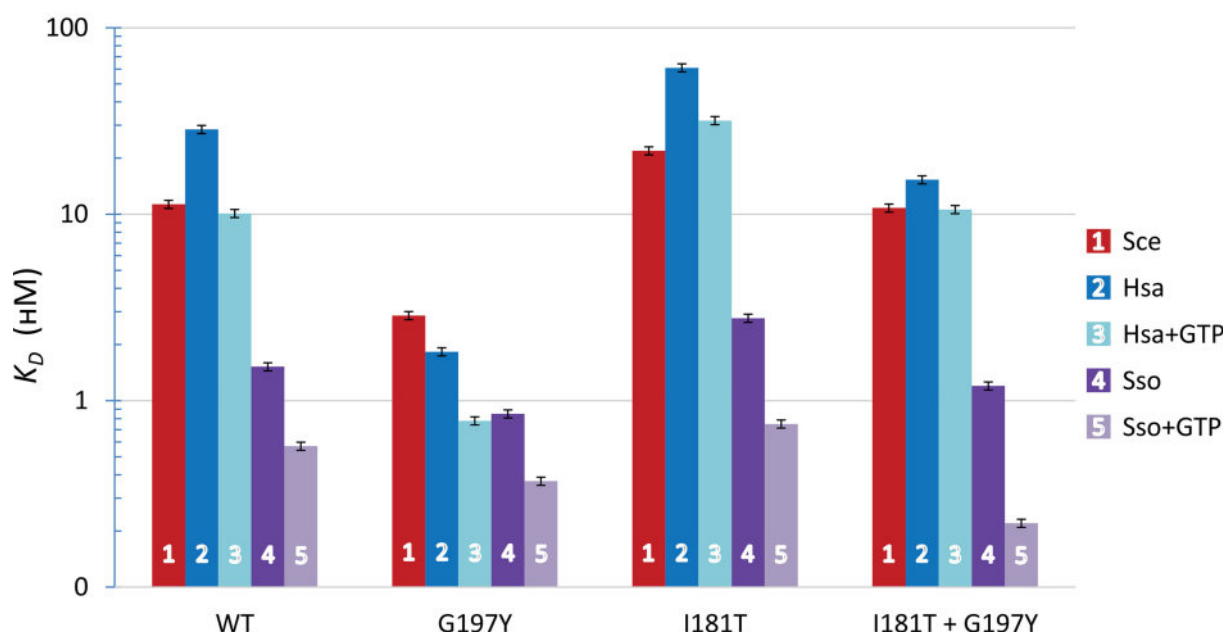


Рис. 3. Равновесные константы диссоциации комплексов SsoIF2γ дикого типа (WT) и его мутантных форм с β-субъединицами из разных организмов

ее дне и одном из краев. Фрагменты аминокислотных последовательностей ряда архей и эукариот, соответствующих этой части βγ-интерфейса, приведены на рис. 2, *a*.

С целью унификации полученных данных в качестве одного из партнеров в исследуемых βγ-комплексах использована структура SsoIF2γ. Для этого белка было показано [25–26], что конформация участка его структуры, соответствующего ложбине, в которую укладывается α-спираль β-субъединицы, не зависит от функционального состояния

белка (GTP-связанного, GDP-связанного или свободного). Для наших исследований были выбраны свободный и связанный с нерасщепляемым аналогом GTP (GDPCP) SsoIF2γ. В аминокислотной последовательности SsoIF2γ сделаны замены: G197Y, I181T и двойная замена I181T + G197Y. Первая замена заполняет выемку на боковой поверхности ложбины SsoIF2γ между N190 и Y201 (рис. 1 и 2) и наблюдается в HsaIF2γ-субъединице, вторая — соответствует ранее обсуждавшейся миссенс-мутации.

Таблица 3. Взаимодействие SsoIF2γ дикого типа (WT) и его мутантных форм с β-субъединицами из разных организмов

SsoIF2γ	e/aIF2β	$k_a \times 10^5, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_d \times 10^{-3}, \text{s}^{-1}$	$K_D \times 10^{-9}, \text{M}$
WT	Sce	3,84	4,33	11,30
	Hsa	1,39 (1,46)	3,97 (1,47)	28,50 (10,1)
	Sso	5,12 (6,97)	0,78 (0,45)	1,52 (0,64)
G197Y	Sce	3,65	1,04	2,86
	Hsa	7,41 (6,83)	1,35 (0,53)	1,83 (0,78)
	Sso	5,95 (7,36)	0,51 (0,27)	0,85 (0,37)
I181T	Sce	4,65	10,20	21,90
	Hsa	0,78 (1,01)	4,74 (3,22)	61,00 (31,8)
	Sso	5,28 (5,42)	1,45 (0,87)	2,77 (1,61)
I181T + G197Y	Sce	2,24	2,42	10,80
	Hsa	1,75 (1,07)	2,69 (1,14)	15,30 (10,6)
	Sso	6,06 (7,08)	0,73 (0,45)	1,20 (0,63)

Примечание. Данные в скобках соответствуют βγ-комплексам, содержащим активную форму SsoIF2γ (SsoIF2γ–GDP-CP).

В качестве другого партнера в βγ-комплексах были использованы молекулы SsoIF2β, HsaIF2β и SceIF2β, так как для них имеются структуры, содержащие βγ-интерфейс [7–9], и описано влияние миссенс-мутации [17] на функционирование eIF2. Взаимодействие SsoIF2γ дикого типа и его мутантных форм с β-субъединицами дикого типа из трех разных организмов анализировали, используя метод SPR. Данные анализа представлены в табл. 3 и в виде гистограммы на рис. 3. Влияние переключателя 1 γ-субъединицы на связывание β-субъединицы оценивали аналогичным способом, используя в качестве одного из партнеров комплекс SsoIF2γ с нерасщепляемым аналогом GTP (табл. 3, рис. 3).

Анализ комплексов, образованных SsoIF2γ и его мутантными формами с IF2β архей и эукариот. Дрожжевая и человеческая β-субъединицы связываются с SsoIF2γ дикого типа с близким сродством, тогда как сродство архейных субъединиц на порядок выше в основном за счет уменьшения константы скорости диссоциации. Пониженная стабильность комплексов с эукариотическими IF2β, по всей видимости, связана с потерей водородной связи, возникшей из-за замены Y15F (номенклатура SsoIF2β) в их β-субъединицах (рис. 2, б). Следует также отметить, что константа скорости ассоциации для SceIF2β почти в 3 раза выше, чем для HsaIF2β.

Увеличение гидрофобной поверхности за счет замены G197Y в SsoIF2γ кардинально меняет картину связывания, особенно для HsaIF2β. Константа скорости ассоциации для этой субъединицы увеличивается более чем в 5 раз, а константа скорости диссоциации уменьшается почти в 3 раза. Для SceIF2β изменения в связывании заметно умереннее, возможно, потому что в последовательности дрожжевой γ-субъединицы в аналогичном положении находится фенилаланин, который лучше, чем тирозин, вписывается в структуру нативного комплекса. В результате замены G197Y сродство β-субъединиц из разных организмов становится приблизительно одинаковым, что подтверждает отсутствие специфического контакта между N-концевой частью эукариотических β-субъединиц и γ-субъединицей [10]. Кроме того, эта замена указывает на существенную, а, возможно, и определяющую роль гидрофобного эффекта в связывании субъединиц, влияние которого заметно даже в комплексе SsoIF2γ–SsoIF2β, в котором сродство субъединиц увеличивается почти в 2 раза. Более того, отсутствие значительных расхождений в константах связывания указывает на то, что в разных организмах замены аминокислотных остатков в узнающей части βγ-интерфейса, по-видимому, происходят согласованно.

Значительный интерес для нас представляла замена I181T в SsoIF2γ, которая, как уже

отмечалось ранее, соответствует миссенс-мутации I222T в HsaIF2 γ . Для комплекса, образованного архейной β -субъединицей с этой мутантной формой, замена I181T оказалась несущественной (табл. 3), что подтверждает полученные ранее результаты [18]. По-видимому, это связано с тем, что T181 контактирует с M10 β -субъединицы, который компенсирует появление полярного остатка на дне ложбины SsoIF2 γ . В то же время замена I181T в SsoIF2 γ заметно ухудшила сродство эукариотических β -субъединиц к этой мутантной форме γ -субъединицы. В комплексах, образованных этими субъединицами, напротив T181 находится лейцин, и практически недоступный воде полярный остаток T181 не имеет возможности образовать водородную связь.

Двойная замена I181T + G197Y позволяет оценить влияние миссенс-мутации на связывание субъединиц в эукариотических комплексах. По причинам, изложенным выше, влияние двойной замены корректнее сравнивать с данными, относящимися к мутантной форме G197Y SsoIF2 γ . Замена I181T примерно в 4 раза ухудшает сродство SsoIF2 β к этой мутантной форме, тогда как для HsaIF2 β наблюдается ухудшение почти в 10 раз. Эти данные полностью соответствуют полученным ранее результатам [17]. На связывание субъединиц в природном архейном комплексе SsoIF2 γ –SsoIF2 β двойная замена практически не влияет.

Переход SsoIF2 γ в GTP-связанное (активное) состояние увеличивает сродство β - и γ -субъединиц (табл. 3). Как известно, только в этом состоянии переключатель 1 SsoIF2 γ имеет спиральную конформацию, в остальных состояниях он не упорядочен. Для $\beta\gamma$ -комплексов, образованных как дикой, так и мутантными формами γ -субъединицы, наблюдается уменьшение константы скорости диссоциации, что указывает на контакт этого переключателя с β -субъединицей.

Влияние замены I/V на K в IF2 γ у архей и эукариот. Ранее [17] было показано, что в дрожжах замена V281K (I222 – в человеческом факторе инициации 2 и I181 – в *S. solfataricus*) летальна для функционирования фактора. Возможны два варианта отрицательного влияния этой замены: нарушение контакта между субъединицами за счет удлинения боковой цепи остатка в положении 281 или ухудшение узнавания за счет введения заряженного атома в гидрофобное пятно на поверхности γ -субъединицы. Чтобы решить эту дилемму, мы сделали в SsoIF2 γ замену I181K и определили кристаллическую структуру этой мутантной формы.

Как и следовало ожидать, в полученной структуре изменения коснулись только места замены. По отношению к полярному атому T181 заряженный атом K181 сместился на 3,7 Å в сторону E196 и образовал водородную связь с S193, однако наложение этой структуры на структуру $\beta\gamma$ -комплекса *S. solfataricus* (PDB ID: 2qmu) никаких дополнительных контактов со спиралью $\alpha 1$ не обнаружило (рис. 4, а).

Используя процедуру AlphaFold, мы сгенерировали модель γ -субъединицы дрожжевого фактора инициации 2 с заменой V281K (рис. 4, б). Сравнение этой модели с мутантной формой SsoIF2 γ I181K показывает, что в дрожжевом белке боковая цепь K281 из-за близкого контакта с боковой цепью F297 меняет конформацию, смещаясь в сторону узнающей спирали β -субъединицы. Тем не менее заряженный атом азота не выступает за пределы поверхности ложбины, располагаясь между неполярными атомами P282, A293 и F297. Наложение полученной модели на структуру $\beta\gamma$ -комплекса дрожжей (PDB ID: 6i3m) показывает, что заряженный атом K281 располагается напротив L134 узнающей спирали β -субъединицы (рис. 4, б). Стерически недопустимых контактов между субъединицами нет.

Эти данные позволяют считать, что замена изолейцина/валина на лизин в IF2 γ как у архей, так и у эукариот не создает стерически запрещенных контактов в узнающей части $\beta\gamma$ -интерфейса, а искажает гидрофобную поверхность ложбины на поверхности γ -субъединицы, что препятствует ее узнаванию β -субъединицей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возможный механизм узнавания γ -субъединицы β -субъединицей. Полученные нами данные подтверждают важную роль ложбины на поверхности γ -субъединицы в узнавании β -субъединицы. Интерфейс со стороны обеих молекул (рис. 1 и 2) содержит значительное число гидрофобных остатков, которые в процессе связывания стремятся сформировать межсубъединичное гидрофобное ядро. Изменение степени гидрофобности поверхности ложбины сразу же сказывается на изменении сродства субъединиц, особенно в случае человеческого фактора инициации 2. Комплекс при этом формируется, хотя и с ухудшенными характеристиками. Поэтому увеличение концентрации β -субъединиц может скомпенсировать нарушение гидрофобности ложбины, что и было показано для SsoIF2. В то же время

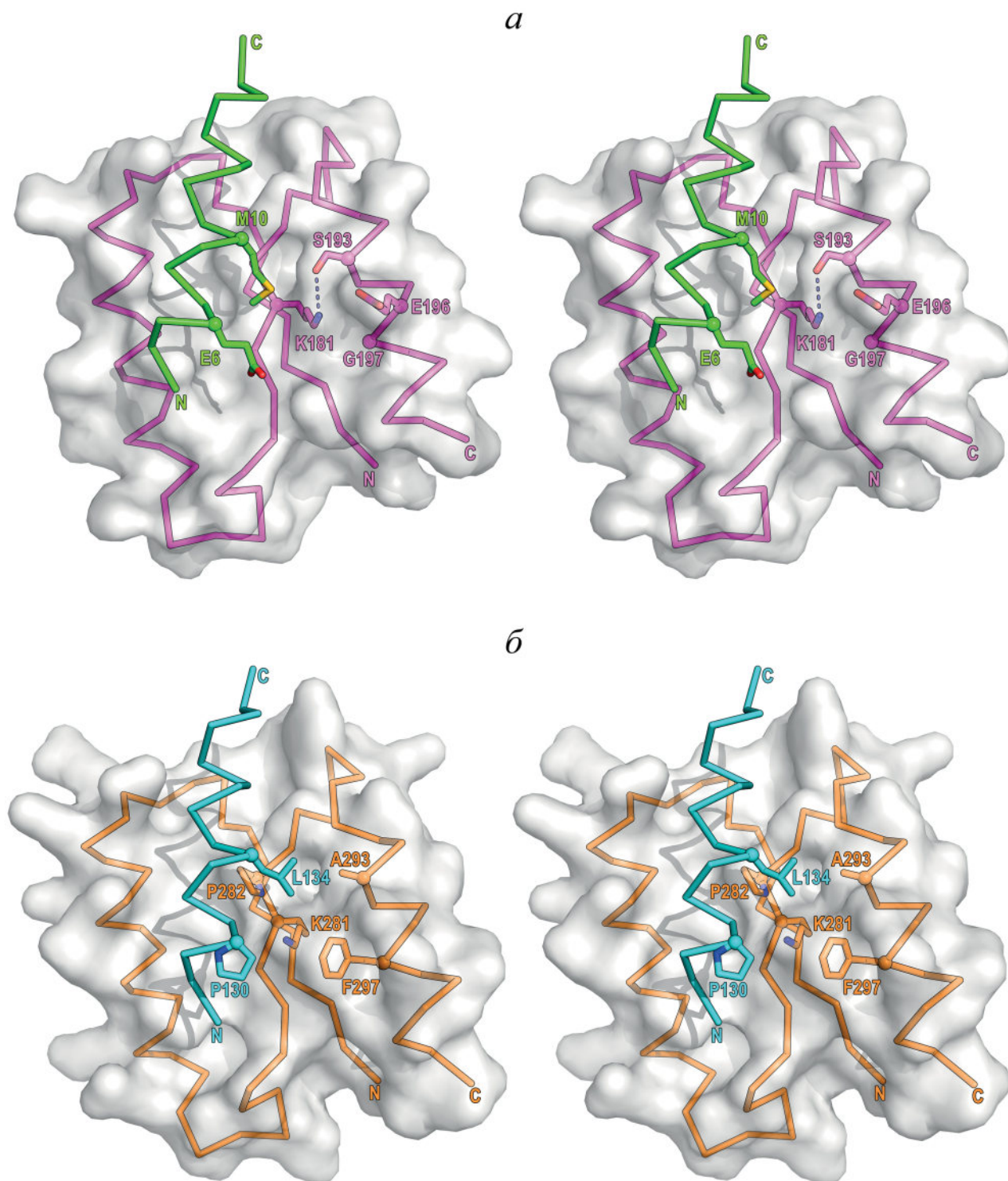


Рис. 4. Модели узнающей части $\beta\gamma$ -интерфейса. *a* — Архейный комплекс, образованный мутантной формой SsoIF2 γ I181K (малиновый цвет) со спиралью α 1 (зеленый цвет) β -субъединицы. Положение спирали α 1 получено путем наложения мутантной формы на структуру $\beta\gamma$ -комплекса *S. solfataricus* (PDB ID: 2qmu). Лизин в позиции 181 формирует водородную связь с S193. Заряженный атом азота K181 не образует выступа на поверхности ложбины и не имеет недопустимых контактов со спиралью α 1 β -субъединицы. *б* — Дрожжевой комплекс, образованный мутантной формой SceIF2 γ V281K (оранжевый цвет) с узнающей спиралью β -субъединицы (голубой цвет). Положение спирали получено в результате наложения мутантной формы на структуру $\beta\gamma$ -комплекса *S. cerevisiae* (PDB ID: 6i3m). Боковая цепь лизина не образует выступа на поверхности и не имеет недопустимых контактов с узнающей спиралью β -субъединицы. Замена метионина (M10 в SsoIF2 β) на лейцин (L134) в β -субъединице дрожжей усиливает отталкивающее влияние лизина

замена I281K в дрожжевом факторе, нарушающая конформацию и свойства поверхности ложбины, полностью исключает связывание субъединиц [17].

