

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ISSN 0041-3771

ЦИТОЛОГИЯ

TSITOLOGIYA

2024. Том 66

2024. Vol. 66

5—6



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

СОДЕРЖАНИЕ

Том 66, номер 5–6, 2024

Хемокинин CXCL12 и его рецепторы CXCR4 и CXCR7 в прогрессии рака молочной железы <i>Е. Ю. Зубарева, М. А. Сеньчукова, Н.В. Сайдлер</i>	395
Посттрансляционная регуляция активности онкосупрессора p53 <i>А. А. Романова, Т. А. Григорьева, В. Г. Трибулович</i>	407
Дизайн и подбор гидов для CRISPR/CAS9-опосредованного нокаута гена <i>Kcnn2</i> в мышинных клетках <i>Е. Н. Антонова, А. Б. Сорока, О. Н. Митяева, П. Ю. Волчков</i>	420
Микровезикулы из мезенхимных стволовых клеток для регенерации хрящевой ткани при остеоартрите лошадей <i>А. М. Аймалетдинов, А. Г. Маланьева, М. А. Тамбовский, Е. Ю. Закирова</i>	438
Катехин зеленого чая EGCG способен частично восстанавливать регуляцию мышечного сокращения тропонин-тропомиозиновым комплексом, нарушенную заменой Glu150Ala в гамма-тропомиозине <i>М. В. Тишкова, О. Е. Карпичева, Ю. С. Боровиков, С. В. Аврова</i>	450
Тучные клетки миокарда человека, содержащие химазу, и их выявление с помощью различных антител <i>А. А. Бекетова, О. В. Кирик, Д. Э. Коржевский</i>	462
Хлорноватистая кислота — потенциальный вторичный мессенджер в процессе развития респираторного взрыва нейтрофилов <i>Г. Н. Семенова, И. И. Жолнеревич, М. А. Мурина, Н. В. Амазгбери, Д. И. Рощупкин</i>	471
Условно-патогенные бактерии <i>Serratia proteamaculans</i> регулируют интенсивность своей инвазии, увеличивая экспрессию поверхностных рецепторов клетки-хозяина <i>О. А. Цаплина</i>	482
Особенности распределения ГАМК и $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК _A -рецептора в полях CA1 и CA3 гиппокампа у новорожденных крыс после асфиксии в неонатальный период <i>Л. И. Хожай</i>	491

CONTENT

Volume 66, No. 5–6, 2024

Chemokinin CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7 in the progression of breast cancer <i>E. Y. Zubareva, M. A. Senchukova, N. V. Saidler</i>	395
Post-translational regulation of the p53 tumor suppressor activity <i>A. A. Romanova, T. A. Grigoreva, V. G. Tribulovich</i>	407
Design and selection of guides for CRISPR/Cas9-mediated knockout of the <i>Kcnv2</i> gene in mouse cells <i>E. N. Antonova, A. B. Soroka, O. N. Mityaeva, P.Y. Volchkov</i>	420
Microvesicles from mesenchymal stem cells for cartilage tissue regeneration in equine osteoarthritis <i>A. M. Aimaletdinov, A. G. Malanyeva, M. A. Tambovsky, E. Y. Zakirova</i>	438
Green tea catechin EGCG is able to partially restore the regulation of muscle contraction by the troponin-tropomyosin complex, impaired by the Glu150Ala substitution in γ -tropomyosin <i>M. V. Tishkova, O. E. Karpicheva, Y. S. Borovikov, S. V. Avrova</i>	450
Human myocardial mast cells containing chymase and their detection using various antibodies <i>A. A. Beketova, O. V. Kirik, D. E. Korzhevskii</i>	462
Hypochlorous acid – a potential secondary messenger in the process of neutrophils' respiratory burst development <i>G. N. Semenkova, I. I. Zholnerevich, M. A. Murina, N. V. Amaegberi, D. I. Roshchupkin</i>	471
Opportunistic bacteria <i>Serratia proteamaculans</i> regulate the intensity of their invasion by increasing the expression of host cell surface receptors <i>O. A. Tsaplina</i>	482
Features of the distribution of GABA and the $\alpha 1$ subunit of the GABA _A receptor in the CA1 and CA3 fields of the hippocampus in newborn rats after asphyxia in the neonatal period <i>L. I. Khozhai</i>	491

УДК 576.382:616-006

ХЕМОКИНИН CXCL12 И ЕГО РЕЦЕПТОРЫ CXCR4 И CXCR7 В ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2024 г. Е. Ю. Зубарева^{1, 2, *}, М. А. Сеньчукова^{1, 2}, Н.В. Сайдлер¹

¹Оренбургский областной клинический онкологический диспансер, Оренбург, 460021, Россия

²Оренбургский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, 460000, Россия

* E-mail: tishkova_evgeniy@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.2024

После доработки 18.08.2024

Принята к публикации 21.08.2024

Рак молочной железы занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости и смертности среди женского населения. Основной причиной смерти от рака молочной железы, как и от других злокачественных новообразований, является диссеминация опухоли и развитие резистентности к проводимому лечению. Установлено, что в прогрессировании злокачественных новообразований важную роль играют хемокины. В представленном небольшом обзоре мы описываем современное представление о роли наиболее изученного хемокина CXCL12 и его рецепторов CXCR4 и CXCR7 в прогрессировании рака молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, прогрессирование, хемокины, CXCL12, CXCR4, CXCR7

Принятые сокращения: ЗНО — злокачественные новообразования; РМЖ — рак молочной железы; ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход; DPP4 — дипептидилпептидаза-4; HER2-neu — эпидермальный фактор роста человека 2 типа; PD-L1 — лиганд программированной клеточной смерти 1; PLC — фосфолипаза C; VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

DOI: 10.31857/S0041377124050019, **EDN:** DUYIDC

Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующие позиции в структуре заболеваемости (21.7%) и смертности (15.9%) от злокачественных новообразований (ЗНО) среди женского населения нашей страны (Каприн и др., 2021). Основной причиной смерти от РМЖ, как и от других ЗНО, является диссеминация опухоли и развитие резистентности к проводимому лечению. Поэтому понимание механизмов, лежащих в основе онкогенеза и прогрессирования ЗНО, имеет решающее значение для разгадки сложной биологии рака (Yang et al., 2023). Цель настоящего обзора — обобщить имеющиеся в литературе данные о роли хемокина CXCL12 и его рецепторов CXCR4 и CXCR7 в прогрессировании РМЖ.

ХЕМОКИНЫ. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

В настоящее время установлено, что важную роль в прогрессировании ЗНО играют хемотаксические цитокины (хемокины) — семей-

ство небольших цитокинов или сигнальных белков с низкой молекулярной массой (8–14 кДа), которые участвуют в реакции иммунной системы, индуцируют направленное движение лейкоцитов, а также клеток других типов, включая эндотелиальные и эпителиальные (Raman et al., 2011; Righetti et al., 2019).

Хемокины имеют стабильную третичную структуру за счет наличия консервативных аминокислот, таких как цистеин, которые образуют характерную структуру «греческий ключ» (три антипараллельных β -складчатых листа перекрыты C-концевой α -спиралью), удерживающий структуру белка посредством двух дисульфидных связей (Righetti et al., 2019). В структуре хемокинов содержатся четыре NH_2 -концевых остатка цистеина. В зависимости от взаимного расположения первых двух остатков цистеина эти цитокины подразделяются на 4 подсемейства: хемокины C, CC, CXC и CX3C (Janssens et al., 2018). Самая большая подгруппа хемокинов — хемокины CC — имеют два

соседних консервативных остатка цистеина; хемокины С — только один NH_2 -концевой остаток цистеина; хемокины CXС и CX3С содержат одну или три другие аминокислоты соответственно между их консервативными NH_2 -концевыми цистеиновыми остатками (Janssens et al., 2018; Cambier et al., 2023).