Поверхность ложбины имеет форму полуцилиндра и структурно комплементарна поверхности спирали (рис. 1 и 3). Однако узнавание не может осуществляться по механизму структурной комплементарности поверхностей, так как ЯМР-структуры из двух разных организмов [27–28] показывают, что *N*-концевая часть молекулы архейных β -субъединиц в растворе неупорядочена. Рассмотрим возможный механизм узнавания на примере SsoIF2.

Спираль $\alpha 1$ SsoIF2 β содержит строго консервативные Y7 и L11 (рис. 2, б), причем в качестве узнающего элемента, скорее всего, выступает Y7. Определяющую роль этого остатка также подтверждают результаты замен в области спирали $\alpha 1$ SceIF2 β [13]. Для Y7 на спирали $\alpha 4$ aIF2 γ имеется специфическое место, обеспечивающее его стекинг с Y163 (рис. 1), кроме того, Y7 образует водородную связь с Q148 (рис. 2, а). На поверхности ложбины aIF2 γ Y7 и L11 SsoIF2 β вместе, скорее всего, формируют первый зародышевый виток спирали $\alpha 1$, а форма и свойства ложбины обеспечивают рост спирали с обоих концов. Наличие в кристаллических структурах aIF2 β длинного неупорядоченного участка между спиралью $\alpha 1$ и центральным доменом позволяет компенсировать конформационные изменения, вызванные переходом контактной области из неупорядоченного в спиральное состояние без значительных энергетических затрат на перемещения центрального домена и домена цинкового пальца. Эта часть молекулы aIF2 в кристаллах гетеротримерных комплексов архей либо не видна [5], либо не имеет строго определенной конформации [6]. Следовательно, ложбина на поверхности γ -субъединицы формирует спираль β -субъединицы и, таким образом, выступает в роли молекулярного шаперона.

Замены в $\beta\gamma$ -интерфейсе показывают, что определяющую роль в узнавании и связывании субъединиц играет гидрофобный эффект. Появление полярного остатка на дне ложбины ухудшает связывание β -субъединицы, а появление там заряженного остатка в эукариотических факторах полностью исключает образование $\beta\gamma$ -комплекса. В то же время замена глицина на тирозин на одном из склонов ложбины повышает сродство субъединиц. Поэтому устранение отрицательного влияния миссенс-мутации I222T в γ -субъединице человеческого фактора инициации 2 возможно

только путем лекарств, повышающих гидрофобность поверхностей, формирующих узнающую часть $\beta\gamma$ -интерфейса.

Роль центрального и цинк-связывающего доменов в функционировании e/aIF2. Анализ структур $\beta\gamma$ -гетеродимеров [4–5, 8], содержащих центральный и цинк-связывающий домены β -субъединицы, позволяет заключить, что в этих структурах β -субъединица взаимодействует с функционально важным участком γ -субъединицы — переключателем 1. Эти данные подтверждаются результатами SPR-анализа, которые показывают, что β -субъединица связывается с комплексом SsoIF2 γ –GDPСР прочнее, чем со свободным белком. В гетеродимере *Pyrococcus furiosus* (Pfu) во взаимодействии участвует ее центральный домен, а ZBD направлен в раствор; в структурах *S. solfataricus* и *H. sapiens*, наоборот, с γ -субъединицей взаимодействует ZBD, хотя и в разных ориентациях. Ранее [5] было высказано предположение, что для архей различие в контактах может быть функциональным, хотя и не исключалось влияние кристаллической упаковки [29]. Структура человеческого фактора инициации трансляции 2 позволяет по-новому взглянуть на эту проблему. Суть в том, что в случае *P. furiosus* мы имеем дело с γ -субъединицей в GDP-связанном состоянии, в случае *S. solfataricus* — в промежуточном и в случае *H. sapiens* — в GTP-связанном состоянии. В GDP-связанном состоянии переключатель 1 разупорядочен, и прямой контакт между ним и β -субъединицей отсутствует, тогда как в GTP-связанном состоянии переключатель упорядочен и формирует ряд контактов с ZBD. Эти контакты стабилизируют переключатель в GTP-форме и, по-видимому, препятствуют ложному срабатыванию фактора и преждевременному освобождению мРНК. Замены в ZBD, нарушающие контакт с переключателем 1 [14, 16], ведут к увеличению внутренней GTPазной активности SceIF2 и значительно ухудшают связывание инициаторной тРНК. Отсюда можно сделать вывод, что GTP-связанное состояние изолированной e/aIF2 γ нестабильно, и для ее нормального функционирования требуется контакт с цинк-связывающим доменом β -субъединицы. Поэтому целостность фактора так важна для его эффективного функционирования [17].

Вклад авторов. С.В. Никонов — руководство работой; Е.Ю. Никонова, А.Г. Тарабарова, О.С. Никонов — проведение экспериментов; А.О. Михайлина — проведение SPR-измерений; О.С. Никонов, Н.А. Невская, С.В. Никонов — обсуждение результатов исследования.

ния; О.С. Никонов — оформление рисунков; С.В. Никонов, Н.А. Невская — написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование было выполнено в рамках ГЗ ИБ РАН № АААА-А19-119122490038-8.

Благодарности. Авторы благодарят Столбوشкину Е.А. за предоставление плазмид рЕТ-11а с геном, кодирующим гамма-субъединицу фактора инициации трансляции 2 археи *S. solfataricus* дикого типа, рЕТ-11а с геном гамма-субъединицы фактора инициации трансляции 2 археи *S. solfataricus*, мутантной по 181-положению,

а также рЕТ-11с с геном *EIF2S2*; Джус У.Ф. — за предоставление препарата белка SceIF2 β ; Габдулхакова А.Г. — за сбор дифракционных данных.

Выражаем благодарность Пермякову С.Е. за возможность проводить эксперименты на приборе ProteOn XPR36 в Институте биологического приборостроения РАН.

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. Algire, M. A., Maag, D., and Lorsch, J. R. (2005) Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation, *Mol. Cell*, **20**, 251-262, doi: 10.1016/j.molcel.2005.09.08.
2. Kapp, L. D., and Lorsch, J. R. (2004) The molecular mechanisms of eukaryotic translation, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 657-704, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419.
3. Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 113-127, doi: 10.1038/nrm2838.
4. Sokabe, M., Yao, M., Sakai, N., Toya, S., and Tanaka, I. (2006) Structure of archaeal translational initiation factor 2bg-GDP reveals significant conformational change of the b-subunit and switch 1 region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13016-13021, doi: 10.1073/pnas.0604165103.
5. Yatime, L., Mechulam, Y., Blanquet, S., and Schmitt, E. (2007) Structure of an archaeal heterotrimeric initiation factor 2 reveals a nucleotide state between the GTP and the GDP states, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18445-18450, doi: 10.1073/pnas.0706784104.
6. Stolboushkina, E., Nikonov, S., Nikulin, A., Bläsi, U., Manstein, D. J., Fedorov, R., Garber, M., and Nikonov, O. (2008) Crystal structure of the intact archaeal translation initiation factor 2 demonstrates very high conformational flexibility in the α - and β -subunits, *J. Mol. Biol.*, **382**, 680-691, doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.039.
7. Adomavicius, T., Guaita, M., Zhou, Y., Jennings, M. D., Latif, Z., Roseman, A. M., and Pavitt, G. D. (2019) The structural basis of translational control by eIF2 phosphorylation, *Nat. Commun.*, **10**, 2136-2146, doi: 10.1038/s41467-019-10167-3.
8. Querido, J., Sokabe, M., Kraatz, S., Gordiyenko, Y., Skehel, J. M., Fraser, C., and Ramakrishnan, V. (2020) Structure of a human 48S translational initiation complex, *Science*, **369**, 1220-1227, doi: 10.1126/science.aba4904.
9. Thoms, M., Buschauer, R., Ameisemeier, M., Koepke, L., Denk, T., Hirschenberger, M., Kratzat, H., Hyan, M., Mackens-Kiani, T., Cheng, J., Straub, J. H., Sturzel, C. M., Frohlich, T., Berninghausen, O., Becker, T., Kirchhoff, F., Sparrer, K. M. J., and Beckmann, R. (2020) Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2, *Science*, **369**, 1249-1255, doi: 10.1126/science.abc8665.
10. Thompson, G. M., Pacheco, E., Melo, E. O., and Castilho, B. A. (2000) Conserved sequences in the β subunit of archaeal and eukaryal translation initiation factor 2 (eIF2), absent from eIF5, mediate interaction with eIF2 γ , *Biochem. J.*, **347**, 703-709, doi: 10.1042/bj3470703.
11. Kashiwagi, K., Yokoyama, T., Nishimoto, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Yonemochi, M., Shirouzu, M., and Ito, T. (2019) Structural basis for eIF2B inhibition in integrated stress response, *Science*, **364**, 495-499, doi: 10.1126/science.AAW4104.
12. Laurino, J. P., Thompson, G. M., Pacheco, E., and Castilho, B. A. (1999) The β subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 binds mRNA through the lysine repeats and a region comprising the C₂-C₂ motif, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 173-181, doi: 10.1128/mcb.19.1.173.
13. Hashimoto, N. N., Carnevali, L. S., and Castilho, B. A. (2002) Translation initiation at non-AUG codons mediated by a weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits, *Biochem. J.*, **367**, 359-368, doi: 10.1042/bj20020556.
14. Huang, H. K., Yoon, H., Hanning, E. M., and Donahue, T. F. (1997) GTP hydrolysis controls stringent selection of the AUG start codon during translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Dev.*, **11**, 2396-2413, doi: 10.1101/gad.11.18.2396.
15. Donahue, T. F., Cigan, A. M., Pabich, E. K., and Valavicius, B. C. (1988) Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF-2 β gene alter ribosomal start-

- site selection during the scanning process, *Cell*, **54**, 621-632, doi: 10.1016/s0092-8674(88)80006-0.
16. Castilho-Valavicius, B., Thompson, G. M., and Donahue, T. F. (1992) Mutation analysis of the Cys-X2-Cys-X19-Cys-X2-Cys motif in the β subunit of eukaryotic translation initiation factor 2, *Gene Expr.*, **2**, 297-309.
 17. Borck, G., Shin, B.-S., Stiller, B., Mimouni-Bloch, A., Thiele, H., Kim, J.-R., Thakur, M., Skinner, C., Aschenbach, L., Smirin-Yosef, P., Har-Zabav, A., Nurnberg, G., Altmuller, J., Frommolt, P., Hofmann, K., Konen, O., Nurnberg, P., Munnich, A., Schwartz, C. E., Gothelf, D., Colleaus, L., Dever, T. E., Kubisch, C., and Basel-Vanagaite, L. (2012) eIF2 γ mutation that disrupts eIF2 complex integrity links intellectual disability to impaired translation initiation, *Mol. Cell*, **48**, 641-646, doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.005.
 18. Никонов О. С., Кравченко О. В., Невская Н. А., Столбоушкина Е. А., Гарбер М. Б., Никонов С. В. (2021) Влияние миссенс-мутации Ile222Thr в SsoIF2 на сходство γ - и β -субъединиц aIF2, *Кристаллография*, **66**, 772-776, doi: 10.31857/S0023476121050155.
 19. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., and Steinegger, M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all, *Nat. Methods*, **19**, 679-682, doi: 10.1038/s41592-022-01488-1.
 20. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583-589, doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
 21. Mirdita, M., Steinegger, M., and Söding, J. (2019) MMseqs2 desktop and local web server app for fast, interactive sequence searches, *Bioinformatics*, **35**, 2856-2858, doi: 10.1093/bioinformatics/bty1057.
 22. Steinegger, M., Meier, M., Mirdita, M., Vöhringer, H., Haunsberger, S. J., and Söding, J. (2019) HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation, *BMC Bioinformatics*, **20**, 473, doi: 10.1186/s12859-019-3019-7.
 23. Eastman, P., Swails, J., Chodera, J. D., McGibbon, R. T., Zhao, Y., Beauchamp, K.A., Wang, L.-P., Simmonett, A. C., Harrigan, M. P., Stern, C. D., Wiewiora, R. P., Brooks, B. R., and Pande, V. S. (2017) OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics, *PLOS Comput. Biol.*, **13**, e1005659, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005659.
 24. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W., and Cowtan, K. (2010) Features and Development of Coot, *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 486-501, doi: 10.1107/S0907444910007493.
 25. Nikonov, O., Stolboushkina, E., Arkhipova, V., Kravchenko, O., Nikonov, S., and Garber, M. (2014) Conformational transitions in the γ subunit of the archaeal translation initiation factor 2, *Acta Cryst.*, **D70**, 658-667, doi: 10.1107/S1399004713032240.
 26. Dubiez, E., Aleksandrov, A., Lazennec-Schurdevin, C., Mechulam, Y., and Schmitt, E. (2015) Identification of a second GTP-bound magnesium ion in archaeal initiation factor 2, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 2946-2957, doi: 10.1093/nar/gkv053.
 27. Gutierrez, P., Osborne, M.J., Siddiqui, N., Trempe, J. F., Arrowsmith, C. and Gehring, K. (2004) Structure of the archaeal translation initiation factor aIF2 β from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: implications for translation initiation, *Protein Sci.*, **13**, 659-667, doi: 10.1110/ps.03506604.
 28. Vasile, F., Pechkova, E., and Nicolini, C. (2008) Solution structure of the β -subunit of the translation initiation factor aIF2 from archaeobacteria *Sulfolobus solfataricus*, *Proteins*, **70**, 1112-1115, doi: 10.1002/Prot.21797.
 29. Schmitt, E., Naveau, M., and Mechulam, Y. (2010) Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: a heterotrimeric tRNA carrier, *FEBS Lett.*, **584**, 405-412, doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.002.

RECOGNITION OF γ -SUBUNIT BY β -SUBUNIT. STABILIZATION OF THE GTP-BOUND STATE OF TRANSLATION INITIATION FACTOR 2 IN ARCHAEA AND EUKARYOTES

O. S. Nikonov*, E. Yu. Nikonova, A. G. Tarabarova, A. O. Mikhaylina,
O. V. Kravchenko, N. A. Nevskaya, and S. V. Nikonov

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: alik@vega.protres.ru*

Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2 (e/aIF2) functions as a heterotrimeric complex. It consists of three subunits (α , β , γ). The α - and β -subunits are linked to the γ -subunit by hydrogen bonds

and van der Waals interactions, but do not contact each other. Although the main functions of the factor are performed by the γ -subunit reliable formation of $\alpha\gamma$ - and $\beta\gamma$ -complexes is necessary for its proper functioning. In this work, we made mutations in the recognition part of the $\beta\gamma$ interface and showed that both in eukaryotes and archaea, the hydrophobic effect plays a decisive role in the recognition of subunits. The shape and properties of the hollow on the surface of the γ -subunit facilitates the transition of the disordered recognition part of the β -subunit into the α -helix containing approximately the same number of residues in archaea and eukaryotes. In addition, based on the newly obtained data, it was concluded that in archaea and eukaryotes, the transition of the γ -subunit to the active state leads to additional contact between its switch 1 and the C-terminal part of the β -subunit, which stabilizes the helical conformation of the switch.