Хемокины связываются со специфическими рецепторами, которые в основном локализируются на поверхности лейкоцитов. По механизму действия рецепторы делятся на типичные G-рецепторы, которые осуществляют передачу сигналов через G-белки, и атипичные, действующие через β -аррестин (Stone et al., 2017). Рецепторы (R), с которыми связываются хемокины, в зависимости от семейства, к которому они принадлежат, делятся на группы: CXCR, CCR, CR и CX3CR; однако это деление условно ввиду того, что каждый рецептор может распознавать более одного типа хемокина, и хемокин может связываться с несколькими рецепторами (Marcuzzi et al., 2019).

В настоящее время у человека идентифицировано около 50 хемокинов и 20 рецепторов. Установлено, что хемокины и их рецепторы играют важную физиологическую роль в организме человека, действуя как хемоаттрактантный фактор, управляющий клеточной миграцией (Righetti et al., 2019). В зависимости от выполняемой функции и типа продукции, хемокины классифицируются на воспалительные и гомеостатические. Воспалительные хемокины продуцируются в ответ на эндогенные или экзогенные воспалительные триггеры и действуют как хемоаттрактанты, привлекая моноциты, нейтрофилы и другие эффекторные клетки из крови к местам инфекции или повреждения тканей. Производство этих хемокинов стимулируется провоспалительными цитокинами, такими как интерлейкин-1. Гомеостатические хемокины вырабатываются в тимусе и лимфоидных тканях независимо от стимуляции внешними раздражителями. Эти цитокины контролируют процесс иммунного надзора, играют роль в эмбриогенезе, кроветворении, нейрогенезе и способствуют ангиогенезу (Janssens et al., 2018). Воспалительными хемокинами являются CCL2, CCL3 и CCL5; CXCL1, CXCL2 и CXCL8 (Marcuzzi et al., 2019; Righetti et al., 2019). К типичным гомеостатическим хемокинам относятся

CCL14, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12 и CXCL13. Некоторые хемокины могут выполнять как гомеостатические, так и воспалительные функции (Rot et al., 2014; Cambier et al., 2023).

ХЕМОКИН CXCL12 И ЕГО РЕЦЕПТОРЫ

В настоящее время хемокин CXCL12 и его рецепторы CXCR4 и CXCR7 являются наиболее изученными (Yang et al., 2023). Изначально CXCL12 считали гомеостатическим хемокином, однако, согласно современным данным, он может принимать участие и в воспалении (Janssens et al., 2018). Взаимодействуя со своими специфическими рецепторами, CXCL12 индуцирует нижележащие сигнальные пути, которые регулируют экспрессию генов, хемотаксис клеток, пролиферацию и миграцию. По данным некоторых авторов CXCL12 и его рецепторы играют ключевую роль в патогенезе различных заболеваний, таких как атеросклероз (Döring et al., 2019), болезнь Альцгеймера (McQuade et al., 2020), диабет (Sayyed et al., 2009), аутосомно-доминантная поликистозная болезнь почек (Kim et al., 2019), а также ЗНО (Yang et al., 2023).

К настоящему времени идентифицировано шесть подтипов хемокина CXCL12 (α , β , γ , δ , ϵ , θ) и предсказана изоформа iso7 (Righetti et al., 2019). Наиболее распространенным является подтип α , который принимает участие в различных физиологических или патологических процессах, таких как миграция миобластов во время миогенеза и регенерации мышц (Thakar et al., 2017), управление популяциями гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и нейромодуляция в центральной нервной системе (Yang et al., 2023). Подтип β обладает выраженными проангиогенными свойствами и экспрессируется в основном в хорошо кровоснабжаемых органах, таких как почки, печень и селезенка (Daniel et al., 2020). Подтип γ , наоборот, преобладает в органах с низкой васкуляризацией (Yang et al., 2023). Функции трех других идентифицированных изоформ CXCL12 (δ , ϵ , θ) остаются неясными.

Рецепторы CXCR4 и CXCR7. Хемокиновый рецептор 4 с мотивом CXС (CXCR4) представляет собой интегральный мембранный белок, который специфически связывается с хемокином CXCL12. CXCR4 был впервые

идентифицирован в лейкоцитах периферической крови. Он широко экспрессируется в различных типах клеток, включая лимфоциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, гемопоэтические стволовые клетки, стромальные фибробласты и опухолевые клетки, как во время эмбрионального развития, так и у взрослых индивидуумов (Fang et al., 2022; Wang et al., 2023). Этот рецептор, сопряженный с G-белком, расположен на поверхности клеток и имеет консервативную структуру, состоящую из 352 аминокислотных остатков с N- и C-концами, семь трансмембранных спиралей и три внеклеточные и внутриклеточные петли (Wu et al., 2010; Wang et al., 2023).

В настоящее время показана роль CXCR4 в гемопоэзе и иммунных реакциях (Zou et al., 1998; Miao et al., 2020; Elias et al., 2022), нейрогенезе (Cui et al., 2013), развитии зародышевых клеток, кардиогенезе и ангиогенезе (Sainz et al., 2007; Agarwal et al., 2010; Fang et al., 2022), остеогенезе (Esposito et al., 2023). Ось CXCR4/CXCL12 является ключевой для активации процессов пролиферации, регенерации и миграции клеток во время эмбрионального кроветворения, органогенеза, васкуляризации и гомеостаза органов (Bianchi et al., 2020). При взаимодействии CXCL12 с CXCR4 происходит: 1) запуск диссоциации гетеротримерного G-белка на субъединицы $G\alpha$ и $G\beta\gamma$; 2) превращение гуанозиндифосфата, связанного с G-белком в гуанозинтрифосфат; 3) повышение уровня активности малого G-белка RAS (Heinrich et al., 2012); 4) активация передачи сигналов фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K; Gao et al., 2019) и фосфолипазы C (PLC; Strazza et al., 2017). В результате активируется транскрипция генов, регулирующих градиент внутриклеточного кальция, что приводит к повышению его концентрации и возникновению клеточного хемотаксиса. Повреждение тканей в результате гипоксии, воздействия токсинов, облучения, приводит к увеличению экспрессии CXCL12, способствуя миграции CXCR4-положительных стволовых клеток в участки, требующие восстановления или регенерации тканей.

Следует отметить, что CXCR4 взаимодействует исключительно с эндогенным лигандом CXCL12. Однако CXCL12 может также связываться с другим хемокиновым рецептором CXCR7 и, кроме того, может индуцировать

привлечение β -репрессора к CXCR4, взаимодействие с которым индуцирует десенсibilизацию рецептора и эндоцитоз в клетках в отсутствие стимуляции агонистами (Chatterjee et al., 2014).

CXCR7 является атипичным хемокиновым рецептором, который передает сигналы через неклассический путь β -аррестина (Rajagopal et al., 2010). Этот рецептор экспрессируется в различных типах клеток, в частности, в таких, как гемопоэтические клетки, нейроны и активированные эндотелиальные клетки. Интересно, что CXCR7 имеет гораздо более высокое сродство к CXCL12, чем CXCR4. Кроме того, CXCR7 является важным негативным регулятором экспрессии CXCL12 (Khare et al., 2021; Murad et al., 2021). CXCR7 может снижать уровни CXCL12 и ослаблять активность CXCR4 за счет привлечения β -аррестина-2, гетеродимеризации с CXCR4, а также способствовать перераспределению CXCL12 из внеклеточной среды во внутриклеточную для лизосомной деградации. Эта особенность CXCR7 играет очень важную роль в поддержании баланса уровней CXCL12 во внеклеточной среде и в регуляции опосредованных им сигнальных путей и клеточных процессов.

ХЕМОКИН CXCL12 И ЕГО РЕЦЕПТОРЫ CXCR4 И CXCR7 ПРИ РМЖ

В настоящее время хемокину CXCL12 и его рецепторам уделяется большое внимание в связи с РМЖ. Согласно современным данным, сигнальная ось CXCL12–CXCR4/CXCR7 играет центральную роль в пролиферации опухолевых клеток, метастазировании, ангиогенезе и ускользании от иммунного ответа (Yang et al., 2023). Установлено, что экспрессия CXCR4 в клетках опухоли молочной железы может активироваться рядом факторов, таких как гипоксия, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ядерный фактор каппа-би (NF- κ B), эстрогены, трансформирующий фактор роста β 1 (TGF- β 1), β -катенин и интерферон γ (IFN- γ) (de Oliveira et al., 2013; Mukherjee et al., 2013; Okuyama Kishima et al., 2015; Zhou et al., 2019). Ось CXCL12/CXCR4 активирует передачу сигналов MAPK, которая стимулирует хемотаксис и пролиферацию клеток, индуцирует передачу сигналов по пути PLC—протеинкиназа C— Ca^{2+} —

киназа PI3K/AKT (Zhou et al., 2019), что предполагает наличие петли обратной связи между CXCR4 и другими сигнальными путями. Кроме того, было показано, что сигнальный путь CXCL12/CXCR4 может активировать рецептор эпидермального фактора роста 2 (HER2-neu) у человека, что усиливает инвазивные и метастатические свойства РМЖ (Zhou et al., 2019).

Регуляция экспрессии CXCR4 и CXCL12 в опухолевых клетках осуществляется и на посттранскрипционном уровне. Так, экспрессия CXCL12 контролируется специфическими микроРНК, например miR-1, miR-9, miR-126, miR-146a и miR-150, тогда как miR-200a может увеличивать экспрессию CXCR4 (Bianchi et al., 2020). Кроме того, при длительном воздействии CXCL12 включается механизм эндоцитоза CXCR4, который снижает чувствительность клеток к CXCL12.

Установлено, что в клетках РМЖ экспрессия рецептора CXCR4 выше, чем в клетках нормальной ткани молочной железы, где его экспрессия низкая или даже может отсутствовать (Okuyama Kishima et al., 2015; Bianchi et al., 2020). В эксперименте было показано, что клетки РМЖ, экспрессирующие CXCR4, мигрируют по градиенту к CXCL12, тогда как нейтрализация CXCR4 антителами ингибирует эту миграцию и образование метастатических очагов у мышей (Ганцев и др., 2012). Интересно, что наиболее выраженная продукция CXCL12 наблюдается в тех органах, куда преимущественно метастазирует РМЖ — костный мозг, печень, легкие и лимфатические узлы (Ганцев и др., 2012; Okuyama Kishima et al., 2015; Стукань и др., 2021).

Роль в пролиферации клеток РМЖ. CXCL12 как стромального, так и опухолевого происхождения может напрямую стимулировать рост и пролиферацию опухолевых клеток за счет активации протеинкиназного пути MAPK/Erk, что приводит к экспрессии генов белков, стимулирующих рост, например циклина D1 (Wani et al., 2014), транскрипционного фактора Fos (Chen et al., 2012) и гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста (HB-EGF) (Vollrath et al., 2010). Кроме того, CXCL12 может увеличивать экспрессию антиапоптотических генов, таких как *Mdm2* (Su et al., 2011), снижать экспрессию генов антиапоптотического белка Bcl-2, каспаз 3 и 9 (Song et al., 2012), что приво-

дит к ингибированию апоптоза опухолевых клеток, тем самым поддерживая их выживаемость и бесконтрольное деление (Marcuzzi et al., 2019).

Роль в инвазии, миграции и метастазировании клеток РМЖ. Установлено, что передача сигналов CXCL12/CXCR4 участвует в трансформации нормальных фибробластов в опухоль-ассоциированные фибробласты, способствуя тем самым повышению инвазивности РМЖ. Известно, что опухоль-ассоциированные фибробласты — это наиболее распространенный тип клеток в микроокружении опухоли, которые в отличие от нормальных фибробластов, блокирующих развитие опухоли, способствуют ее прогрессированию (Costa et al., 2018; Harbeck et al., 2019). На клеточных линиях показано, что передача сигналов транскрипционного фактора HSF1 активирует в фибробластах экспрессию фактора TGF- β (Scherz-Shouval et al., 2014). TGF- β индуцирует и поддерживает фенотип миофибробластов (Zielińska et al., 2020), стимулирует в опухоль-ассоциированных фибробластах секрецию CXCL12, что, в конечном итоге, способствует росту клеточных линий как тройного негативного РМЖ, так и других его подтипов (Tang et al., 2019; Zielińska et al., 2020). При воспалении опухоль-ассоциированные фибробласты, продуцирующие интерлейкин-7, производят высокие уровни CXCL12 и могут непосредственно взаимодействовать с опухолевыми клетками, экспрессирующими CXCR4. Это приводит к активации пути CXCL12/CXCR4 в клетках РМЖ, что способствует поддержанию стволовости и роста опухолевых клеток паракринным образом (Boesch et al., 2018).

В ряде исследований показано, что CXCR4 опосредует миграцию эпителиальных клеток посредством активации матриксных металлопротеиназ 2 и 14 и увеличивает подвижность раковых клеток за счет активации фактора NF- κ B и ERK-зависимого пути (Ghosh et al., 2012; Zhou et al., 2019). Кроме того, CXCL12 индуцирует экспрессию некоторых G-белков, таких как Rho, Rac и Cdc42. Эти белки играют важную роль в миграции опухолевых клеток, участвуя в перестройке цитоскелета, образовании филоподий и фокальной адгезии. В эксперименте специфический пептид, блокирующий Rac1, предотвращал хемотаксис клеток РМЖ, индуцированный CXCL12 (Zielińska et al., 2020).

Следует отметить, что недавние исследования показали роль CXCL12 в активации эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП), играющего ключевую роль в инвазии и метастазировании ЗНО. Так, на клеточной культуре РМЖ продемонстрировано, что дипептидилпептидаза-4 (DPP4), расщепляющая CXCL12, предотвращала ЭМП, индуцированный CXCL12. В то же время, ингибирование DPP4 активировало передачу сигналов CXCL12/CXCR4 и киназы mTOR, что индуцировало ЭМП, миграцию клеток РМЖ, а также способствовало развитию лекарственной устойчивости (Li et al., 2020). На мышинной модели РМЖ нокдаун DPP4 способствовал росту первичной опухоли и метастазированию в легкие (Yang et al., 2019). Кроме того, установлено, что в регуляции ЭМП, индуцированного CXCL12, важную роль играет тяжелая субъединица ферритина (Aversa et al., 2017). В эксперименте ее блокирование индуцировало мезенхимный фенотип опухолевых клеток, усиливало их миграцию и пролиферацию за счет активации пути CXCL12/CXCR4 и индукции активных форм кислорода (Aversa et al., 2017).

В ряде экспериментальных и клинических исследований показана роль оси CXCR4/CXCL12 в метастазировании РМЖ в печень, лимфатические узлы, легкие, кости и головной мозг. Установлено, что формирование так называемых преметастатических ниш связано с высокими уровнями CXCL12 в органах-мишенях, что способствовало привлечению в них клеток РМЖ с экспрессией CXCR4 (Ганцев и др., 2012; Okuyama Kishima et al., 2015; Zhou et al., 2019).