Keywords: translation initiation factor 2, structure, $\beta\gamma$ recognition

ЛЕЧЕБНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЦЕННЫХ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИНФЕКЦИИ COVID-19

Обзор

© 2023 D. Sruthi^{1*}, M. Dhanalakshmi², H. Ch. Y. Rao¹, R. Parthasarathy¹,
Sh. P. Deepanraj³, C. Jayabaskaran¹

¹ Department of Biochemistry, Indian Institute of Science,
560012 Bengaluru, Karnataka, India; e-mail: sruthi.skylarks@gmail.com

² Research and Development Centre, Bharathiar University,
641046 Marudhamalai Road, Coimbatore, Tamil Nadu, India

³ Department of Biological Sciences, Tata Institute for Genetics and Society,
Instem building, National Centre for Biological Sciences Campus, 560065 Bengaluru, Karnataka, India

Поступила в редакцию 12.09.2022

После доработки 10.12.2022

Принята к публикации 28.12.2022

Лекарственные растения, относящиеся к категории «традиционной медицины», и содержащиеся в них химические соединения, перспективные в плане использования в медицине, являются потенциальными средствами от различных проблем со здоровьем. Благодаря своей сложной структуре и огромной пользе для здоровья ценные метаболиты растительного происхождения, которые в совокупности называются «фитохимическими веществами», стали важным источником для обнаружения и разработки новых лекарств. Однако некоторые лекарственные растения из различных природных источников всё ещё находятся в категории «малоизученных» с точки зрения механизмов их биологической активности и терапевтического потенциала. Коронавирусная инфекция (COVID-19), вызванная вирусом SARS-CoV-2, о которой впервые сообщили в ноябре 2019 г., привела к пугающему числу смертей (6,61 миллиона человек). Впоследствии эта болезнь была объявлена пандемией, и её распространение продолжается до сегодняшнего дня. Несмотря на то что развитый научный мир успешно внедрил вакцины против COVID-19 за короткий период времени, всё больше внимания уделяется альтернативным средствам для долгосрочного лечения симптомов и повышения иммунитета. На данный момент вмешательства, основанные на традиционной медицине, которые включают лекарственные растения, их биоактивные метаболиты, экстракты и составы, привлекли большое внимание в качестве альтернативных решений для лечения COVID-19. В настоящей работе нами рассмотрены полученные в последнее время результаты исследований, касающиеся эффективности использования фитохимических веществ в профилактике и лечении COVID-19. Кроме того, также обсуждается литература о механизмах профилактического или терапевтического действия этих природных фитохимических веществ. В заключение мы предполагаем, что активные компоненты растительного происхождения можно использовать по отдельности или в различных сочетаниях в качестве альтернативного решения для лечения инфекции SARS-CoV-2. Более того, структурные данные этих природных продуктов могут быть использованы для разработки новых стратегий, направленных на профилактику коронавирусной инфекции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: продукты натурального происхождения, ценные фитохимические продукты, терпеноиды, алкалоиды, фенолы, лекарственные растения, COVID-19.

DOI: 10.31857/S0320972523020112, **EDN:** QHDBLQ

ВВЕДЕНИЕ

В ноябре 2019 г. был выявлен первый случай респираторной инфекции, вызванной ко-

ронавирусом 2, связанным с тяжёлым острым респираторным синдромом (SARS-CoV-2). Это заболевание (позже названное коронавирусом 2019 г., COrona VIRus Disease

Принятые сокращения: 3CLpro – chymotrypsin-like protease, химотрипсин-подобная протеаза; PLpro – papain-like protease, папаин-подобная протеаза; RdRp – RNA-dependent RNA polymerase, РНК-зависимая РНК-полимераза; SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, коронавирус, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром.

* Адресат для корреспонденции.

of 2019, COVID-19) распространилось по всему миру, получило статус пандемии и продолжается до сегодняшнего дня. Поскольку были быстро получены и затем успешно и широко внедрены вакцины, а стратегии лечения разработаны во всем мире, то замешательство и проблемы, имевшие место на ранней стадии этой пандемии, были устранены. Тем не менее различные волны этой инфекции по-прежнему поражают многих людей. В Индии последняя волна вызвана субвариантами омикрон BA.2 и BA.2.38, а также наблюдается рост случаев выявления субвариантов BA.4 и BA.5. Действительно, сейчас нельзя определённо сказать, насколько долго будет там сохраняться эта инфекция. Кроме того, нехватка медицинских ресурсов в некоторых развивающихся странах может препятствовать использованию в них международно признанных стратегий лечения [1]. Поэтому, в дополнение к существующим стратегиям лечения, существует потребность в поддержании больных COVID-19 в течение длительного времени и в стратегиях повышения иммунитета для профилактики коронавирусной инфекции. В этом контексте фитотерапия может быть альтернативным решением при лечении больных COVID-19 с учётом уровня медицинской помощи в каждой стране. Приблизительно 80% населения мира по-прежнему зависит от традиционных средств для решения проблем со здоровьем [2]. Доказано, что травы способны поддерживать иммунитет организма [3]. Химический состав лекарственных растений чрезвычайно сложен. Этот вопрос решается путём выделения, идентификации и определения полезных свойств фитохимических веществ растения. В Китае значимость фитотерапии была признана уже в первые дни пандемии COVID-19, и 90% подвергшихся лечению пациентов выздоровели. Также сообщалось о профилактических свойствах некоторых традиционных лекарственных средств, защищающих здоровых людей от инфекции, вызванной SARS-CoV-2 [4, 5]. Традиционные лекарственные средства из Китая, такие как лянхуа цинвэнь (Lianhuaqingwen) и шуфэн цзеду (Shufeng Jiedu), также были рекомендованы, учитывая их эффективность против вирусов H₁N₁ или SARS-CoV-1, для лечения больных COVID-19 [6]. Использование травяных сборов и лекарственных растений было рекомендовано в качестве мер профилактики COVID-19, а также для лечения коронавирусной инфекции [7]. Руководства по использованию традиционных и растительных лекарственных средств для лечения симптомов и профилактики

COVID-19 уже были изданы в Китае, Индии и Южной Корее [3].

Поскольку высокоактивные фитохимические вещества вносят вклад в эффективность применения в лечении вышеупомянутых методов фитотерапии, в данном обзоре делается попытка изучить потенциал этих фитохимических натуральных продуктов в вопросе противодействия коронавирусной инфекции. Обсуждая предыдущие исследования и полученные экспериментальные данные, мы тем самым привлекаем внимание исследователей к полезным фитохимическим веществам как мощному источнику средств для борьбы с COVID-19 — как для профилактики, так и для лечения болезни.

МЕТОДЫ

В настоящей работе представлен систематический обзор текущего состояния научных публикаций, касающихся эффективности применения фитохимических веществ при COVID-19. Подбор литературы для этой обзорной статьи был проведён с использованием Интернет-источников, таких как PubMed Central, Google Scholar, ScienceDirect и поисковая система Google. При осуществлении поиска были использованы следующие ключевые слова: COVID-19; Corona virus review; phytochemicals and COVID-19; natural products against COVID-19; medicinal plants and COVID-19; traditional medicine and COVID-19; herbal medicine and COVID-19. Поиск статей проводился в период с января по июнь 2022 г., отобранные статьи были изучены. Статьи, которые удовлетворяли целям настоящего обзора, подвергались дальнейшему отбору и систематическому обобщению. Структуры фитохимических соединений были получены с использованием программы ChemSketch.

ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ COVID-19

Отдельные фитохимические вещества, в основном вторичные метаболиты, рассматриваются в качестве средств профилактики коронавирусной инфекции и ингибиторов SARS-CoV-2. В следующих разделах обсуждаются литературные данные об использовании против инфекции COVID-19 трёх важных классов вторичных метаболитов растений, а именно терпеноидов, алкалоидов и фенолов (рис. 1).



Рис. 1. Потенциальные классы фитохимических веществ и вторичные метаболиты, обсуждаемые в связи с корона-вирусной инфекцией

ТЕРПЕНЫ (ТЕРПЕНОИДЫ)

Терпены, являющиеся производными изопрена (C_5H_8), составляют самый большой класс вторичных метаболитов растений. Ацетил-КоА является предшественником синтеза терпенов в метаболических путях образования мевалонатов или изопреноидов. В зависимости от количества изопреновых звеньев различают несколько типов терпенов (гемитерпены, монотерпены, сесквитерпены, дитерпены, сестертерпены, тритерпены, тетратерпены и политерпены). Терпеноиды имеют большое коммерческое и терапевтическое значение [8]. В следующих подразделах объясняются результаты исследований эффективности терпеноидных фитохимических веществ при COVID-19.

Дитерпеноиды. Восемь дитерпеноидных соединений (хинокиол, 18-гидроксиферругинол, ферругинол, 18-оксоферругинол, метилдегидроабиеат, каядиол, О-ацетил-18-гидроксиферругинол и изопимаровая кислота), выделенных из ценной с медицинской точки зрения *Torreya nucifera*, были протестированы на ингибирующую активность в отношении белка 3CLpro вируса SARS-CoV-2 (SARS-CoV-3CLpro). Установлено, что эти соединения являются эффективными ингибиторами этой протеазы, а их значения IC_{50} находятся в диапазоне от 49,6 до 283,5 мкМ. Среди протестированных соединений наиболее сильным ингибитором (IC_{50} 49,6 мкМ) оказался ферругинол [9]. С помощью методов *in silico* терпеноидные соединения 22-гидроксигопан-3-он и 6-оксоизоигестерин, выделенные из африканских растений, вместе с двумя алкалоидами (10-гидроксиусамбарензин, криптохиндолин) были

идентифицированы как мощные ингибиторы SARS-CoV-3CLpro [10].

Химотрипсин-подобная протеаза 3CLpro (SARS-CoV-3CLpro) и папаин-подобная протеаза PLpro (SARS-CoV-PLpro) являются неструктурными белками, закодированными в геноме SARS-CoV-2, которые необходимы для репликации вируса. Этот факт привлек внимание исследователей к этим белкам как потенциальным лекарственным мишеням для борьбы с коронавирусной инфекцией [11]. Белки, связанные с жизненным циклом вируса SARS-CoV-2, могут быть потенциальными мишенями для действия противовирусных препаратов. Следовательно, соединения, способные ингибировать эти протеазы, эффективны против инфекции SARS-CoV-2 [12].

Таншиноны. Таншиноны представляют собой дитерпены. С использованием метода флуориметрии было изучено ингибирующее действие семи таншинонов (метилтаншинонат, криптотаншинон, розмарихинон, дигидротаншинон I, таншиноны I, IIА и IIВ), выделенных из н-гексановой фракции *Salvia miltiorrhiza*, в отношении вирусных белков SARS-CoV-PLpro и SARS-CoV-3CLpro. Было показано, что эти таншиноны являются сильными ингибиторами как PLpro, так и 3CLpro. Они проявляли зависящую от времени ингибирующую активность (IC_{50} 0,8–30 мкМ) в отношении белка PLpro и дозозависимую и не зависящую от времени активность в отношении 3CLpro (IC_{50} 14,4–89,1 мкМ). Среди них криптотаншинон и дигидротаншинон I были идентифицированы как наиболее мощные ингибиторы протеаз PLpro (IC_{50} $0,8 \pm 0,2$ мкМ) и 3CLpro (IC_{50} $14,4 \pm 0,7$ мкМ) соответственно.

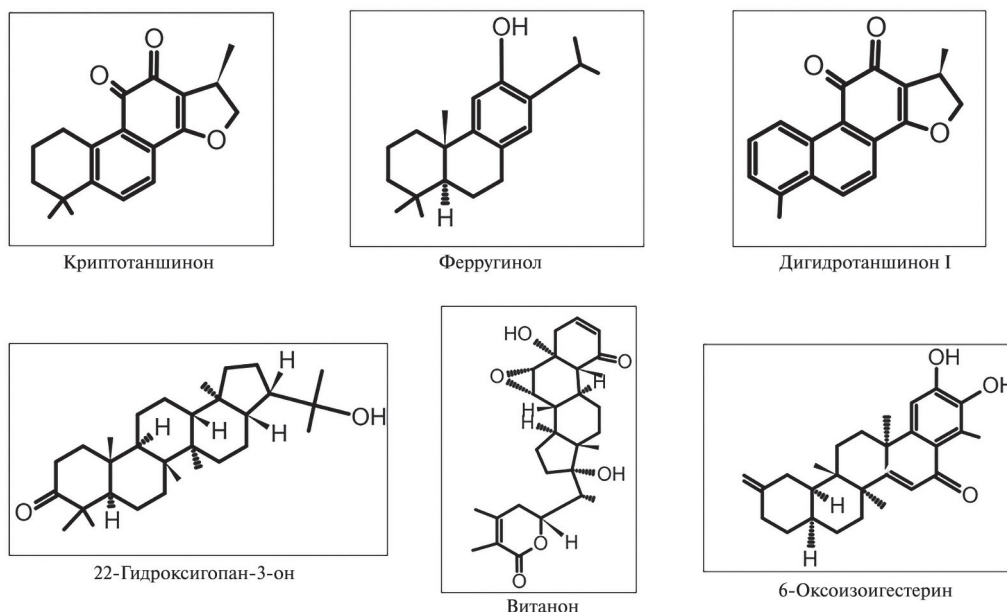


Рис. 2. Структуры терпеноидных соединений, потенциально эффективных против COVID-19

Кинетические исследования показали, что для розмарихинона характерно обратимое ингибирование смешанного типа, в то время как другие таншиноны демонстрировали картину неконкурентного ингибирования белка SARS-CoV-PLpro. В то же время все изученные таншиноны были идентифицированы как неконкурентные ингибиторы белка SARS-CoV-3CLpro [13].

Сапонины. С коронавирусной инфекцией всегда ассоциируются острые воспалительные процессы и выброс провоспалительных цитокинов. Следовательно, природные соединения, обладающие противовоспалительным действием, могут рассматриваться как потенциальные препараты для лечения этих вирусных инфекций [11]. Были изучены противовоспалительные и антикоронавирусные эффекты эсцинов (смеси тритерпеноидных сапонинов) из семян *Aesculus turbinata*, используемых в качестве фитотерапевтических средств (EC_{50} 6,0 мкМ) [11, 14]. Однако в клетках лёгких человека были выявлены серьёзные цитотоксические последствия действия эсцинов, что снизило вероятность их использования в качестве профилактического средства. В то же время на основе исходного природного продукта можно разработать более безопасный и мощный препарат, обладающий искомой активностью [11]. Так, были разработаны и синтезированы производные эсцина без тиглоильных или англоильных групп (имеющих решающее значение для проявления цитотоксического действия эсцинов) и с модифицированными гликозидными связями. Эти производные эсцина обладали более низкой цитотоксичностью [15].

Витанон. TMPRSS2 (трансмембранная сериновая протеаза 2) является ферментом организма-хозяина, который облегчает проникновение вирусных частиц в его клетки. Ингибирование этого фермента фактически является задачей, решение которой может помочь ингибировать как проникновение вируса в клетки, так и дальнейшее заражение организма-хозяина [11]. Способность витанона, стероидного лактона из *Withania somnifera* (Ashwagandha), связываться и стабильно взаимодействовать с каталитическим сайтом белка TMPRSS2 была показана с использованием метода молекулярного докинга и молекулярной динамики [16]. Дополнительное исследование влияния витанона на экспрессию TMPRSS2 в клетках MCF7 показало, что это соединение значительно подавляет экспрессию в обработанных клетках мРНК TMPRSS2, что свидетельствует о двойном действии витанона, блокирующего проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетки организма-хозяина.

Структуры вышеупомянутых терпеноидных соединений, потенциально эффективных против COVID-19, представлены на рис. 2.

АЛКАЛОИДЫ

Алкалоиды представляют собой физиологически активные, гетерогенные и гетероциклические вторичные метаболиты растений. В их состав входят фитохимические вещества с терапевтическим, питательным, токсикологическим и косметическим потенциалом [8].

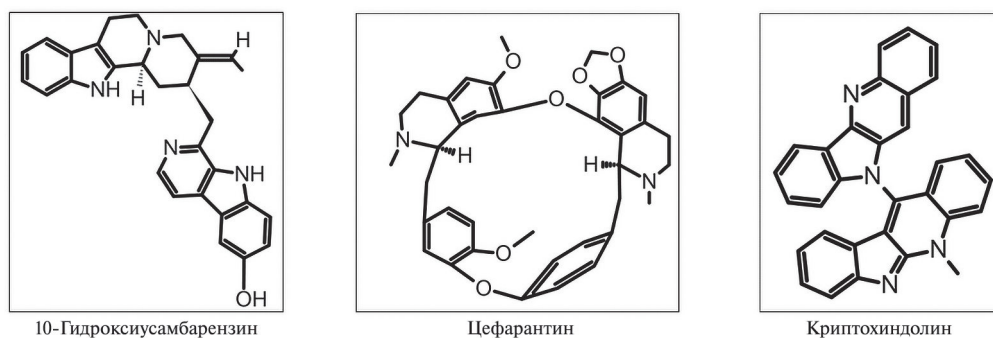


Рис. 3. Структуры алкалоидов с потенциальным действием против COVID-19

Эффективность различных алкалоидов также была изучена в отношении COVID-19. Цефарантин представляет собой тетрандриновый алкалоид, выделенный из растения *Stephania tetrandra*. Ранее уже сообщалось, что он обладает антиоксидантной и противовоспалительной активностью [17]. Были созданы гомологичные модели для проведения виртуального скрининга, и благодаря этому была выявлена способность цефарантина связываться с активными карманами интерфейса SARS-CoV-2 NSP12-NSP8 [18]. С помощью методов *in silico* алкалоиды 10-гидроксиусамбарензин и криптохиндолин из африканских растений были идентифицированы как высокоактивные ингибиторы протеазы SARS-CoV-2-3CLpro [10]. На рис. 3 представлены структуры алкалоидных соединений, которые могут быть потенциально эффективны при COVID-19.