Показано, что плазмцитоподобные дендритные клетки секретируют фактор TNF, индуцирующий экспрессию CXCR4 в клетках РМЖ. У пациенток с метастазами РМЖ в регионарные лимфоузлы, в отличие от пациенток без метастазов, наблюдали повышенную инфильтрацию опухоли плазмцитоподобными дендритными клетками и более высокое содержание CXCR4-положительных опухолевых клеток; в то же время в ткани лимфоузлов с метастазами уровень экспрессии CXCL12 был выше, чем в лимфоузлах без метастазов (Gadalla et al., 2019). Другие авторы установили, что метастазированию РМЖ в регионарные лимфоузлы способствует накопление в них В-клеток, синтезирующих особые

иммуноглобулины (IgG), которые индуцируют экспрессию CXCR4 в раковых клетках. Высокие уровни этих IgG в сыворотке пациенток с РМЖ коррелировали с метастазами в лимфатические узлы (Gu et al., 2019).

Что касается метастазирования РМЖ в легкие, то на мышинных моделях установлено, что важную роль в этом процессе играют цитокины CXCL1, CXCL2 и CXCL5, которые экспрессируются стромальными и иммунными клетками, активированными TNF. В свою очередь, эти лиганды привлекают CXCR2-позитивные нейтрофилы в микроокружение опухоли, которые при взаимодействии с опухолевыми клетками индуцируют экспрессию генов CXCR4 и MMP-2, участвующих в метастазировании (Yu et al., 2017). В экспериментальном исследовании *in vitro* показано, что LRP6 — онкоген, активирующий сигнальный путь Wnt/ β -катенин, — может конкурентно связываться с CXCR4, предотвращая его связывание с CXCL12, что в итоге приводит к подавлению метастазирования в легкие у мышей (Zhang et al., 2019).

Крайне интересным является исследование авторов (Price et al., 2016), которые на модели ксенотрансплантата РМЖ при микроскопии костного мозга в режиме реального времени установили, что «спящие» клетки РМЖ локализуются в перисинусоидальных сосудистых областях, богатых Е-селектином и CXCL12. Е-селектин позволяет клеткам РМЖ проникать в костный мозг, тогда как передача сигналов CXCL12/CXCR4 закрепляет эти клетки в костном мозге, создавая защитное микроокружение для спящих микрометастазов (Price et al., 2016). Авторы полагают, что одномоментная блокада CXCR4 и Е-селектина у пациентов может элиминировать спящие микрометастазы из костного мозга, предотвращая их возникновение в виде рецидива заболевания.

Метастазирование РМЖ в головной мозг связано с опухоль-ассоциированными фибробластами и астроцитами, продуцирующими высокие уровни CXCL12 и CXCL16. Так, опухоль-ассоциированные фибробласты, полученные из метастазов РМЖ в головной мозг, имели более высокую экспрессию этих хемокинов по сравнению с нормальными фибробластами и опухоль-ассоциированными фибробластами, полученными из первичных

опухолей молочной железы. В эксперименте эти фибробласты являлись более сильными индукторами миграции опухолевых клеток (Chung et al., 2017). Другие исследователи показали, что экспрессия CXCL12 в эндотелиальных клетках увеличивает проницаемость гематоэнцефалического барьера, что также способствует метастазированию РМЖ в головной мозг (Zielińska et al., 2020). Аналогичные результаты получены и другими авторами (Wendel et al., 2012), которые на мышинной модели РМЖ показали, что ось CXCR4/CXCL12 участвует в экстравазации клеток РМЖ в печень.

Роль в опухолевом ангиогенезе. Согласно современным данным, хемокины играют ключевую роль в регуляции опухолеассоциированного ангиогенеза. С одной стороны, они могут активировать пролиферацию и прорастание эндотелиальных клеток, а с другой — ингибировать ангиогены (Marcuzzi et al., 2019). К ангиогенным хемокинам относят CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 и CXCL12, которые обеспечивают стимулирующие сигналы, посредством взаимодействия с рецепторами CXCR2 и CXCR4. Представителями ангиостатических хемокинов являются CXCL4, CXCL9, CXCL10 и CXCL11. Они ингибируют процесс неоангиогенеза, связывая CXCR3-B (Marcuzzi et al., 2019).

Накопление CXCL12 в микроокружении опухоли увеличивает секрецию фактора VEGF, активирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток с образованием трубчатых структур (Marcuzzi et al., 2019; Yang et al., 2023). Интересно, что и на опухолевых, и на эндотелиальных клетках обнаружена экспрессия атипичного рецептора ACKR3/CXCR7, который регулирует клеточную инвазию, адгезию и ангиогенез посредством активации Akt-зависимого пути (Yamada et al., 2015; Zhang et al., 2017). Кроме того, в ряде исследований показано, что градиент CXCL12 приводит к увеличению экспрессии молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) на эндотелиальных клетках, что способствует успешному прикреплению опухолевых клеток к микрососудистому эндотелию и метастазированию (Tung et al., 2012).

Еще одним механизмом опухолевого ангиогенеза является генерация опухолей ассоциированными фибробластами совместно

с эндотелиальными клетками локального градиента CXCL12, что привлекает эндотелиальные клетки-предшественники CXCR4⁺, усиливая опухолевый ангиогенез (Zielińska et al., 2020). Более того, CXCL12, полученный из опухоли-ассоциированных фибробластов, приводит к нарушению целостности эндотелиального барьера, тем самым повышая проницаемость сосудов, что способствует отдаленному метастазированию РМЖ (Boimel et al., 2012; Chang et al., 2020).

Однако есть исследования, в которых были получены противоположные результаты. Так, показано, что CXCL12 способен снижать опосредованную тромбином гиперпроницаемость сосудов (Cheng et al., 2017). Аналогичные результаты были получены и другими авторами (Kobayashi et al., 2014). Возможно, эти противоречия связаны с различными экспериментальными условиями, разными типами эндотелиальных клеток, а также тем, что разные изоформы CXCL12 могут оказывать различное влияние на целостность эндотелия (Chang et al., 2020).

Роль в формировании стволового фенотипа опухолевых клеток. Важно отметить, что и CXCR4, и CXCR7 играют ключевую роль в формировании опухолевых стволовых клеток. На это указывает тот факт, что блокирование CXCR7 приводит к снижению уровней клеток CD44⁺/CD24⁻, опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH, а также экспрессии генов *Oct4* и *nanog* (Tang et al., 2016). Более того, ось CXCL12/CXCR4 способствует генерации опухолевых стволовых клеток из клеток РМЖ, устойчивых к тамоксифену (Dubrovskaya et al., 2012). При РМЖ люминального типа А продемонстрировано, что сверхэкспрессия CXCL12 в клетках РМЖ увеличивает долю клеток CD44⁺/CD24 (клеток, экспрессирующих ALDH), а также экспрессию маркеров стволовости, таких как *Oct4*, *nanog* и *sox2* (Kong et al., 2016). Опухолевые клетки, экспрессирующие CXCR4, продемонстрировали более высокую способность образовывать маммосферы, чем CXCR4-негативные клетки (Morein et al., 2020).