ФЕНОЛЫ

Фенолы — это широко распространённый класс вторичных метаболитов, включающий более 8000 биологически активных фитохимических веществ, существующих в виде свободных фенолов или их гликозидов. Фенолы являются производными фенилаланина, и их синтез происходит в фенилпропаноидном метаболическом пути. В этот класс химических соединений входят простые фенолы, фенольные кислоты, гидроксикоричные кислоты, фенилуксусные кислоты, фенилпропены, хиноны, кумарины, стильбены, лигнаны, ксантоны, неолигнаны, танины, меланины и флавоноиды [8]. В следующих разделах обсуждаются фенол-содержащие соединения, изученные на предмет их эффективности для защиты от COVID-19. На рис. 4 представлены отдельные фенолсодержащие соединения, которые, как сообщается, эффективны против COVID-19.

РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) является ключевой вирусной репликазой, ко-

торая фактически катализирует синтез комплементарных цепей РНК с использованием вирусной РНК в качестве матрицы [11]. Молекулярная структура RdRp была опубликована в мае 2020 г. [19], что привело к появлению новой стратегии для разработки средств профилактики коронавирусной инфекции. С помощью метода молекулярного докинга был изучен потенциал восьми фенольных соединений (галловая кислота, кверцетин, бензойная кислота, ресвератрол, нарингенин, олеуропеин, кофеин и эллаговая кислота) как ингибиторов RdRp SARS-CoV-2 [20]. Показано, что эти соединения (кроме олеуропеина и кофеина) образуют водородные связи с аминокислотными остатками RdRp, формирующими входной канал для нуклеозидтрифосфатов. Кверцетин и галловая кислота продемонстрировали высокую аффинность связывания с RdRp, хорошие фармакокинетические свойства и сходство с лекарственными средствами. Следовательно, они могут рассматриваться как потенциальные кандидаты в лекарства для лечения больных COVID-19. Библиотека, содержащая 720 природных соединений, была протестирована с помощью ВЭЖХ и анализа флуорогенных субстратных пептидов на их способность ингибировать протеазу SARS-CoV-3CLpro [21]. Было идентифицировано два эффективных полифенольных соединения чёрного чая, а именно дубильная кислота и теафлавин-3,3'-дигаллат со значениями IC_{50} 3 мкМ и 7 мкМ соответственно.

Флавоноиды. Показано, что шесть флавоноидов (бавахинин, необаваизофлавонон, изообавахалкон, 40'-О-метилбавахалкон, псоралидин и кориолифол А), выделенных из этанольного экстракта семян *Psoralea corylifolia*, обладают способностью ингибировать активность белка SARS-CoV-PLpro. Эти флавоноиды продемонстрировали многообещающее дозозависимое ингибирующее действие на протеазу PLpro. Наибольшую активность показали псоралидин и изообавахалкон со значениями

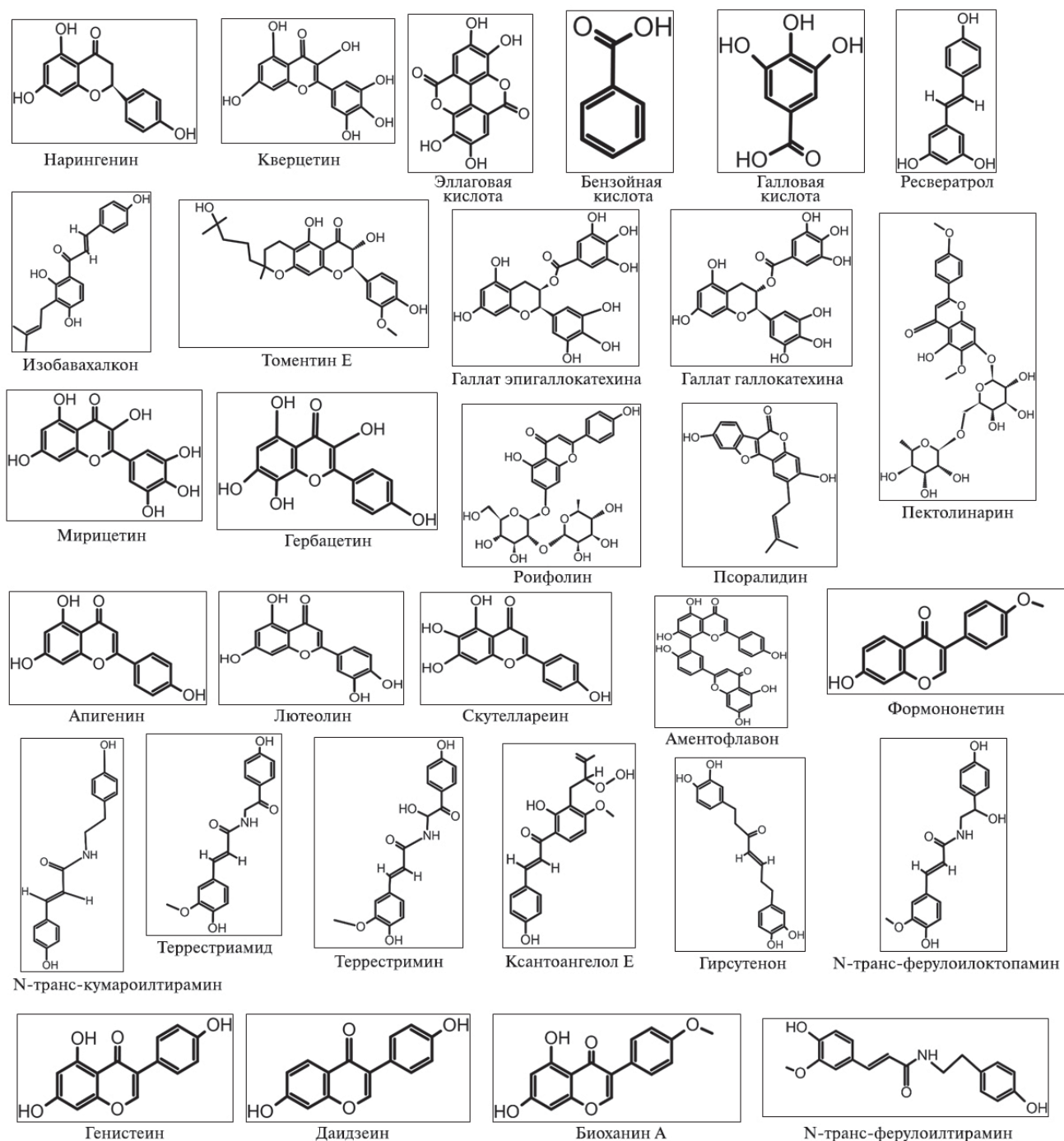


Рис. 4. Структуры фенолсодержащих фитохимических соединений, потенциально эффективных против COVID-19

IC_{50} $4,2 \pm 1,0$ мкМ и $7,3 \pm 0,8$ мкМ соответственно [22]. Кроме того, из плодов *Paulownia tomentosa* были выделены и очищены пять геранилированных флавоноидов (томентини от А до Е), а также было изучено их ингибирующее действие на белок SARS-CoV-PLpro. Все пять соединений продемонстрировали дозозависимое ингибирование активности фермента (IC_{50} 5,0–14,4 мкМ), а томентин Е оказался чрезвычайно эффективным ингибитором с очень низким значением IC_{50} $5,0 \pm 0,06$ мкМ [23].

Было изучено влияние семи флавоноидов (пуэрарин, кверцетин, даидзеин, галлат эпигаллокатехина, галлат галлокатехина, ампе-лопсин и эпигаллокатехин) на коронавирусный белок 3CLpro. В работе был использован очищенный белок 3CLpro, экспрессированный в клетках *Pichia pastoris*. Среди изученных флавоноидов хорошей анти-3CLpro активностью обладают галлат эпигаллокатехина, галлат галлокатехина и кверцетин (IC_{50} 73, 47 и 73 мкМ соответственно) [24]. Поскольку протеаза

3CLpro играет решающую роль в процессе репликации SARS-CoV-2, то этот белок можно рассматривать как потенциальную терапевтическую мишень для разработки препаратов, эффективных при лечении COVID-19 [12]. Оценку эффективности ингибирования различными флавоноидами активности белка SARS-CoV-3CLpro осуществляли с использованием метода FRET. Среди них наиболее высокие значения эффективности ингибирования показали роифолин (флавоон), гербацетин (флавонол) и пектолинарин (флавоон) (IC_{50} 27,45, 33,17 и 37,78 мкМ соответственно). Дальнейшие исследования с помощью метода молекулярного докинга также показали, что эти флавоноиды обладают сродством к белку SARS-CoV-3CLpro [25]. При оценке 64 молекул, происходящих из 15 видов лекарственных растений, на предмет их ингибирующего действия в отношении хеликазы SARS-CoV было показано, что два флавоноидных соединения, мирицетин и скутеллареин, в значительной мере ингибируют активность хеликазы SARS-CoV. В концентрации 10 мкМ мирицетин (IC_{50} $2,71 \pm 0,19$ мкМ) и скутеллареин (IC_{50} $0,86 \pm 0,48$ мкМ) были способны ингибировать хеликазу SARS-CoV [26]. Учитывая, что эта хеликаза является ключевым белком для репликации генома SARS-CoV, этот фермент может стать мишенью для разработки новых противовирусных препаратов. Соответственно, скутеллареин и мирицетин были предложены в качестве перспективных препаратов против ОРВИ [12].

С помощью метода FRET было изучено ингибирование цистеиновой протеазы 3CLpro и потенциальное ингибирующее влияние на коронавирус SARS-CoV четырёх бифлавоноидов (билобетин, аментофлавоон, сциадопитизин и гинкгетин) из листьев *Torreya nucifera* [9]. Все бифлавоноиды в значительной мере ингибировали протеазу 3CLpro (IC_{50} 8,3–72,3 мкМ), а аментофлавоон оказывал самый высокий ингибирующий эффект с самым низким значением IC_{50} ($8,3 \pm 1,2$ мкМ). Кроме того, методом молекулярного докинга было показано, что аментофлавоон имеет высокое сродство к белку SARS-CoV-3CLpro и образует прочные водородные связи. Авторы также сообщили об ингибирующей активности ряда флавонов (лютеолин, апигенин и кверцетин) в отношении белка SARS-CoV-3CLpro со значениями IC_{50} 20,2, 280,8 и 23,8 мкМ соответственно. Сравнение их действия с эффектом аментофлавоона выявило, что аментофлавоон является наиболее мощным ингибитором SARS-CoV-3CLpro.

Халконы и кумарины. Девять алкилированных халконов (4-гидроксидеррицин, изобавахалкон, ксантоангелол, ксантокеистал А, ксантоангелол D, F, E, G и В) и четыре кумарина из *Angelica keiskei* были исследованы на предмет их ингибирующей активности в отношении белков SARS-CoV-PLpro и SARS-CoV-3CLpro [27]. Если испытанные кумарины оказались неэффективными, то алкилированные халконы проявляли сильное дозозависимое действие в отношении этих протеаз (IC_{50} $1,2 \pm 0,4$ – $46,4 \pm 7,8$ мкМ для PLpro и $11,4 \pm 1,4$ – $129,8 \pm 10,3$ мкМ для 3CLpro). Среди них наиболее активным в отношении обеих протеаз был ксантоангелол Е с очень низкими значениями IC_{50} ($1,2 \pm 0,4$ мкМ для PLpro и $11,4 \pm 1,4$ мкМ для 3CLpro). Следовательно, это природное соединение может быть перспективным кандидатом на роль лекарственного средства для лечения больных COVID-19.

Диарилгептаноиды. Оценивалось ингибирующее действие девяти диарилгептаноидов (гирсутенон, платифилленон, платифиллон, гирсутанол, платифиллонол-5-ксилопиранозид, рубранол, орегонин, рубранозид А и В), очищенных из этанольного экстракта *Alnus japonica*, против SARS-CoV-PLpro. Среди этих выделенных соединений наиболее выраженным ингибирующим действием (IC_{50} $4,1 \pm 0,3$ мкМ) обладал гирсутенон, эффект которого оказался сравнимым с действием известного ингибитора вирусных протеаз куркумина (IC_{50} $5,7 \pm 0,3$ мкМ) [28].

Флоротаннины. С помощью метода бесклеточного анализа было изучено ингибирование белка SARS-CoV-3CLpro девятью флоротаннинами (трифлоретол А, флороглюцин, экол, 2-флорозкол, диоксиндегидрозкол, диэкол, фукодифлорозтол G, 7-флорозкол и флорофукфурозкол А), экстрагированных и выделенных из бурой водоросли *Ecklonia cava*. Все флоротаннины, за исключением флороглюцина, дозозависимо и конкурентно ингибировали протеазу SARS-CoV-3CLpro (IC_{50} $2,7 \pm 0,6$ – $164,7 \pm 10,8$ мкМ), а диэкол оказался наиболее мощным ингибитором этого фермента [29].

Фитоэстрогены. HSPA5 (белок теплового шока A5) является клеточным рецептором организма-хозяина, распознаваемым S-белком вируса. Во время инфекции происходит активация экспрессии этого белка и его транслокация на клеточную мембрану. Спайковый белок вируса SARS-CoV-2 распознает белок HSPA5 на клеточной мембране, что способствует дальнейшему развитию инфекционного процесса [11]. С помощью молекулярного докинга и молекулярной динамики было изучено влия-

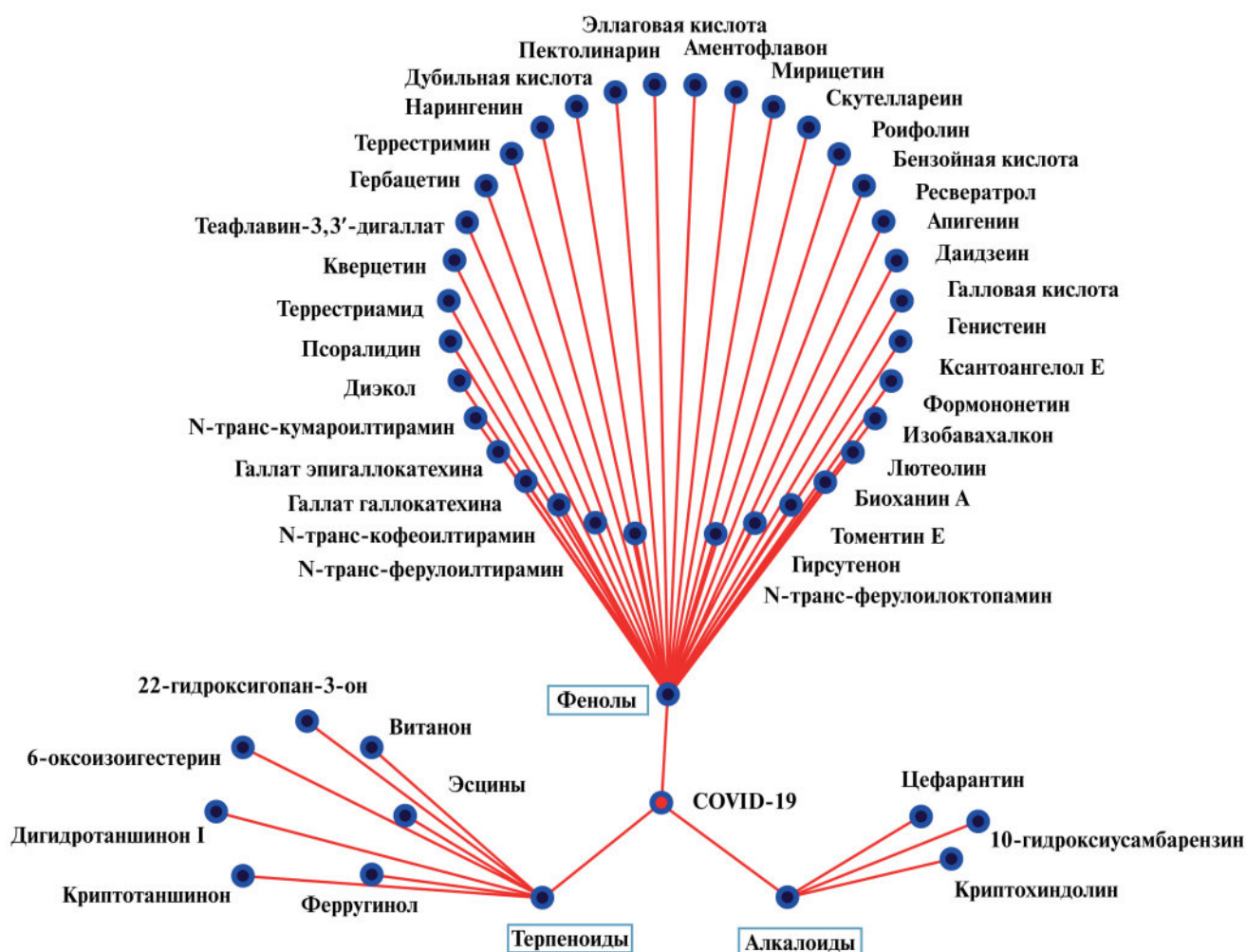


Рис. 5. Фитохимические вещества с высокой потенциальной эффективностью против COVID-19

ние природных соединений на домен связывания субстрата белка HSPA5 β [30]. В результате было обнаружено, что изофлавоновые фитоэстрогены, а именно генистеин, даидзеин, биоханин А и формонетин, обладают наивысшим сродством связывания с белком HSPA5. Следовательно, эти соединения могут препятствовать прикреплению вируса SARS-CoV-2 к подвергшимся стрессу клеткам организма-хозяина, и поэтому они могут быть эффективным средством для профилактики COVID-19 у людей с высоким риском клеточного стресса.