Роль в ускользании опухоли от иммунного надзора. Продуцируемые опухолью хемокины способствуют привлечению иммуносупрессивных клеток для индукции иммуносупрессивного микроокружения (Wei et al., 2020). Кроме того, хемокины способны

повышать или стабилизировать экспрессию лиганда программированной клеточной смерти 1 (PD-L1) опухолевыми клетками, тем самым косвенно снижая эффективность противоопухолевых иммунных реакций (Morein et al., 2020). Установлено, что активация CXCR4 связана с усилением иммуносупрессии при тройном негативном РМЖ (Lu et al., 2021). Авторы показали, что комбинация анти-PD-L1 с антагонистом CXCR4 с липосомным составом (liposomal-AMD3100) продемонстрировала повышенный противоопухолевый эффект и пролонгированное время выживания по сравнению с монотерапией анти-PD-L1 на мышинной модели тройного негативного РМЖ (Lu et al., 2021). Аналогичные результаты получены и другими авторами как на моделях РМЖ, так и рака яичников и поджелудочной железы (Feig et al., 2013; Chen et al., 2019; D'Alterio et al., 2019; Zeng et al., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о том, что хемокин CXCL12 и его рецепторы CXCR4/CXCR7 играют важную роль в процессах роста опухоли, инвазии, метастазирования, опухолевого ангиогенеза, индукции ЭМП, модуляции противоопухолевого иммунитета, а также развития лекарственной устойчивости. Эта ось является многообещающей мишенью для терапевтического вмешательства. Однако следует учитывать тот факт, что CXCL12 и его рецепторы играют важную роль не только в опухолевой прогрессии, но и в гомеостазе и воспалении, что предполагает значительную токсичность фармакологических препаратов, нацеленных на эту ось. Помимо этого, недостаточно изучена роль и функции CXCR7 в прогрессировании рака. Выяснение этих функций и их механизмов, несомненно, внесет вклад в разработку более совершенных противоопухолевых средств, нацеленных на ось CXCL12. В перспективе необходимо исследовать возможность адресной доставки для антагонистов CXCR4, что повысит их эффективность и уменьшит их побочные эффекты (Shi et al., 2020). Другим перспективным направлением является разработка радиофармпрепаратов, нацеленных на CXCR4, которые можно использовать как с диагностической

целью (для визуализации опухоли и метастазов), так и с терапевтической (Yu et al., 2023).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00183, <https://rscf.ru/project/23-25-00183/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не участвовали животные или люди в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ганцев Ш. Х., Пухов А.Г., Хуснутдинова Э.К., Галеев М.Г., Ганцев К.Ш., Ишмуратова Р.Ш., Исламгулов Д.В., Фролова В.Ю., Кыргалин Ш.Р., Мусин Ш.И., Халикова Л.В. 2012. Неолимфогенез и профиль экспрессии хемокинов при раке молочной железы. Креативная хирургия и онкология. № 1. С. 4. (Gancev S.H., Puhov A.G., Husnutdinova E.K., Galeev M.G., Gancev K.S., Ishmuratova R.S., Islamgulov D.V., Frolova V.YU., Kzyrgalin S.H.R., Musin S.H.I., Halikova L.V. 2012. Neolimfogenez i profil' ekspressii hemokinov pri rake molochnoj zhelezy. Kreativnaya hirurgiya i onkologiya, № 1. P. 4.).
- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. 2021. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена. (Kaprin A.D., Starinskij V.V., Shahzadova A.O. 2021. Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2020 godu (zabolevaemost' i smertnost'). Moskva: MNIIOI im. P.A. Gercena.)
- Стукань А.И., Горяинова А.Ю., Шаров С.В., Андреев Д.В., Лымарь Е.В. 2021. Механизмы метастазирования и развития резистентности к терапии при раке молочной железы. Клинический случай эффективности иксабепилона при формировании множественной лекарственной устойчивости гормон-рецептор-позитивного рака молочной железы. Медицинский совет. № 20. С. 54. (Stukan' A.I., Goryainova A.Y., Sharov S.V., Andreev D.V., Lyumar' E.V. 2021. Mekhanizmy metastazirovaniya i razvitiya rezistentnosti k terapii pri rake molochnoj

- zhelezy. Klinicheskij sluchaj effektivnosti iksabepilona pri formirovanii mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti gormon-receptor-pozitivnogo raka molochnoj zhelezy. *Medicinskij Sovet*. № 20. P. 54.)
<https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-20-54-61>
- Agarwal U., Ghalayini W., Dong F., Weber K., Zou Y.R., Rabbany S.Y., Rafii S., Penn M.S. 2010. Role of cardiac myocyte CXCR4 expression in development and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Res*. V. 107. P. 667.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223289>
- Aversa I., Zolea F., Ieranò C., Bulotta S., Trotta A.M., Faniello M.C., De Marco C., Malanga D., Biamonte F., Viglietto G., Cuda G., Scala S., Costanzo F. 2017. Epithelial-to-mesenchymal transition in FHC-silenced cells: the role of CXCR4/CXCL12 axis. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. V. 36. P. 104.
<https://doi.org/10.1186/s13046-017-0571-8>
- Bianchi M.E., Mezzapelle R. 2020. The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tiss. Regenerat. *Front Immunol*. V. 11. P. 2109.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02109>
- Boesch M., Onder L., Cheng H.W., Novkovic M., Mörbbe U., Sopper S., Gastl G., Jochum W., Ruhstaller T., Knauer M., Ludewig B. 2018. Interleukin 7-expressing fibroblasts promote breast cancer growth through sustenance of tumor cell stemness. *Oncoimmunol*. V. 7. P. e1414129.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1414129>
- Boimel P.J., Smirnova T., Zhou Z.N., Wyckoff J., Park H., Coniglio S.J., Qian B.Z., Stanley E.R., Cox D., Pollard J.W., Muller W.J., Condeelis J., Segall J.E. 2012. Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. V. 14. P. R23.
<https://doi.org/10.1186/bcr3108>
- Bolitho C., Hahn M.A., Baxter R.C., Marsh D.J. 2010. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocr. Relat. Cancer*. V. 17. P. 929.
<https://doi.org/10.1677/ERC-10-0107>
- Cambier S., Gouwy M., Proost P. 2023. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cell. Mol. Immunol*. 2023. V. 20. P. 217.
<https://doi.org/10.1038/s41423-023-00974-6>
- Chang C.W., Seibel A.J., Avendano A., Cortes-Medina M.G., Song J.W. 2020. Distinguishing specific CXCL12 isoforms on their angiogenesis and vascular permeability promoting properties. *Adv. Healthcare Mater*. V. 9. Art. ID e1901399.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201901399>
- Chatterjee S., Behnam Azad B., Nimmagadda S. 2014. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv. Cancer Res*. V. 124. P. 31.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1>
- Chen H.J., Edwards R., Tucci S., Bu P., Milsom J., Lee S., Edelmann W., Gümüs Z.H., Shen X., Lipkin S. 2012. Chemokine 25-induced signaling suppresses colon cancer invasion and metastasis. *J. Clin. Invest*. V. 122. P. 3184.
<https://doi.org/10.1172/JCI62110>
- Chen I.X., Chauhan V.P., Posada J., Ng M.R., Wu M.W., Adstamongkonkul P., Huang P., Lindeman N., Langer R., Jain R.K. 2019. Blocking CXCR4 alleviates desmoplasia, increases T-lymphocyte infiltration, and improves immunotherapy in metastatic breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 116. P. 4558.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1815515116>
- Cheng Y.H., Eby J.M., LaPorte H.M., Volkman B.F., Majetschak M. 2017. Effects of cognate, non-cognate and synthetic CXCR4 and ACKR3 ligands on human lung endothelial cell barrier function. *PLoS One*. V. 12. Art. ID e0187949.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187949>
- Chung B., Esmaeili A.A., Gopalakrishna-Pillai S., Murad J.P., Andersen E.S., Kumar Reddy N., Srinivasan G., Armstrong B., Chu C., Kim Y., Tong T., Waisman J., Yim J.H., Badie B., Lee P.P. 2017. Human brain metastatic stroma attracts breast cancer cells via chemokines CXCL16 and CXCL12. *NPJ Breast Cancer*. V. 3. P. 6.
<https://doi.org/10.1038/s41523-017-0008-8>
- Costa A., Kieffer Y., Scholer-Dahirel A., Pelon F., Bourachot B., Cardon M., Sirven P., Magagna I., Fuhrmann L., Bernard C., Bonneau C., Kondratova M., Kuperstein I., Zinovyev A., Givel A.M., Parrini M.C., Soumelis V., Vincent-Salomon A., Mechta-Grigoriou F. 2018. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. *Cancer Cell*. V. 33. P. 463.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>
- Cui L., Qu H., Xiao T., Zhao M., Jolkonen J., Zhao C. 2013. Stromal cell-derived factor-1 and its receptor CXCR4 in adult neurogenesis after cerebral ischemia. *Restor. Neurol. Neurosci*. V. 31. P. 239.
<https://doi.org/10.3233/RNN-120271>
- D'Alterio C., Buoncervello M., Ieranò C., Napolitano M., Portella L., Rea G., Barbieri A., Luciano A., Scognamiglio G., Tatangelo F., Anniciello A.M., Monaco M., Cavalcanti E., Maiolino P., Romagnoli G., Arra C., Botti G., Gabriele L., Scala S. 2019. Targeting CXCR4 potentiates anti-PD-1 efficacy modifying the tumor microenvironment and inhibiting neoplastic PD-1. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. V. 38. P. 432.
<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1420-8>

- Daniel S.K., Seo Y.D., Pillarisetty V.G. 2020. The CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis as a mechanism of immune resistance in gastrointestinal malignancies. *Semin. Cancer Biol.* V. 65. P. 176.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.007>
- De Oliveira K.B., Guembarovski R.L., Guembarovski A.M., da Silva do Amaral Herrera A.C., Sobrinho W.J., Ariza C.B., Watanabe M.A. 2013. CXCL12, CXCR4 and IFN γ genes expression: implications for proinflammatory microenvironment of breast cancer. *Clin. Exper. Med.* V. 13. P. 211.
<https://doi.org/10.1007/s10238-012-0194-5>
- Döring Y., van der Vorst E.P.C., Duchene J., Jansen Y., Gencer S., Bidzhekov K., Atzler D., Santovito D., Rader D.J., Saleheen D., Weber C. 2019. CXCL12 derived from endothelial cells promotes atherosclerosis to drive coronary artery disease. *Circulation.* V. 139. P. 1338.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037953>
- Dubrovskaya A., Hartung A., Bouchez L.C., Walker J.R., Reddy V.A., Cho C.Y., Schultz P.G. 2012. CXCR4 activation maintains a stem cell population in tamoxifen-resistant breast cancer cells through AhR signalling. *British J. Cancer.* V. 107. P. 43.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2012.105>
- Elias S., Sharma R., Schizas M., Valdez I., Rampersaud S., Park S.M., Gonzalez-Figueroa P., Li Q.Z., Hoyos B., Rudensky A.Y. 2022. CXCR4⁺ Treg cells control serum IgM levels and natural IgM autoantibody production by B-1 cells in the bone marrow. *J. Exper. Med.* V. 219. Art. ID e20220047.
<https://doi.org/10.1084/jem.20220047>
- Espósito A., Klüppel M., Wilson B.M., Meka S.R.K., Spagnoli A. 2023. CXCR4 mediates the effects of IGF-1R signaling in rodent bone homeostasis and fracture repair. *Bone.* V. 166. Art. ID 116600.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116600>
- Fang Y.Y., Lyu F., Abuwala N., Tal A., Chen A.Y., Taylor H.S., Tal R. 2022. Chemokine C-X-C receptor 4 mediates recruitment of bone marrow-derived nonhematopoietic and immune cells to the pregnant uterus†. *Biol. Reprod.* V. 106. P. 1083.
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac029>
- Feig C., Jones J.O., Kraman M., Wells R.J., Deonarine A., Chan D.S., Connell C.M., Roberts E.W., Zhao Q., Caballero O.L., Teichmann S.A., Janowitz T., Jodrell D.I., Tuveson D.A., Fearon D.T. 2013. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 110. P. 20212.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1320318110>
- Gadalla R., Hassan H., Ibrahim S.A., Abdullah M.S., Gaballah A., Greve B., El-Deeb S., El-Shinawi M., Mohamed M.M. 2019. Tumor microenvironmental plasmacytoid dendritic cells contribute to breast cancer lymph node metastasis via CXCR4/SDF-1 axis. *Breast Cancer Res. Treat.* V. 174. P. 679.
<https://doi.org/10.1007/s10549-019-05129-8>
- Gao D., Tang T., Zhu J., Tang Y., Sun H., Li S. 2019. CXCL12 has therapeutic value in facial nerve injury and promotes Schwann cells autophagy and migration via PI3K-AKT-mTOR signal pathway. *Int. J. Biol. Macromol.* V. 124. P. 460.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.212>
- Ghosh M.C., Makena P.S., Gorantla V., Sinclair S.E., Walters C.M. 2012. CXCR4 regulates migration of lung alveolar epithelial cells through activation of Rac1 and matrix metalloproteinase-2. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* V. 302. P. 846.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00321.2011>
- Gu Y., Liu Y., Fu L., Zhai L., Zhu J., Han Y., Jiang Y., Zhang Y., Zhang P., Jiang Z., Zhang X., Cao X. 2019. Tumor-educated B cells selectively promote breast cancer lymph node metastasis by HSPA4-targeting IgG. *Nat. Med.* V. 25. P. 312.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0309-y>
- Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J., Gnant M., Housami N., Poortmans P., Ruddy K., Tsang J., Cardoso F. 2019. Breast Cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers.* V. 5. P. 66.
<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Heinrich E.L., Lee W., Lu J., Lowy A.M., Kim J. 2012. Chemokine CXCL12 activates dual CXCR4 and CXCR7-mediated signaling pathways in pancreatic cancer cells. *J. Translat. Med.* V. 10. P. 68.
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-68>
- Janssens R., Struyf S., Proost P. 2018. Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine growth factor Rev.* V. 44. P. 51.
<https://doi.org/10.1016/j.cytofr.2018.10.004>
- Janssens R., Struyf S., Proost P. 2018. The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell. Mol. Immunol.* V. 15. P. 299.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2017.107>
- Khare T., Bissonnette M., Khare S. 2021. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in colorectal cancer: therapeutic target in preclinical and clinical studies. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. Art. ID 7371.
<https://doi.org/10.3390/ijms22147371>
- Kim H., Sung J., Kim H., Ryu H., Cho Park H., Oh Y.K., Lee H.S., Oh K.H., Ahn C. 2019. Expression and secretion of CXCL12 are enhanced in autosomal dominant polycystic kidney disease. *BMB Rep.* V. 52. P. 463.
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.7.112>
- Kobayashi K., Sato K., Kida T., Omori K., Hori M., Ozaki H., Murata T. 2014. Stromal cell-derived factor-1 α /C-X-C chemokine receptor type 4 axis promotes endothelial cell barrier integrity via phosphoinositide