Коричные амиды. Было идентифицировано несколько соединений природного происхождения с высокой потенциальной способностью ингибировать активность белка SARS-CoV-PLpro [12]. Коричные амиды входят в число таких соединений, и шесть коричных амидов (N-транс-кумароилтирамин, N-транс-ферулоиллоктопамин, N-транс-кофеоилтирамин, террестримин, N-транс-ферулоилтирамин и террестриамид) из плодов *Tribulus*

terrestris были протестированы. Они продемонстрировали многообещающее дозозависимое ингибирующее действие на белок SARS-CoV-PLpro (IC_{50} 15,8–70,1 мкМ). Террестримин [(E)-N-(1-гидрокси-2-(4-гидроксифенил)-2-оксоэтил)-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)акриламид] демонстрировал самый высокий ингибирующий эффект в отношении SARS-CoV-PLpro с IC_{50} $15,8 \pm 0,6$ мкМ [31].

Список соединений из числа вышеупомянутых терпеноидов, алкалоидов и фенолов, потенциально эффективных при COVID-19, представлен на рис. 5.

ВЫВОДЫ

Лекарственные растения и их полезные фитометаболиты рассматриваются как перспективные альтернативные лекарственные препараты для лечения или профилактики различных заболеваний. Сейчас внимание сосредоточено на возможности их применения

при COVID-19. Настоящий обзор охватывает различные аспекты коронавирусной инфекции с точки зрения применения лекарственных растений и фитохимических веществ, и он может помочь в поиске стратегий долгосрочного лечения симптомов и повышения иммунитета при борьбе с COVID-19. Нами подчёркивается важность изучения натуральных фитохимических продуктов в качестве потенциального источника профилактических и/или терапевтических средств против COVID-19. Необходимы дальнейшие экспериментальные исследования, чтобы доказать эффективность этих фитоконпонентов и возможность создания лекарств на их основе для противодействия коронавирусной инфекции.

Вклад авторов. D. Sruthi — концептуализация, обработка данных, методология, написание, проверка и редактирование манускрипта; M. Dhanalakshmi — изображение структур веществ, форматирование ссылок, просмотр и редактирование манускрипта; H. Ch. Y. Rao и R. Parthasarathy — просмотр и редактирование манускрипта; Sh. P. Deeranraj — изображение структур веществ, просмотр и редактирование манускрипта; C. Jayabaskaran — руководство работой.

Благодарности. Авторы хотели бы поблагодарить Индийский институт науки (Бангалор) за предоставленную инфраструктуру и

поддержку. Д. Шрути выражает признательность департаменту исследований в области здравоохранения (DHR) правительства Индии (Нью-Дели) за присуждение премии в рамках программы «Молодой учёный-HRD» (YSS/2019/000035/PRCYSS). Д. Шрути также благодарна совету по научным и инженерным исследованиям (SERB) Департамента науки и технологий правительства Индии (Нью-Дели) за присуждение ей национальной постдокторской стипендии (PDF/2017/000339). Яшаванта Х. Ч. Рао выражает благодарность DHR правительства Индии (Нью-Дели) за присуждение премии в рамках программы «Молодой учёный-HRD» (YSS/2020/0000054/PRCYSS). Р. Партасарати благодарит Индийский совет медицинских исследований (ICMR-RA) (Ref. no. 45/1/2020-DDI-BMS), Нью-Дели, за стажировку в качестве научного сотрудника.

Финансирование. Эта работа финансировалась департаментом исследований в области здравоохранения (DHR) правительства Индии (Нью-Дели) в рамках программы «Молодой учёный-HRD» (D. Sruthi) (YSS/2019/000035/PRCYSS).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие этическим стандартам. Данная статья не содержит описания исследований с участием человека или животных, выполненных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jeon, S. R., Kang, J. W., Ang, L., Lee, H. W., Lee, M. S., Kim, T. H. (2022) Complementary and alternative medicine (CAM) interventions for COVID-19: An overview of systematic reviews, *Integr. Med. Res.*, **11**, 1-9, doi: 10.1016/j.imr.2022.100842.
2. Oladele, J. O., Ajayi, E. I., Oyeleke, O. M., Oladele, O. T., Olowookere, B. D., Adeniyi, B. M., Oyeleke, O. I., and Oladiji, A. T. (2020) A systematic review on COVID-19 pandemic with special emphasis on curative potentials of Nigeria based medicinal plants, *Heliyon*, **6**, e04897, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04897.
3. Ahmad, S., Zahiruddin, S., Parveen, B., Basist, P., Parveen, A., Gaurav, Parveen, R., and Ahmad, M. (2021) Indian medicinal plants and formulations and their potential against COVID-19 — preclinical and clinical research, *Front. Pharmacol.*, **11**, 1-34, doi: 10.3389/fphar.2020.578970.
4. Hong-Zhi, D. U., Hou, X. Y., Miao, Y. H., Huang, B. S., and Liu, D. H. (2020) Traditional Chinese Medicine: an effective treatment for 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP), *Chin. J. Nat. Med.*, **18**, 226-230, doi: 10.1016/S1875-5364(20)30022-4.
5. Xu, K., Cai, H., Shen, Y., Ni, Q., Chen, Y., Hu, S., Li, J., Wang, H., Yu, L., Huang, H., Qiu, Y., Wei, G., Fang, Q., Zhou, J., Sheng, J., Liang, T., and Li, L. (2020) Management of coronavirus disease-19 (COVID-19): The Zhejiang Experience, *J. Zhejiang Univ. Med. Sci.*, **49**, 147-157, doi: 10.3785/j.issn.1008-9292.2020.02.02.
6. Lu, H. (2020) Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV), *Biosci. Trends*, **14**, 69-71, doi: 10.5582/bst.2020.01020.
7. Jin, Y. H., Cai, L., Cheng, Z. S., Cheng, H., Deng, T., Fan, Y. P., et al. (2020) A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (19-nCoV) infected pneumonia (standard version), *Mil. Med. Res.*, **7**, 1-23, doi: 10.1186/s40779-020-0233-6.
8. Sruthi, D., and Jayabaskaran, C. (2021) in *Biotechnological Approaches to Enhance Plant Secondary Metabolites: Recent Trends and Future Prospects* (Shahnawaz, M., ed.) CRC Press, Taylor & Francis, FL., pp. 1-17.

9. Ryu, Y. B., Jeong, H. J., Kim, J. H., Kim, Y. M., Park, J. Y., Kim, D., et al. (2010) Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CL^{pro} inhibition, *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 7940-7947, doi: 10.1016/j.bmc.2010.09.035.
10. Gyebi, G. A., Ogunro, O. B., Adegunloye, A. P., Ogunyemi, O. M., and Afolabi, S. O. (2021) Potential inhibitors of coronavirus 3-chymotrypsin-like protease (3CL^{pro}): an *in silico* screening of alkaloids and terpenoids from African medicinal plants, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**, 3396-3408, doi: 10.1080/07391102.2020.1764868.
11. Huang, J., Tao, G., Liu, J., Cai, J., Huang, Z., and Chen, J. X. (2020) Current prevention of COVID-19: Natural products and herbal medicine, *Front. Pharmacol.*, **11**, 1-18, doi: 10.3389/fphar.2020.588508.
12. Benarba, B., and Pandiella, A. (2020) Medicinal plants as sources of active molecules against COVID-19, *Front. Pharmacol.*, **11**, 1-16, doi: 10.3389/fphar.2020.01189.
13. Park, J. Y., Kim, J. H., Kim, Y. M., Jeong, H. J., Kim, D. W., Park, K. H., et al. (2012) Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 5928-5935, doi: 10.1016/j.bmc.2012.07.038.
14. Wu, C. Y., Jan, J. T., Ma, S. H., Kuo, C. J., Juan, H. F., Cheng, Y. S. E., et al. (2004) Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10012-10017, doi: 10.1073/pnas.0403596101.
15. Kim, J. W., Ha, T. K. Q., Cho, H., Kim, E., Shim, S. H., and Yang, J. L. (2017) Antiviral escin derivatives from the seeds of *Aesculus turbinata* Blume (Japanese horse chestnut), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 3019-3025, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.05.022.
16. Kumar, V., Dhanjal, J. K., Bhargava, P., Kaul, A., Wang, J., Zhang, H., et al. (2022) Withanone and Withaferin-A are predicted to interact with transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) and block entry of SARS-CoV-2 into cells, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **40**, 1-13, doi: 10.1080/07391102.2020.1775704.
17. Weber, C., and Opatz, T. (2019) Bisbenzylisoquinoline Alkaloids, in *The Alkaloids: Chemistry and Biology* (Knölker, H. J., ed.) Academic Press Inc., pp. 1-249.
18. Ruan, Z., Liu, C., Guo, Y., He, Z., Huang, X., Jia, X., et al. (2020) SARS-CoV-2 and SARS-CoV: virtual screening of potential inhibitors targeting RNA-dependent RNA polymerase activity (NSP12), *J. Med. Virol.*, **93**, 389-400, doi: 10.1002/jmv.26222.
19. Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., et al. (2020) Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus, *Science*, **368**, 779-782, doi: 10.1126/science.abb7498.
20. El-Aziz, N. M. A., Shehata, M. G., Awad, O. M. E., and El-Sohaimy, S. A. (2020) Inhibition of COVID-19 RNA-dependent RNA polymerase by natural bioactive compounds: molecular docking analysis, *Research Square*, doi: 10.21203/RS.3.RS-25850/V1.
21. Chen, C. N., Lin, C. P. C., Huang, K. K., Chen, W. C., Hsieh, H. P., Liang, P. H., et al. (2005) Inhibition of SARS-CoV 3C-like protease activity by theaflavin-3,3'-digallate (TF3), *Evid. Based. Complement. Altern. Med.*, **2**, 209-215, doi: 10.1093/ecam/neh081.
22. Kim, D. W., Seo, K. H., Curtis-Long, M. J., Oh, K. Y., Oh, J. W., Cho, J. K., et al. (2014) Phenolic phytochemical displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the seeds of *Psoralea corylifolia*, *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, **29**, 59-63, doi: 10.3109/14756366.2012.753591.
23. Cho, J. K., Curtis-Long, M. J., Lee, K. H., Kim, D. W., Ryu, H. W., Yuk, H. J., et al. (2013) Geranylated flavonoids displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the fruits of *Paulownia tomentosa*, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 3051-3057, doi: 10.1016/j.bmc.2013.03.027.
24. Nguyen, T. T. H., Woo, H. J., Kang, H. K., Nguyen, V. D., Kim, Y. M., Kim, D. W., et al. (2012) Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Lett.*, **34**, 831-838, doi: 10.1007/s10529-011-0845-8.
25. Jo, S., Kim, S., Shin, D. H., and Kim, M. S. (2020) Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids, *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, **35**, 145-151, doi: 10.1080/14756366.2019.1690480.
26. Yu, M. S., Lee, J., Lee, J. M., Kim, Y., Chin, Y. W., Jee, J. G., et al. (2012) Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of the SARS coronavirus helicase, nsP13, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 4049-4054, doi: 10.1016/j.bmcl.2012.04.081.
27. Park, J. Y., Ko, J. A., Kim, D. W., Kim, Y. M., Kwon, H. J., Jeong, H. J., et al. (2016) Chalcones isolated from *Angelica keiskei* inhibit cysteine proteases of SARS-CoV, *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, **31**, 23-30, doi: 10.3109/14756366.2014.1003215.
28. Park, J. Y., Jeong, H. J., Kim, J. H., Kim, Y. M., Park, S. J., Kim, D., et al. (2012) Diarylheptanoids from *Alnus japonica* inhibit papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 2036-2042, doi: 10.1248/bpb.b12-00623.
29. Park, J. Y., Kim, J. H., Kwon, J. M., Kwon, H. J., Jeong, H. J., Kim, Y. M., et al. (2013) Dieckol, a SARS-CoV 3CL(pro) inhibitor, isolated from the edible brown algae *Ecklonia cava*, *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 3730-3737.
30. Elfiky, A. A. (2021) Natural products may interfere with SARS-CoV-2 attachment to the host cell, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**, 3194-3203, doi: 10.1080/07391102.2020.1761881.
31. Song, Y. H., Kim, D. W., Curtis-Long, M. J., Yuk, H. J., Wang, Y., Zhuang, N., et al. (2014) Papain-like protease (PLpro) inhibitory effects of cinnamic amides from *Tribulus terrestris* fruits, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 1021-1028, doi: 10.1248/bpb.b14-00026.

CURATIVE POTENTIAL OF HIGH-VALUE PHYTOCHEMICALS ON COVID-19 INFECTION

Review

**D. Sruthi^{1*}, M. Dhanalakshmi², H. Ch. Y. Rao¹, R. Parthasarathy¹,
Sh. P. Deepanraj³, and C. Jayabaskaran¹**

¹ *Department of Biochemistry, Indian Institute of Science,
560012 Bengaluru, Karnataka, India; e-mail: sruthi.skylarks@gmail.com*

² *Research and Development Centre, Bharathiar University,
641046 Marudhamalai Road, Coimbatore, Tamil Nadu, India*

³ *Department of Biological Sciences, Tata Institute for Genetics and Society,
Instem building, National Centre for Biological Sciences Campus, 560065 Bengaluru, Karnataka, India*

Medicinal plants and their therapeutically promising chemical compounds belonging to the valued category of 'traditional medicine' are potential remedies for various health problems. Due to their complex structure and enormous health benefits, the high-value plant-derived metabolites collectively termed as 'phytochemicals' have emerged as a crucial source for novel drug discovery and development. Indeed, several medicinal plants from diverse habitats are still in the 'underexplored' category in terms of their bioactive principles and therapeutic potential. COVID-19, infection caused by the SARS-CoV-2, first reported in November 2019, resulted in the alarming number of deaths (6.61 million), was further declared 'pandemic', and spread of the disease has continued till today. Even though the well-established scientific world has successfully implemented vaccines against COVID-19 within the short period of time, the focus on alternative remedies for long-term symptom management and immunity boosting have been increased. At this point, interventions based on traditional medicine, which include medicinal plants, their bioactive metabolites, extracts and formulations, attracted a lot of attention as alternative solutions for COVID-19 management. Here, we reviewed the recent research findings related to the effectiveness of phytochemicals in treatment or prevention of COVID-19. Furthermore, the literature regarding the mechanisms behind the preventive or therapeutic effects of these natural phytochemicals were also discussed. In conclusion, we suggest that the active plant-derived components could be used alone or in combination as an alternative solution for the management of SARS-CoV-2 infection. Moreover, the structure of these natural productomes may lead to the emergence of new prophylactic strategies for SARS-CoV-2-caused infection.

Keywords: natural products, high-value phytochemicals, terpenoids, alkaloids, phenolics, medicinal plants, COVID-19

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АДИПОЦИТОВ И В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Обзор

© 2023 Е.М. Стасевич¹, Э.А. Жеремян¹, Д.В. Купраш¹, А.М. Шварц^{1,2*}

¹ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: shvarec@yandex.ru

² Московский физико-технический институт, 141701 Московская область, Долгопрудный, Россия

Поступила в редакцию 20.12.2022

После доработки 25.01.2023

Принята к публикации 02.02.2023

Заболевания, связанные с нарушением углеводного и жирового обмена, широко распространены в современном мире. Значительную роль в патогенезе таких заболеваний играет взаимодействие основных клеток жировой ткани – адипоцитов – и клеток иммунной системы. Долговременное повышение уровня глюкозы и жирных кислот приводит к гипертрофии адипоцитов и повышению экспрессии данными клетками провоспалительных цитокинов и адипокинов. В результате находящиеся в ткани иммунные клетки приобретают провоспалительный фенотип, а также происходит привлечение новых лейкоцитов. Воспаление жировой ткани приводит к формированию инсулинорезистентности и стимулирует образование атеросклеротических бляшек и развитие аутоиммунных процессов. Новые исследования показывают, что существенную роль в регуляции воспаления жировой ткани играют разные группы В-лимфоцитов. Снижение числа лимфоцитов типа В2 может подавить развитие ряда метаболических заболеваний, тогда как снижение числа регуляторных В-лимфоцитов и лимфоцитов типа В1 ассоциировано с усилением патологии. Недавние исследования показали, что адипоциты способны влиять на активность В-лимфоцитов как напрямую, так и через изменение активности других иммунных клеток. Эти данные позволяют лучше понять молекулярные механизмы формирования патологий человека, связанных с нарушением углеводного и липидного обмена, таких как сахарный диабет 2 типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: В-лимфоциты, В1-лимфоциты, В2-лимфоциты, регуляторные В-лимфоциты, адипоциты, адипокины, сахарный диабет.

DOI: 10.31857/S0320972523020124, EDN: QHEGRY

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, иммунная система человека необходима не только для устранения патогенов, но и для поддержания нормального функционирования тканей. При нарушении работы тканей и органов происходит развитие стерильного воспаления, которое обусловлено взаимодействием иммунной системы и клеток данных органов [1]. Нарушение углеводного и жирового обмена приводит к изменению активности адипоцитов и их вовлечению в воспалительные процессы. В условиях патологии адипоциты выделяют це-

лый ряд провоспалительных цитокинов, адипокинов и ростовых факторов, а также поверхностных ко-стимуляторных молекул, способных воздействовать на различные иммунные клетки, в том числе В-лимфоциты и Т-лимфоциты (рисунок) [2, 3]. Часть адипоцитов погибает, высвобождая сигнальные молекулы, свидетельствующие о повреждении тканей, а также аутоантигены. Данные аутоантигены могут быть причиной образования В-лимфоцитами аутоантител, усиливающих патологические процессы в жировой ткани (ЖТ). С другой стороны, помимо образования аутоантител и поддержания воспаления, для В-лимфоцитов показана способность подавлять воспалительные процессы и участвовать в нормализации функций адипоцитов. В данном обзоре будут описаны разные типы В-лимфоцитов и сигнальные молекулы адипоцитов, участвующих

Принятые сокращения: ЖТ – жировая ткань; Врег – регуляторные В-лимфоциты; IL – интерлейкин; TNF – фактор некроза опухоли.

* Адресат для корреспонденции.

во взаимодействии этих клеток с В-лимфоцитами, а также обсуждена возможная роль описанных молекул в развитии метаболических заболеваний.

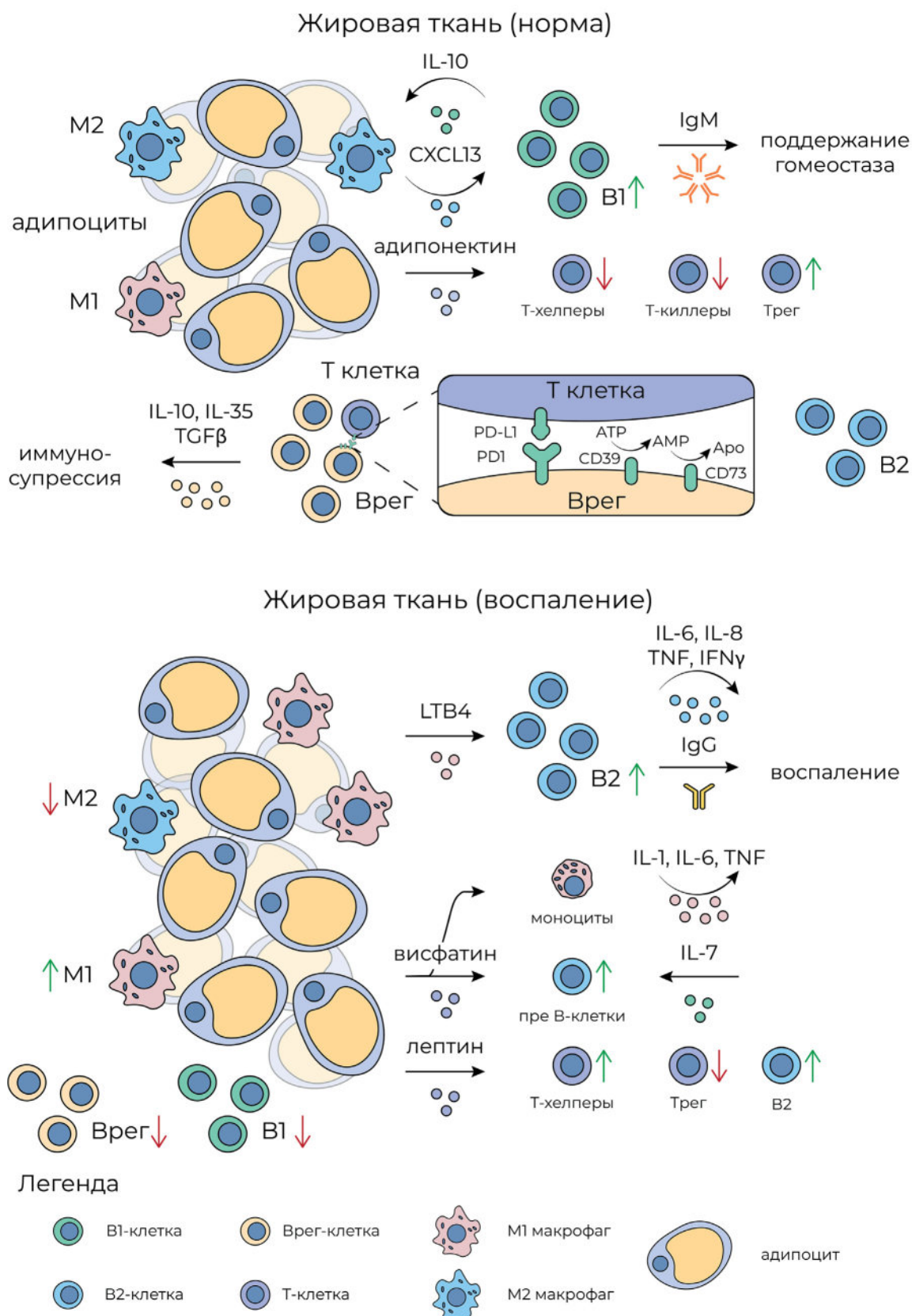
ТИПЫ В-ЛИМФОЦИТОВ И ИХ РОЛЬ В ПОДДЕРЖАНИИ ВОСПАЛЕНИЯ ЖТ

Известно, что В-лимфоциты играют центральную роль в образовании различных типов антител. Также в последнее время была обнаружена важная роль В-лимфоцитов в регуляции воспалительных процессов. В зависимости от спектра синтезируемых антител и вырабатываемых цитокинов В-лимфоциты делятся на несколько функциональных групп. Находящиеся в ЖТ В-лимфоциты относятся к трём основным функциональным группам: лимфоциты типа В1, В2 и регуляторные В-лимфоциты (Врег) [2].

Лимфоциты В1. Лимфоциты типа В1 образуются в эмбриональной печени и костном мозге взрослых людей и накапливаются в плевре и брюшной полости [4]. Данные клетки привлекаются в ткани преимущественно с помощью хемокина CXCL13 [5]. Образование хемокина CXCL13 обеспечивают макрофаги с поляризацией М2 [6], которые характерны для нормальной ЖТ [7]. В связи с этим для нормальной ЖТ характерен высокий уровень лимфоцитов В1. При этом сами лимфоциты В1 способствуют поляризации макрофагов по типу М2 с помощью интерлейкина-10 (IL-10) [8], что поддерживает гомеостаз в ткани. Однако при нарушениях углеводного и жирового обмена происходит снижение числа как макрофагов М2, так и В1-клеток в ЖТ. Этот процесс сопровождается повышением числа макрофагов, поляризованных по типу М1, и В2-лимфоцитов, развитием воспаления и нарушением толерантности к глюкозе [7]. Показано, что у мышей, несущих мутацию гена *Id3*, наблюдается повышение количества клеток В1. В условиях диет-индуцированного ожирения у таких особей слабее выражено воспаление ЖТ, снижен уровень провоспалительных цитокинов и наблюдается изменение толерантности к глюкозе по сравнению с мышами дикого типа [9]. Противовоспалительное действие лимфоцитов В1 во многом обусловлено образованием данными клетками низкоспецифичных антител класса IgM. Было показано, что В1, не вырабатывающие антитела, не способны нормализовать толерантность к глюкозе при воспалении ЖТ. Считается, что низкоспецифичные антитела IgM связывают компоненты разрушенных клеток, предотвращая развитие воспаления [10]. В случаях развития атероскле-

роза, связанного с высококалорийной диетой, была показана важная роль рецептора хемокинов CCR6 для привлечения В1-клеток в области воспаления периваскулярной ЖТ. Вырабатываемые этими клетками антитела IgM защищают сосуды от развития атеросклероза [11].

Лимфоциты В2. Наиболее распространённые в организме В-клетки относятся к типу В2. Данные клетки образуются в костном мозге и распределяются по вторичным лимфоидным органам, таким как лимфатические узлы и селезёнка. В2-Лимфоциты способны образовывать антитела разных классов, в том числе IgG. При активации клетки типа В2 превращаются в клетки памяти или плазматические клетки. Привлечение В2-клеток в ЖТ осуществляется с помощью лейкотриена В4 (LTB4) [12], который производится макрофагами, поляризованными по типу М1 [13]. При этом показано, что М1-макрофаги стимулируют развитие воспаления, нарушение толерантности к глюкозе и инсулинорезистентность [2, 14]. На данный момент известно два основных механизма поддержания воспаления клетками В2. В2-Лимфоциты выделяют провоспалительные цитокины интерлейкин-6 и интерлейкин-8 (IL-6, IL-8), интерферон гамма (IFN γ) и фактор некроза опухоли (TNF) [14, 15]. Ранее было показано, что данные цитокины способствуют созданию провоспалительного микроокружения. Так, в модели системной красной волчанки образование В-клетками IL-6 необходимо для генерации «аутоиммунных герминальных центров», что способствует развитию патологии [16]. Для IL-6 также показана способность непосредственно влиять на метаболические процессы. Так, с одной стороны, IL-6 способствует выходу жирных кислот из адипоцитов, провоцирует гибель бета-клеток поджелудочной железы, а также подавляет активность инсулинового рецептора за счёт повышения уровня активного супрессора цитокинового сигнала SOCS3. С другой стороны, IL-6 может стимулировать экспрессию в адипоцитах транспортёра глюкозы GLUT4 и адаптора рецептора инсулина IRS-1, а также активировать секрецию адипоцитами лептина, который опосредованно стимулирует синтез инсулина [17, 18]. Кроме того, В2-лимфоциты могут вырабатывать специфические аутоантитела типа IgG на антигены разрушающихся клеток организма, что может привести к усилению воспаления. Так, например, у людей с сахарным диабетом 2 типа часто обнаруживают аутоантитела к глиальному фибриллярному кислому белку, декарбоксилазе глутаминовой кислоты и тирозин-протеиновой фосфатазе рецепторного типа [19–21].



Взаимодействие B1-, B2-, В-регуляторных клеток и Т-клеток с адипоцитами в норме и при воспалении. Зелёная стрелка вверх означает увеличение числа определённой популяции клеток, красная стрелка вниз означает уменьшение числа определённой популяции клеток. Отдельно выделено взаимодействие Т-клеток и Врег-клеток в норме (чёрный прямоугольник). Происходит взаимодействие с PD-L1 через рецептор PD1, CD39 и CD73, образующие из АТФ внеклеточный аденозин. В нижней части рисунка изображена легенда: B1- (зелёный), B2- (голубой), Врег- (жёлтый), Т-клетки (фиолетовый), M1 (розовый) и M2 (голубой) макрофаги, адипоциты (фиолетовый)

Врег-клетки. У млекопитающих были обнаружены популяции В-лимфоцитов, сходные по функциям с регуляторными Т-клетками. Врег являются относительно слабоизученным типом В-клеток. Данные клетки не имеют индивидуального пути развития, они могут развиваться из клеток В1 и В2. Врег-клетки выделяют целый ряд иммуносупрессивных цитокинов — IL-10, IL-35 и трансформирующий фактор роста бета (TGF β) [22–26]. Выделяемые Врег-клетками цитокины оказывают ингибирующее действие на широкий спектр иммунных клеток: на провоспалительные Т-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки [27]. При этом такие противовоспалительные цитокины стимулируют активность регуляторных Т-клеток [28]. Кроме того, Врег-клетки экспонируют на своей поверхности так называемые молекулы иммунологического чек-пойнта PD-L1 и ферменты CD39 и CD73, образующие из АТР внеклеточный аденозин, который обладает иммуносупрессивными функциями [29]. Известно, что образование Врег-клеток происходит под действием целого ряда факторов, таких как лиганды толл-подобных рецепторов 4 или 9, цитокины IL-6, IL-10, TGF β , IFN α и лиганд рецептора CD40. В ЖТ функциональная активность Врег-клеток поддерживается за счёт CXCL12 и свободных жирных кислот [30]. Врег-клетки ЖТ с фенотипом IgM⁺IgD⁺CD22⁺ защищают от инсулинорезистентности посредством продукции противовоспалительных цитокинов, в частности IL-10 [31]. Стоит отметить, что субпопуляция Врег-клеток ЖТ производит IL-10 конститутивно, не нуждаясь в дополнительных активационных сигналах, что отличает её от других резидентных субпопуляций Врег-клеток [30]. Nishimura et al. показали, что Врег-клетки ЖТ могут напрямую подавлять активность цитотоксических Т-лимфоцитов: их совместное культивирование *in vitro* приводило к снижению уровня экспрессии CD44 и IFN γ в Т-лимфоцитах, а добавление IL-10-нейтрализующих антител в культивационную среду снимало этот эффект [30]. В другой статье было показано, что Врег-клетки, индуцированные мезенхимальными стромальными клетками, полученными из ЖТ, оказались способны подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов даже в присутствии IL-10-нейтрализующих антител [32]. Таким образом, Врег-клетки могут подавлять Т-клеточный компонент иммунитета за счёт различных механизмов.

Исследования на мышах показали, что высокожировая диета способствует снижению числа Врег-клеток в висцеральной ЖТ [33].

Тем не менее причины этого остаются не до конца ясны. Согласно одной из гипотез, из-за увеличения числа клеток, способствующих воспалению (в частности, Th1, Th17 и M1-поляризованных макрофагов), и их продуктов секреции (IFN γ , IL-6, IL-8 и др.), В-клетки с супрессивным потенциалом могут приобретать провоспалительный фенотип. В таком состоянии они могут подвергаться смене изотипа антител и вследствие этого продуцировать патогенные IgG-антитела наряду с хемокинами, рекрутирующими макрофаги, и макрофагальным воспалительным белком-2 (MIP-2), а также дополнительно активировать Т-клетки за счёт МНСI/II-взаимодействий. Таким образом, функциональная активность Врег-клеток может оказаться подавленной за счёт воспалительной обстановки, создаваемой другими иммунными клетками и самими В-клетками с провоспалительным фенотипом. Также существует мнение, что Врег-клетки могут обладать низкой выживаемостью в условиях липотоксичности и гипоксии, которая характерна для ЖТ при ожирении. Каждое из вышеупомянутых предположений нуждается в дополнительных исследованиях [34].

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ АДИПОЦИТОВ И В-ЛИМФОЦИТОВ

Адиipoциты являются одними из наиболее важных клеток, участвующих в углеводном и жировом обмене. Эти клетки способны передавать другим клеткам организма информацию о наличии дефицита или запаса калорий и о своей способности потреблять и выделять углеводы и липиды. Эту информацию адиipoциты передают в значительной степени с помощью специфических цитокинов — адиipoкинов. К этому классу молекул относятся лептин, адипонектин, висфатин, резистин, оментин и ряд менее изученных молекул. Данные цитокины участвуют в регуляции углеводного и жирового обмена другими клетками, влияют на активность центра голода в головном мозге и участвуют в регуляции размножения и воспаления [35]. Важная роль адиipoцитов в регуляции В-клеточного элемента иммунитета подтверждается тем фактом, что у мышей с кондиционным нокаутом рецептора воспаления CD40 в адиipoцитах наблюдается снижение уровня В-лимфоцитов [36]. В настоящее время описано прямое и опосредованное действие целого ряда адиipoкинов на В-лимфоциты. Кроме того, во взаимодей-

ствии адипоцитов и В-лимфоцитов участвуют и другие цитокины, такие как IL-6, TGF β и TNF [37].

Лептин. Лептин — это цитокин, который вырабатывается адипоцитами и энтероцитами тонкого кишечника при поступлении в организм из пищи питательных веществ. Данный цитокин стимулирует пролиферацию и активность как В-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов. Лептин стимулирует активность большинства провоспалительных типов Т-клеток, Т-хелперов типа 1, 17 и фолликулярных хелперов, а также подавляет активность регуляторных Т-клеток [3]. Смещение профиля экспрессируемых Т-клетками цитокинов в сторону провоспалительных способствует увеличению числа В2-лимфоцитов в ткани [2].

Описано действие лептина и непосредственно на В-лимфоциты, о чём свидетельствует наличие у данных клеток рецепторов к этому адипокину [38]. Известно, что у мышей с дефицитом лептина наблюдается сниженное количество В-лимфоцитов. При этом инъекция данного цитокина восстанавливает уровень лимфоцитов [39]. Показано, что лептин способствует выживанию и размножению В-лимфоцитов за счёт увеличения уровня экспрессии циклина D1 и противоапоптозного фактора Bcl-2 [40]. Интересно, что лептин стимулирует продукцию В-клетками как провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF), так и противовоспалительных (IL-10) [41]. Стоит отметить, что повышение синтеза В-лимфоцитами TNF под действием лептина связано с подавлением способности этих лимфоцитов образовывать антитела IgG [42].