- 3-kinase and Rac1 activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* V. 34. P. 1716.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303890>
- Kong L., Guo S., Liu C., Zhao Y., Feng C., Liu Y., Wang T., Li C. 2016. Overexpression of SDF-1 activates the NF- κ B pathway to induce epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes of breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* V. 48. Art. ID 1085.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3343>
- Li S., Fan Y., Kumagai A., Kawakita E., Kitada M., Kanasaki K., Koya D. 2020. Deficiency in dipeptidyl peptidase-4 promotes chemoresistance through the CXCL12/CXCR4/mTOR/TGF β signaling pathway in breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. Art. ID 805.
<https://doi.org/10.3390/ijms21030805>
- Lu G., Qiu Y., Su X. 2021. Targeting CXCL12-CXCR4 Signaling enhances immune checkpoint blockade therapy against triple negative breast cancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* V. 157. Art. ID 105606.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105606>
- Marcuzzi E., Angioni R., Molon B., Cali B. 2018. Chemokines and chemokine receptors: orchestrating tumor metastasization. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. Art. ID 96.
<https://doi.org/10.3390/ijms20112651>
- McQuade A., Kang Y.J., Hasselmann J., Jairaman A., Sotelo A., Coburn M., Shabestari S.K., Chadarevian J.P., Fote G., Tu C.H., Danhash E., Silva J., Martinez E., Cotman C., Prieto G.A., Thompson L.M., Steffan J.S., Smith I., Davtyan H., Cahalan M., Cho H., Blurton-Jones M. 2020. Gene expression and functional deficits underlie TREM2-knockout microglia responses in human models of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* V. 11. P. 5370.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-36930-1>
- Miao R., Lim V.Y., Kothapalli N., Ma Y., Fossati J., Zehentmeier S., Sun R., Pereira J.P. 2020. Hematopoietic stem cell niches and signals controlling immune cell development and maintenance of immunological memory. *Front. Immunol.* V. 11. Art. ID 600127.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.600127>
- Morein D., Erlichman N., Ben-Baruch A. 2020. Beyond cell motility: the expanding roles of chemokines and their receptors in malignancy. *Front Immunol.* V. 11. P. 952.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00952>
- Mukherjee D., Zhao J. 2013. The role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am. J. Cancer Res.* V. 3. P. 46.
- Murad H.A.S., Rafeeq M.M., Alqurashi T.M.A. 2021. Role and implications of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis in atherosclerosis: still a debate. *Ann. Med.* V. 53. P. 1598.
<https://doi.org/10.1080/07853890.2021.1974084>
- Okuyama Kishima M., de Oliveira C.E., Banin-Hirata B.K., Losi-Guembarovski R., Brajão de Oliveira K., Amarante M.K., Watanabe M.A. 2015. Immunohistochemical expression of CXCR4 on breast cancer and its clinical significance. *Anal. Cell. Pathol. (Amst).* V. 2015. P. 891020.
<https://doi.org/10.1155/2015/891020>
- Price T.T., Burness M.L., Sivan A., Warner M.J., Cheng R., Lee C.H., Olivere L., Comatas K., Magnani J., Kim Lyerly H., Cheng Q., McCall C.M., Sipkins D.A. 2016. Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone. *Sci. Transl. Med.* V. 8. Art. ID 340ra73.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad4059>
- Rajagopal S., Kim J., Ahn S., Craig S., Lam C.M., Gerard N.P., Gerard C., Lefkowitz R.J. 2010. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 107. P. 628.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0912852107>
- Raman D., Sobolik-Delmaire T., Richmond A. 2011. Chemokines in health and disease. *Exp. Cell Res.* V. 317. P. 575.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.01.005>
- Ramos E.A., Grochoski M., Braun-Prado K., Seniski G.G., Cavalli I.J., Ribeiro E.M., Camargo A.A., Costa F.F., Klassen G. 2011. Epigenetic changes of CXCR4 and its ligand CXCL12 as prognostic factors for sporadic breast cancer. *PLoS One.* V. 6. Art. ID e29461.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029461>
- Righetti A., Giulietti M., Šabanović B., Occhipinti G., Principato G., Piva F. 2019. CXCL12 and Its isoforms: different roles in pancreatic cancer? *J. Oncol.* V. 2019. Art. ID 9681698.
<https://doi.org/10.1155/2019/9681698>
- Rot A., von Andrian U.H. 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* V. 22. P. 891.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703>
- Sainz J., Sata M. 2007. CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* V. 27. P. 263.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000256727.34148.e2>
- Sayyed S.G., Hägele H., Kulkarni O.P., Endlich K., Segerer S., Eulberg D., Klusmann S., Anders H.J. 2009. Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* V. 52. P. 2445.
<https://doi.org/10.1007/s00125-009-1493-6>
- Scala S. 2015. Molecular Pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 Axis—untapped potential in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* V. 21. P. 4278.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0914>

- Scherz-Shouval R., Santagata S., Mendillo M.L., Sholl L.M., Ben-Aharon I., Beck A.H., Dias-Santagata D., Koeva M., Stemmer S.M., Whitesell L., Lindquist S. 2014. The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy. *Cell*. V. 158. P. 564. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.045>
- Shi Y., Riese D.J., Shen J. 2020. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis in cancer. *Front. Pharmacol.* V. 11. Art. ID 574667. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.574667>
- Song J.K., Park M.H., Choi D.Y., Yoo H.S., Han S.B., Yoon D.Y., Hong J.T. 2012. Deficiency of C-C chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF- κ B and upregulation of IL-1Ra in melanoma model. *PLoS One*. V. 7. Art. ID e33747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033747>
- Stone M.J., Hayward J.A., Huang C., Huma Z., Sanchez J. 2017. Mechanisms of regulation of the chemokine-receptor network. *Int. J. Mol. Sci.* V. 18. P. 342. <https://doi.org/10.3390/ijms18020342>
- Strazza M., Azoulay-Alfaguter I., Peled M., Smrcka A.V., Skolnik E.Y., Srivastava S., Mor A. 2017. PLC ϵ 1 regulates SDF-1 α -induced lymphocyte adhesion and migration to sites of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 114. P. 2693. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612900114>
- Su H., Sobrino Najul E.J., Toth T.A., Ng C.M., Lelievre S.A., Fred M., Tang C.K. 2011. Chemokine receptor CXCR4-mediated transformation of mammary epithelial cells by enhancing multiple RTKs expression and deregulation of the p53/MDM2 axis. *Cancer Lett.* V. 307. P. 132. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.03.025>
- Tang X., Li X., Li Z., Liu Y., Yao L., Song S., Yang H., Li C. 2016. Downregulation of CXCR7 inhibits proliferative capacity and stem cell-like properties in breast cancer stem cells. *Tumour. Biol.* V. 37. P. 13425. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5180-1>
- Tang X., Tu G., Yang G., Wang X., Kang L., Yang L., Zeng H., Wan X., Qiao Y., Cui X., Liu M., Hou Y. 2019. Autocrine TGF- β 1/miR-200s/miR-221/DNMT3B regulatory loop maintains CAF status to fuel breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* V. 452. P. 79. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.044>
- Thakar D., Dalonneau F., Migliorini E., Lortat-Jacob H., Boturyn D., Albiges-Rizo C., Coche-Guerente L., Picart C., Richter R.P. 2017. Binding of the chemokine CXCL12 α to its natural extracellular matrix ligand heparan sulfate enables myoblast adhesion and facilitates cell motility. *Biomaterials*. V. 123. P. 24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.022>
- Tung S.Y., Chang S.F., Chou M.H., Huang W.S., Hsieh Y.Y., Shen C.H., Kuo H.C., Chen C.N. 2012. CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1 regulates cell adhesion in human colon cancer cells by induction of intercellular adhesion molecule-1. *J. Biomed. Sci.* V. 19. Art. ID 91. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-91>
- Wang Y., Gao F. 2023. Research progress of CXCR4-targeting radioligands for oncologic imaging. *Korean J. Radiol.* V. 24. P. 871. <https://doi.org/10.3348/kjr.2023.0091>
- Wani N., Nasser M.W., Ahirwar D.K., Zhao H., Miao Z., Shilo K., Ganju R.K. 2014. C-X-C motif chemokine 12/C-X-C chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* V. 16. Art. ID R54. <https://doi.org/10.1186/bcr3665>
- Wei C.Y., Zhu M.X., Lu N.H., Liu J.Q., Yang Y.W., Zhang Y., Shi Y.D., Feng Z.H., Li J.X., Qi F.Z., Gu J.Y. 2020. Circular RNA circ_0020710 drives tumor progression and immune evasion by regulating the miR-370-3p/CXCL12 axis in melanoma. *Mol. Cancer*. V. 19. P. 84. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01191-9>
- Wendel C., Hempling-Bovenkerk A., Krasnyanska J., Mees S.T., Kochetkova M., Stoeppler S., Haier J. 2012. CXCR4/CXCL12 participate in extravasation of metastasizing breast cancer cells within the liver in a rat model. *PLoS One*. V. 7. Art. ID e30046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030046>
- Wu B., Chien E.Y., Mol C.D., Fenalti G., Liu W., Katriitch V., Abagyan R., Brooun A., Wells P., Bi F.C., Hamel D.J., Kuhn P., Handel T.M., Cherezov V., Stevens R.C. 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*. V. 330. P. 1066. <https://doi.org/10.1126/science.1194396>
- Yamada K., Maishi N., Akiyama K., Towfik Alam M., Ohga N., Kawamoto T., Shindoh M., Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A., Hida K. 2015. CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property. *Int. J. Cancer*. V. 137. Art. ID 2825. <https://doi.org/10.1002/ijc.29655>
- Yang F., Takagaki Y., Yoshitomi Y., Ikeda T., Li J., Kitada M., Kumagai A., Kawakita E., Shi S., Kanasaki K., Koya D. 2019. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 accelerates epithelial-mesenchymal transition and breast cancer metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR axis. *Cancer Res.* V. 79. P. 735. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0620>
- Yang Y., Li J., Lei W., Wang H., Ni Y., Liu Y., Yan H., Tian Y., Wang Z., Yang Z., Yang S., Yang Y., Wang Q. 2023. CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in cancer: from mechanisms to clinical applications. *Int. J. Biol. Sci.* V. 19. Art. ID 3341. <https://doi.org/10.7150/ijbs.82317>