Адипонектин. Адипонектин вырабатывается ЖТ и клетками плаценты в ответ на действие инсулина [43]. Экспрессия адипонектина обратно коррелирует с уровнем лептина и во многом оказывает противоположное воздействие на иммунные клетки [3]. Адипонектин подавляет пролиферацию провоспалительных Т-лимфоцитов и стимулирует активность регуляторных Т-клеток [44, 45]. Также данный адипокин стимулирует продукцию дендритными клетками иммуносупрессивных молекул PD-L1 [46]. Однако в некоторых исследованиях указано, что адипонектин, наоборот, стимулирует дифференциацию Т-лимфоцитов в хелперы 1 и 17 типов, а также стимулирует экспрессию этими клетками IL-6 и IFN γ [47]. Неоднозначные данные могут объясняться существованием разных форм данного адипокина. Так, было показано, что тримеры, гексамеры и высокомолекулярные мультимеры адипонектина активируют разные сигнальные пути [48].

Как и лептин, адипонектин действует на активность В-лимфоцитов как опосредованно, через активацию разных популяций Т-лимфоцитов, так и напрямую. В-Лимфоциты экспрессируют два основных рецептора к данному адипокину: ADIPOR1 и ADIPOR2 [49]. Конкретные эффекты, которые адипонектин оказывает на В-клетки, изучены достаточно слабо. Известно, что данный адипокин может подавлять образование В-лимфоцитов в костном мозге [50]. Более того, было показано, что адипонектин непосредственно стимулирует противоопухолевую активность В-клеток. Данный адипокин усиливает выработку В-клетками пептида PERITEM, ингибирующего активность провоспалительных Т-клеток [51]. Также было показано, что дефицит адипонектина приводит к активации провоспалительных В-лимфоцитов в модели колита у мышей [52]. При этом в модели аутоиммунного артрита адипонектин, напротив, усиливает пролиферацию и активность провоспалительных В-лимфоцитов [53].

Другие адипокины. В последние годы обнаружена группа новых адипокинов, в том числе висфатин, резистин, оментин и фактор активации В-клеток (BAFF). Среди данных адипокинов лучше всего изучено влияние на В-клетки висфатина и BAFF [3].

Висфатин — это адипокин, выделяемый висцеральной ЖТ и обладающий инсулиномиметическими свойствами. Данный белок имеет свойства и цитокина, и фермента, участвующего в биосинтезе NAD. Ранее было заявлено о наличии у этого адипокина инсулиноподобной активности, однако позднее эти данные были отозваны [54]. Другое название висфатина, колониестимулирующий фактор пре-В-клеток (PBEF), указывает на роль данного адипокина в развитии В-лимфоцитов. Было показано, что этот цитокин стимулирует образование колоний пре-В-клеток в присутствии IL-7 [55]. Также для висфатина показана способность усиливать продукцию провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6 и TNF моноцитами, а также стимулировать хемотаксис В-клеток [56].

BAFF, согласно своему названию, стимулирует пролиферацию, выживание и выработку антител В-лимфоцитами [57]. Экспрессия данного адипокина ЖТ усиливается при ожирении [58]. BAFF способствует активации липолиза в адипоцитах и препятствует развитию ожирения [59]; в то же время данный адипокин способствует развитию нарушения чувствительности к инсулину с возрастом [60].

IL-6. Описано разностороннее влияние IL-6 на взаимодействие В-клеток и адипоцитов. С одной стороны, в условиях нарушения

углеводного и жирового обмена адипоциты секретируют IL-6 на повышенном уровне, способствуя пролиферации В-клеток, с другой — В-лимфоциты также синтезируют этот цитокин, воздействуя как на адипоциты, так и на другие клетки ЖТ [61, 62]. Важно отметить, что IL-6 синтезируется не только В2-клетками, но и другими типами В-клеток, что указывает на его неоднозначную роль в развитии метаболических патологий [63, 64]. Как было указано выше, IL-6, с одной стороны, способствует выходу жирных кислот из адипоцитов и способен подавлять активность инсулинового рецептора, с другой — может стимулировать синтез инсулина и повышать чувствительность адипоцитов к нему [17, 18]. В целом, повышенный уровень IL-6 способствует развитию метаболических заболеваний. Так, мыши с нокаутом гена IL-6 склонны к развитию ожирения и инсулинорезистентности, при этом использование селективных блокаторов этого цитокина приводит к снижению инсулинорезистентности и риска ожирения у мышей [65].

TNF. Данный цитокин вырабатывается при сахарном диабете 2 типа как адипоцитами, так и В-лимфоцитами [15, 62]. TNF является провоспалительным цитокином, участвующим в развитии как острых, так и хронических воспалительных реакций. Он способствует привлечению иммунных клеток в ткани, их поляризации в провоспалительные типы и подавлению активности иммунорегуляторных клеток, а также может вызывать апоптоз клеток [66]. Кроме того, TNF оказывает непосредственное влияние на метаболизм липидов и углеводов. Так, было показано, что TNF подавляет поглощение адипоцитами жирных кислот, усиливает расщепление триглицеридов и освобождение жирных кислот в кровоток за счёт регуляции активности ферментов липолиза и липидных транспортёров [67]. Также было показано, что TNF влияет на фосфорилирование рецептора инсулина [68]. Кроме того, TNF оказывает влияние на активность транспортёра глюкозы 4 и субстрата рецептора инсулина в адипоцитах [69]. Таким образом, TNF снижает способность адипоцитов поглощать глюкозу и жирные кислоты и, напротив, усиливает высвобождение ими свободных жирных кислот. Стоит отметить, что свободные жирные кислоты способны активировать сигнальные пути толл-подобного рецептора 4 в иммунных клетках [70]. Активация данного рецептора может усилить активность различных типов В-лимфоцитов [71, 72].

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время довольно распространены метаболические патологии, связанные с избыточным потреблением калорий. Многочисленные исследования показали, что важную роль в развитии таких патологий играют Т- и В-лимфоциты [73, 74]. Роль В-лимфоцитов в развитии метаболических заболеваний активно исследуется в последние годы. Было показано, что манипуляции с разными типами В-лимфоцитов кардинальным образом влияют на течение метаболических заболеваний, в том числе возрастных [2, 75]. С другой стороны, вещества, выделяемые адипоцитами, могут существенно влиять на количество и активность разных типов лимфоцитов при метаболических заболеваниях [3, 76]. Адипокины — специфические цитокины, выделяемые преимущественно адипоцитами — способны оказывать существенное влияние на всех этапах развития и функционирования В-лимфоцитов. Известно, что такие адипокины, как лептин, адипонектин, висфатин и BAFF, влияют на формирование и пролиферацию предшественников В-клеток в костном мозге, созревание и миграцию В-клеток, а также их активность и выживаемость [3, 77, 78]. Однако влияние других адипокинов на В-лимфоциты остаётся практически неизученным.

В настоящее время адипокины и их рецепторы рассматриваются как потенциальные мишени для лекарств, предназначенных для лечения метаболических заболеваний [79]. Подробное исследование роли адипокинов в функционировании клеток иммунной системы важно для понимания возможных эффектов от манипуляций с адипокинами и их рецепторами.

При нарушении углеводного и липидного обмена адипоциты усиливают образование таких провоспалительных цитокинов, как IL-6 и TNF [2]. Для этих двух цитокинов показано влияние как на В-лимфоциты, так и на адипоциты. При этом роль данных цитокинов в развитии метаболических заболеваний остаётся неоднозначной. Как было описано выше, инактивация IL-6-сигнального пути при помощи нокаута гена *IL6* и подавление того же сигнала при помощи селективных блокаторов IL-6 оказывают противоположное влияние на развитие метаболических заболеваний у мышей [65]. Для подробного изучения роли IL-6 и TNF в развитии патологий, связанных с обменом углеводов и липидов, ценным ресурсом являются мыши с кондиционным нокаутом генов этих цитокинов и их рецепторов в адипоцитах и В-лимфоцитах.

В настоящее время появилось множество исследований, демонстрирующих, что В-лим-

фоциты играют важную роль в развитии метаболических заболеваний, связанных с нарушениями липидного и углеводного обмена. Однако пока не разработаны способы использования В-клеточного компонента иммунитета для эффективной терапии подобных заболеваний. Представляется перспективным дальнейшее исследование данной темы, в том числе с использованием кондиционных нокаутов генов, связанных с В-клеточным ответом, а также развитие таргетной терапии, направленной на определённые субпопуляции В-клеток.

Вклад авторов. Е.М. Стасевич — написание текста, создание иллюстрации; Э.А. Жеремян —

написание текста; Д.В. Купраш — редактирование текста статьи; А.М. Шварц — формулировка идеи статьи и написание текста.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00398).

Благодарности. Выражаем благодарность Устюговой Алине Сергеевне за помощь с написанием текста.

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. Shen, H., Kreisel, D., and Goldstein, D. R. (2013) Processes of sterile inflammation, *J. Immunol.*, **191**, 2857-2863, doi: 10.4049/jimmunol.1301539.
2. Srikakulapu, P., and McNamara, C. A. (2020) B lymphocytes and adipose tissue inflammation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **40**, 1110-1122, doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312467.
3. Song, J., and Deng, T. (2020) The adipocyte and adaptive immunity, *Front. Immunol.*, **11**, 593058, doi: 10.3389/fimmu.2020.593058.
4. Frühbeck, G. (2008) Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders, *Methods Mol. Biol.*, **456**, 1-22, doi: 10.1007/978-1-59745-245-8_1.
5. Ansel, K. M., Harris, R. B. S., and Cyster, J. G. (2002) CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity, *Immunity*, **16**, 67-76, doi: 10.1016/s1074-7613(01)00257-6.
6. Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.-L. (2008) Macrophage polarization in bacterial infections, *J. Immunol.*, **181**, 3733-3739, doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3733.
7. Mancuso, P. (2016) The role of adipokines in chronic inflammation, *ImmunoTargets Ther.*, **5**, 47-56, doi: 10.2147/ITT.S73223.
8. Wong, S.-C., Puaux, A.-L., Chittezhath, M., Shalova, I., Kajiji, T. S., Wang, X., et al. (2010) Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells, *Eur. J. Immunol.*, **40**, 2296-2307, doi: 10.1002/eji.200940288.
9. Harmon, D. B., Srikakulapu, P., Kaplan, J. L., Oldham, S. N., McSkimming, C., Garmey, J. C., et al. (2016) Protective role for B-1b B cells and IgM in obesity-associated inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **36**, 682-691, doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307166.
10. Miller, Y. I., Choi, S.-H., Wiesner, P., Fang, L., Harkewicz, R., Hartvigsen, K., et al. (2011) Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity, *Circ. Res.*, **108**, 235-248, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223875.
11. Srikakulapu, P., Upadhye, A., Drago, F., Perry, H. M., Bontha, S. V., McSkimming, C., et al. (2021) Chemokine receptor-6 promotes B-1 cell trafficking to perivascular adipose tissue, local IgM production and atheroprotection, *Front. Immunol.*, **12**, 636013, doi: 10.3389/fimmu.2021.636013.
12. Ying, W., Wollam, J., Ofrecio, J. M., Bandyopadhyay, G., El Ouarrat, D., Lee, Y. S., et al. (2017) Adipose tissue B2 cells promote insulin resistance through leukotriene LTB4/LTB4R1 signaling, *J. Clin. Invest.*, **127**, 1019-1030, doi: 10.1172/JCI90350.
13. Werz, O., Gerstmeier, J., Libreros, S., De la Rosa, X., Werner, M., Norris, P. C., et al. (2018) Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity, *Nat. Commun.*, **9**, 59, doi: 10.1038/s41467-017-02538-5.
14. DeFuria, J., Belkina, A. C., Jagannathan-Bogdan, M., Snyder-Cappione, J., Carr, J. D., Nersesova, Y. R., et al. (2013) B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5133-5138, doi: 10.1073/pnas.1215840110.
15. Zhai, X., Qian, G., Wang, Y., Chen, X., Lu, J., Zhang, Y., et al. (2016) Elevated B cell activation is associated with type 2 diabetes development in obese subjects, *Cell. Physiol. Biochem.*, **38**, 1257-1266, doi: 10.1159/000443073.
16. Arkatkar, T., Du, S. W., Jacobs, H. M., Dam, E. M., Hou, B., Buckner, J. H., et al. (2017) B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity, *J. Exp. Med.*, **214**, 3207-3217, doi: 10.1084/jem.20170580.
17. Wueest, S., Laesser, C. I., Böni-Schnetzler, M., Item, F., Lucchini, F. C., Borsigova, M., et al. (2018) IL-6-type cytokine signaling in adipocytes induces intestinal GLP-1 secretion, *Diabetes*, **67**, 36-45, doi: 10.2337/db17-0637.

18. Akbari, M., and Hassan-Zadeh, V. (2018) IL-6 signaling pathways and the development of type 2 diabetes, *Inflammopharmacology*, **26**, 685-698, doi: 10.1007/s10787-018-0458-0.
19. Gómez-Touriño, I., Camiña-Darriba, F., Otero-Romero, I., Rodríguez, M. A., Hernández-Fernández, A., González-Fernández, A., et al. (2010) Autoantibodies to glial fibrillary acid protein and S100beta in diabetic patients, *Diabet. Med.*, **27**, 246-248, doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02911.x.
20. Pietropaolo, M., Barinas-Mitchell, E., Pietropaolo, S. L., Kuller, L. H., and Trucco, M. (2000) Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes, *Diabetes*, **49**, 32-38, doi: 10.2337/diabetes.49.1.32.
21. Turner, R., Stratton, I., Horton, V., Manley, S., Zimmet, P., Mackay, I. R., et al. (1997) UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group, *Lancet (London, England)*, **350**, 1288-1293, doi: 10.1016/s0140-6736(97)03062-6.
22. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S., and Bhan, A. K. (2002) Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation, *Immunity*, **16**, 219-230, doi: 10.1016/s1074-7613(02)00274-1.
23. Fillatreau, S., Sweeney, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D., and Anderton, S. M. (2002) B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10, *Nat. Immunol.*, **3**, 944-950, doi: 10.1038/ni833.
24. Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D. L. (2001) Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice, *J. Immunol.*, **167**, 1081-1089, doi: 10.4049/jimmunol.167.2.1081.
25. Parekh, V. V., Prasad, D. V. R., Banerjee, P. P., Joshi, B. N., Kumar, A., and Mishra, G. C. (2003) B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8⁺ T cells: role of TGF-beta 1, *J. Immunol.*, **170**, 5897-5911, doi: 10.4049/jimmunol.170.12.5897.
26. Wang, R.-X., Yu, C.-R., Dambuza, I. M., Mahdi, R. M., Dolinska, M. B., Sergeev, Y. V., et al. (2014) Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease, *Nat. Med.*, **20**, 633-641, doi: 10.1038/nm.3554.
27. Asadullah, K., Sterry, W., and Volk, H. D. (2003) Interleukin-10 therapy – review of a new approach, *Pharmacol. Rev.*, **55**, 241-269, doi: 10.1124/pr.55.2.4.
28. Shang, J., Zha, H., and Sun, Y. (2020) Phenotypes, functions, and clinical relevance of regulatory B cells in cancer, *Front. Immunol.*, **11**, 582657, doi: 10.3389/fimmu.2020.582657.
29. Jansen, K., Cevhertas, L., Ma, S., Satitsuksanoa, P., Akdis, M., and van de Veen, W. (2021) Regulatory B cells, A to Z, *Allergy*, **76**, 2699-2715, doi: 10.1111/all.14763.
30. Nishimura, S., Manabe, I., Takaki, S., Nagasaki, M., Otsu, M., Yamashita, H., et al. (2013) Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation, *Cell Metab.*, **18**, 759-766, doi: 10.1016/j.cmet.2013.09.017.
31. Ghazarian, M., Luck, H., Revelo, X. S., Winer, S., and Winer, D. A. (2015) Immunopathology of adipose tissue during metabolic syndrome, *Turk Patoloji Derg.*, **31 Suppl 1**, 172-180, doi: 10.5146/tjpath.2015.01323.
32. Garcia, S. G., Sandoval-Hellín, N., Clos-Sansalvador, M., Carreras-Planella, L., Morón-Font, M., Guerrero, D., et al. (2022) Mesenchymal stromal cells induced regulatory B cells are enriched in extracellular matrix genes and IL-10 independent modulators, *Front. Immunol.*, **13**, 957797, doi: 10.3389/fimmu.2022.957797.
33. Shen, L., Chng, M. H. Y., Alonso, M. N., Yuan, R., Winer, D. A., and Engleman, E. G. (2015) B-1a lymphocytes attenuate insulin resistance, *Diabetes*, **64**, 593-603, doi: 10.2337/db14-0554.
34. Capasso, M., Rashed Alyahyawi, A., and Spear, S. (2015) Metabolic control of B cells: more questions than answers, *Front. Immunol.*, **6**, 80, doi: 10.3389/fimmu.2015.00080.
35. Fasshauer, M., and Blüher, M. (2015) Adipokines in health and disease, *Trends Pharmacol. Sci.*, **36**, 461-470, doi: 10.1016/j.tips.2015.04.014.
36. Reiche, M. E., Poels, K., Bosmans, L. A., Vos, W. G., Van Tiel, C. M., Gijbels, M. J. J., et al. (2022) Adipocytes control haematopoiesis and inflammation through CD40 signaling, *Haematologica*, doi: 10.3324/haematol.2022.281482.
37. Szumilas, K., Szumilas, P., Słucznanowska-Głabowska, S., Zgutka, K., and Pawlik, A. (2020) Role of adiponectin in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8265, doi: 10.3390/ijms21218265.
38. Bennett, B. D., Solar, G. P., Yuan, J. Q., Mathias, J., Thomas, G. R., and Matthews, W. (1996) A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis, *Curr. Biol.*, **6**, 1170-1180, doi: 10.1016/s0960-9822(02)70684-2.
39. Claycombe, K., King, L. E., and Fraker, P. J. (2008) A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2017-2021, doi: 10.1073/pnas.0712053105.
40. Lam, Q. L. K., Wang, S., Ko, O. K. H., Kincade, P. W., and Lu, L. (2010) Leptin signaling maintains B-cell homeostasis via induction of Bcl-2 and Cyclin D1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 13812-13817, doi: 10.1073/pnas.1004185107.
41. Gupta, S., Agrawal, S., and Gollapudi, S. (2013) Increased activation and cytokine secretion in B cells stimulated with leptin in aged humans, *Immun. Ageing*, **10**, 3, doi: 10.1186/1742-4933-10-3.
42. Frasca, D., Diaz, A., Romero, M., and Blomberg, B. B. (2020) Leptin induces immunosenescence in human B cells, *Cell. Immunol.*, **348**, 103994, doi: 10.1016/j.cellimm.2019.103994.
43. Chen, J., Tan, B., Karteris, E., Zervou, S., Digby, J., Hillhouse, E. W., et al. (2006) Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adi-

- ponectin and its receptors by cytokines, *Diabetologia*, **49**, 1292-1302, doi: 10.1007/s00125-006-0194-7.
44. Zhang, K., Guo, Y., Ge, Z., Zhang, Z., Da, Y., Li, W., et al. (2017) Adiponectin suppresses T helper 17 Cell differentiation and limits autoimmune CNS inflammation via the SIRT1/PPAR γ /ROR γ t pathway, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 4908-4920, doi: 10.1007/s12035-016-0036-7.
 45. Li, W., Geng, L., Liu, X., Gui, W., and Qi, H. (2019) Recombinant adiponectin alleviates abortion in mice by regulating Th17/Treg imbalance via p38MAPK-STAT5 pathway, *Biol. Reprod.*, **100**, 1008-1017, doi: 10.1093/biolre/iy251.
 46. Tsang, J. Y. S., Li, D., Ho, D., Peng, J., Xu, A., Lamb, J., et al. (2011) Novel immunomodulatory effects of adiponectin on dendritic cell functions, *Int. Immunopharmacol.*, **11**, 604-609, doi: 10.1016/j.intimp.2010.11.009.
 47. Cheng, X., Folco, E. J., Shimizu, K., and Libby, P. (2012) Adiponectin induces pro-inflammatory programs in human macrophages and CD4⁺ T cells, *J. Biol. Chem.*, **287**, 36896-36904, doi: 10.1074/jbc.M112.409516.
 48. Tsao, T.-S., Tomas, E., Murrey, H. E., Hug, C., Lee, D. H., Ruderman, N. B., et al. (2003) Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways, *J. Biol. Chem.*, **278**, 50810-50817, doi: 10.1074/jbc.M309469200.
 49. Pang, T. T. L., and Narendran, P. (2008) The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1150**, 143-145, doi: 10.1196/annals.1447.021.
 50. Yokota, T., Meka, C. S. R., Kouro, T., Medina, K. L., Igarashi, H., Takahashi, M., et al. (2003) Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells, *J. Immunol.*, **171**, 5091-5099, doi: 10.4049/jimmunol.171.10.5091.
 51. Chimen, M., McGettrick, H. M., Apta, B., Kuravi, S. J., Yates, C. M., Kennedy, A., et al. (2015) Homeostatic regulation of T cell trafficking by a B cell-derived peptide is impaired in autoimmune and chronic inflammatory disease, *Nat. Med.*, **21**, 467-475, doi: 10.1038/nm.3842.
 52. Obeid, S., Wankell, M., Charrez, B., Sternberg, J., Kreuter, R., Esmaili, S., et al. (2017) Adiponectin confers protection from acute colitis and restricts a B cell immune response, *J. Biol. Chem.*, **292**, 6569-6582, doi: 10.1074/jbc.M115.712646.
 53. Che, N., Sun, X., Gu, L., Wang, X., Shi, J., Sun, Y., et al. (2021) Adiponectin enhances B-cell proliferation and differentiation via activation of Akt1/STAT3 and exacerbates collagen-induced arthritis, *Front. Immunol.*, **12**, 626310, doi: 10.3389/fimmu.2021.626310.
 54. Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., et al. (2005) Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin, *Science*, **307**, 426-430, doi: 10.1126/science.1097243.
 55. Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S., and McNiece, I. (1994) Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1431-1437, doi: 10.1128/mcb.14.2.1431-1437.1994.
 56. Moschen, A. R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M., Niederegger, H., et al. (2007) Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties, *J. Immunol.*, **178**, 1748-1758, doi: 10.4049/jimmunol.178.3.1748.
 57. Craxton, A., Magaletti, D., Ryan, E. J., and Clark, E. A. (2003) Macrophage- and dendritic cell – dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF, *Blood*, **101**, 4464-4471, doi: 10.1182/blood-2002-10-3123.
 58. Müller, N., Schulte, D. M., Hillebrand, S., Türk, K., Hampe, J., Schafmayer, C., et al. (2014) B Lymphocyte Stimulator (BLyS) is expressed in human adipocytes in vivo and is related to obesity but not to insulin resistance, *PLoS One*, **9**, e94282, doi: 10.1371/journal.pone.0094282.
 59. Chan, C. C., Harley, I. T. W., Pfluger, P. T., Trompette, A., Stankiewicz, T. E., Allen, J. L., et al. (2021) A BAFF/APRIL axis regulates obesogenic diet-driven weight gain, *Nat. Commun.*, **12**, 2911, doi: 10.1038/s41467-021-23084-1.
 60. Kim, B., and Hyun, C.-K. (2020) B-cell-activating factor depletion ameliorates aging-dependent insulin resistance via enhancement of thermogenesis in adipose tissues, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5121, doi: 10.3390/ijms21145121.
 61. Apostolopoulos, V., de Courten, M. P. J., Stojanovska, L., Blatch, G. L., Tangalakis, K., and de Courten, B. (2016) The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity, *Mol. Nutr. Food Res.*, **60**, 43-57, doi: 10.1002/mnfr.201500272.
 62. Biondi, G., Marrano, N., Borrelli, A., Rella, M., Palma, G., Calderoni, I., et al. (2022) Adipose tissue secretion pattern influences β -cell wellness in the transition from obesity to type 2 diabetes, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 5522, doi: 10.3390/ijms23105522.
 63. Spencer, N. F., and Daynes, R. A. (1997) IL-12 directly stimulates expression of IL-10 by CD5⁺ B cells and IL-6 by both CD5⁺ and CD5⁻ B cells: possible involvement in age-associated cytokine dysregulation, *Int. Immunol.*, **9**, 745-754, doi: 10.1093/intimm/9.5.745.
 64. Figueiró, F., Muller, L., Funk, S., Jackson, E. K., Battastini, A. M. O., and Whiteside, T. L. (2016) Phenotypic and functional characteristics of CD39^{high} human regulatory B cells (Breg), *Oncoimmunology*, **5**, e1082703, doi: 10.1080/2162402X.2015.1082703.
 65. Giraldez, M. D., Carneros, D., Garbers, C., Rose-John, S., and Bustos, M. (2021) New insights into IL-6 family cytokines in metabolism, hepatology and gastroenterology, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 787-803, doi: 10.1038/s41575-021-00473-x.
 66. Kalliolias, G. D., and Ivashkiv, L. B. (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging ther-

- apeutic strategies, *Nat. Rev. Rheumatol.*, **12**, 49-62, doi: 10.1038/nrrheum.2015.169.
67. Chen, X., Xun, K., Chen, L., and Wang, Y. (2009) TNF- α , a potent lipid metabolism regulator, *Cell Biochem. Funct.*, **27**, 407-416, doi: 10.1002/cbf.1596.
 68. Hotamisligil, G. S., Budavari, A., Murray, D., and Spiegelman, B. M. (1994) Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α , *J. Clin. Invest.*, **94**, 1543-1549, doi: 10.1172/JCI117495.
 69. Coppel, S. W. (2001) Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue, *Proc. Nutr. Soc.*, **60**, 349-356, doi: 10.1079/pns2001110.
 70. Song, M., Meng, L., Liu, X., and Yang, Y. (2021) Feprazole prevents free fatty acid (FFA)-induced endothelial inflammation by mitigating the activation of the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway, *ACS Omega*, **6**, 4850-4856, doi: 10.1021/acsomega.0c05826.
 71. Xu, Y., Wu, K., Han, S., Ding, S., Lu, G., Lin, Z., et al. (2020) Astilbin combined with lipopolysaccharide induces IL-10-producing regulatory B cells via the STAT3 signalling pathway, *Biomed. Pharmacother.*, **129**, 110450, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110450.
 72. Wang, K., Tao, L., Su, J., Zhang, Y., Zou, B., Wang, Y., et al. (2017) TLR4 supports the expansion of FasL⁺CD5⁺CD1d^{hi} regulatory B cells, which decreases in contact hypersensitivity, *Mol. Immunol.*, **87**, 188-199, doi: 10.1016/j.molimm.2017.04.016.
 73. McLaughlin, T., Ackerman, S. E., Shen, L., and Engleman, E. (2017) Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease, *J. Clin. Invest.*, **127**, 5-13, doi: 10.1172/JCI88876.
 74. Xiao, Y., Deng, C., and Zhou, Z. (2021) The multiple roles of B lymphocytes in the onset and treatment of type 1 diabetes: interactions between B lymphocytes and T cells, *J. Diabetes Res.*, **2021**, 6581213, doi: 10.1155/2021/6581213.
 75. Fernandez, N. C., and Shinoda, K. (2022) The role of B lymphocyte subsets in adipose tissue development, metabolism, and aging, *Compr. Physiol.*, **12**, 4133-4145, doi: 10.1002/cphy.c220006.
 76. Karl, M., Hasselwander, S., Zhou, Y., Reifenberg, G., Kim, Y. O., Park, K.-S., et al. (2022) Dual roles of B lymphocytes in mouse models of diet-induced nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology*, **76**, 1135-1149, doi: 10.1002/hep.32428.
 77. Kim, Y. H., Choi, B. H., Cheon, H. G., Do, M. S. (2009) B cell activation factor (BAFF) is a novel adipokine that links obesity and inflammation, *Exp. Mol. Med.*, **41**, 208-216, doi: 10.3858/emmm.2009.41.3.024.
 78. Francisco, V., Pino, J., Gonzalez-Gay, M. A., Mera, A., Lago, F., Gómez, R., et al. (2018) Adipokines and inflammation: is it a question of weight? *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 1569-1579, doi: 10.1111/bph.14181.
 79. Dłudla, P. V., Nkambule, B. B., Mazibuko-Mbeje, S. E., Nyambuya, T. M., Mxinwa, V., Mokgalaboni, K., et al. (2021) Adipokines as a therapeutic target by metformin to improve metabolic function: a systematic review of randomized controlled trials, *Pharmacol. Res.*, **163**, 105219, doi: 10.1016/j.phrs.2020.105219.

INTERACTION BETWEEN ADIPOCYTES AND B LYMPHOCYTES IN HUMAN METABOLIC DISEASES

Review

E. M. Stasevich¹, E. A. Zheremyan¹, D. V. Kuprash¹, and A. M. Schwartz^{1,2*}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: shvarec@yandex.ru

² Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Moscow, Russia

Diseases associated with disorders of carbohydrate and fat metabolism are widespread in the modern world. An essential factor in the pathogenesis of such diseases is the interaction between the cells of adipose tissue, adipocytes, and immune system cells. A long-term increase in glucose and fatty acids leads to adipocyte hypertrophy and increased expression of proinflammatory cytokines and adipokines by these cells. As a result, immune cells acquire a pro-inflammatory phenotype, and new leukocytes are recruited. Inflammation of adipose tissue leads to insulin resistance and stimulates the formation of atherosclerotic plaques and the development of autoimmune processes. New studies show that different groups of B lymphocytes play an essential role in the regulation of inflammation in adipose tissue. A decrease in B2 type lymphocytes suppresses the development of a number of metabolic diseases, whereas decreased numbers of regulatory B lymphocytes and B1 lymphocytes are associated with an increased pathology. Recent studies showed that adipocytes influence B lymphocyte activity both directly and by altering the activity of other immune cells. These findings provide a better understanding of the molecular mechanisms of human pathologies associated with impaired carbohydrate and lipid metabolism, such as type 2 diabetes mellitus.

Keywords: B lymphocytes, B1 lymphocytes, B2 lymphocytes, regulatory B lymphocytes, adipocytes, adipokines, diabetes

К КОММЕНТАРИЮ А.И. МИХАЛЬСКОГО
О СТАТЬЕ Л.А. ГАВРИЛОВА И Н.С. ГАВРИЛОВОЙ
«ИСТОРИЧЕСКИЕ ТРЕНДЫ ВИДОВОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ
ЖИЗНИ ЧЕЛОВЕКА И АКТУАРНОЙ СКОРОСТИ СТАРЕНИЯ»,
ОПУБЛИКОВАННОМУ В Т. 88, ВЫП. 1, С. 164–165

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

¹Academic Research Centers, NORC at the University of Chicago,
60637 Chicago, IL, USA; e-mail: lagavril@yahoo.com

²Институт демографических исследований, ФНИСЦ РАН, 109028 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.01.2023

После доработки 10.01.2023

Принята к публикации 10.01.2023

При изучении возрастной динамики смертности людей необходима осторожность в использовании когортных данных, поскольку смертность зависит не только от возраста, но и от меняющихся со временем условий жизни. Для дальнейшей проверки предложена гипотеза о том, что актуарная скорость старения может даже снижаться в более современных когортах людей благодаря улучшению условий жизни.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: смертность, когортные данные, скорость старения, гипотеза замедления старения.

DOI: 10.31857/S0320972523020136, **EDN:** QNHLCF

В комментарии А.И. Михальского утверждается, что сравнение смертности людей в разных возрастных группах должно делаться не для одинакового исторического периода времени (поперечные данные), а для одинакового года рождения (когортные данные).

Это предложение имело бы смысл только в том случае, если условия жизни были бы неизменными и постоянными на протяжении всей человеческой жизни, чего трудно добиться даже для лабораторных животных. В противном случае воздействия возраста на смертность будут искажены влиянием изменяющихся условий жизни.

Например, если рост смертности с возрастом составляет 8% в год, но при этом смертность снижается во времени со скоростью 2% в год, то в итоге наблюдаемый в когорте рост смертности будет составлять только 6% в год ($8 - 2 = 6$). Если темпы исторического снижения смертности зависят от возраста, это может выглядеть на когортных данных как уменьшение актуарной скорости старения в более современных когортах людей.

У нас есть некоторый опыт анализа когортных данных [1–6], и мы планируем проверить гипотезу о том, что актуарная скорость старения может даже снижаться в более современных когортах людей благодаря изменению условий жизни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2011) Mortality measurement at advanced ages: a study of the social security administration death master file, *North Am. Actuar. J.*, **15**, 432–447, doi: 10.1080/10920277.2011.10597629.
2. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2019) Late-life mortality is underestimated because of data errors, *PLoS Biol.*, **17**, e3000148, doi: 10.1371/journal.pbio.3000148.
3. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (2020) What can we learn about aging and COVID-19 by studying mortality? *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1499–1504, doi: 10.1134/S0006297920120032.
4. Gavrilova, N. S., and Gavrilov, L. A. (2015) Biodemography of old-age mortality in humans and rodents, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **70**, 1–9, doi: 10.1093/gerona/glu009.

* Адресат для корреспонденции.

5. Gavrilova, N. S., and Gavrilov, L. A. (2022) Protective effects of familial longevity decrease with age and become negligible for centenarians, *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **77**, 736-743, doi: 10.1093/gerona/glab380.
6. Gavrilov, L. A., and Gavrilova, N. S. (1991) *The Biology of Life Span: A Quantitative Approach*, Harwood Academic Publisher, New York, ISBN 3-7186-4983-7.