- Yu J., Zhou X., Shen L. 2023. CXCR4-targeted radiopharmaceuticals for the imaging and therapy of malignant tumors. *Molecules*. V. 28. Art. ID 4707. <https://doi.org/10.3390/molecules28124707>
- Yu P.F., Huang Y., Xu C.L., Lin L.Y., Han Y.Y., Sun W.H., Hu G.H., Rabson A.B., Wang Y., Shi Y.F. 2017. Down-regulation of CXCL12 in mesenchymal stromal cells by TGF β promotes breast cancer metastasis. *Oncogene*. V. 36. P. 840. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.252>
- Zeng Y., Li B., Liang Y., Reeves P.M., Qu X., Ran C., Liu Q., Callahan M.V., Sluder A.E., Gelfand J.A., Chen H., Poznansky M.C. 2019. Dual blockade of CXCL12-CXCR4 and PD-1-PD-L1 pathways prolongs survival of ovarian tumor-bearing mice by prevention of immunosuppression in the tumor microenvironment. *FASEB J.* V. 33. P. 6596. <https://doi.org/10.1096/fj.201802067RR>
- Zhang J., Chen J., Wo D., Yan H., Liu P., Ma E., Li L., Zheng L., Chen D., Yu Z., Liang C., Peng J., Ren D.N., Zhu W. 2019. LRP6 Ectodomain prevents SDF-1/CXCR4-induced breast cancer metastasis to lung. *Clin. Cancer Res.* V. 25. P. 4832. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3557>
- Zhang M., Qiu L., Zhang Y., Xu D., Zheng J.C., Jiang L. 2017. CXCL12 enhances angiogenesis through CXCR7 activation in human umbilical vein endothelial cells. *Sci. Rep.* V. 7. P. 8289. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08840-y>
- Zhou W., Guo S., Liu M., Burow M.E., Wang G. 2019. Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy. *Curr. Med. Chem.* V. 26. P. 3026. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170830111531>
- Zielińska K.A., Katanaev V.L. 2020. The signaling duo CXCL12 and CXCR4: chemokine fuel for breast cancer tumorigenesis. *Cancers (Basel)*. V. 12. Art. ID 3071. <https://doi.org/10.3390/cancers12103071>
- Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D.R. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. V. 393. P. 595. <https://doi.org/10.1038/31269>

CHEMOKININ CXCL12 AND ITS RECEPTORS CXCR4 AND CXCR7 IN THE PROGRESSION OF BREAST CANCER

E. Y. Zubareva^{a, b, *}, M. A. Senchukova^{a, b}, N. V. Saidler^a

^a Orenburg Regional Clinical Oncology Center, Orenburg, 460021, Russia

^b Orenburg State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, 460000, Russia

* E-mail: tishkova_evgeniy@mail.ru

Breast cancer ranks first in terms of cancer incidence and mortality among the female population. The main cause of death from breast cancer, as with other malignant neoplasms, is tumor dissemination and the development of resistance to treatment. Chemokines have been found to play an important role in the progression of malignant neoplasms. In this short review, we describe the current understanding of the role of the most studied chemokine, CXCL12 and its receptors, CXCR4 and CXCR7 in the progression of breast cancer.

Keywords: breast cancer, progression, chemokines, CXCL12, CXCR4, CXCR7

УДК 57.052

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ОНКОСУПРЕССОРА p53

© 2024 г. А. А. Романова^{1,*}, Т. А. Григорьева¹, В. Г. Трибулович¹

¹ Научно-исследовательская лаборатория «Молекулярная фармакология» Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), Санкт-Петербург, 190013, Россия

* E-mail: angeliina.romanova@outlook.com

Поступила в редакцию 11.10.2024

После доработки 22.10.2024

Принята к публикации 23.10.2024

Транскрипционный фактор p53, кодируемый геном *TP53*, на протяжении нескольких десятилетий привлекает к себе интерес исследователей как ключевой онкосупрессорный белок человека. Опосредованное p53 подавление развития опухоли осуществляется за счет трансактивации его генов-мишеней, либо в результате прямого связывания p53 с белковыми мишенями, которые участвуют в регуляции различных клеточных процессов. В обзоре кратко обсуждаются механизмы, задействованные в регуляции активности p53 на белковом уровне — от олигомеризации, необходимой для реализации трансактивационных механизмов p53, до убиквитин-зависимого протеолиза, поддерживающего низкий уровень этого проапоптотического белка в нормальных клетках. Отмечены основные ферменты, участвующие в различных посттрансляционных модификациях, и эффекты, к которым они могут приводить. Рациональное вмешательство в эти пути на том или ином этапе может быть актуально как в исследовательских целях, так и в прикладном аспекте, в частности, для разработки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: p53, посттрансляционные модификации (ПТМ), E3-убиквитинлигазы

DOI: 10.31857/S0041377124050028, **EDN:** DUXBQU

Белок p53, называемый «стражем генома», играет критическую роль в поддержании целостности ДНК отдельных клеток и предотвращении развития опухолей в многоклеточных организмах. Ключевыми функциями p53 в защите от онкогенеза являются регуляция клеточного цикла, активация механизмов репарации ДНК и запуск апоптоза в случае необратимого повреждения ДНК. Нарушение функционирования p53 связано с развитием различных типов опухолей, что подчеркивает его важность в сферах онкологии и клеточной биологии.

Как и другие белки, p53 подвергается различным посттрансляционным модификациям, которые играют значимую роль в его функционировании и регуляции активности. Эти модификации позволяют p53 адаптироваться к различным физиологическим условиям и обеспечивают его активацию в ответ на стрессовые сигналы. Можно отметить общие тенденции, отражающие роль белковых модификаций, например фосфорилирование

повышает транскрипционную активность p53, а убиквитинилирование может провоцировать протеолиз, однако вариативность этих модификаций в сочетании с большим количеством задействованных белков требует более глубокого понимания происходящих процессов.

С момента обнаружения белка и определения его роли в обеспечении стабильности генома постепенно расширялся спектр белков, идентифицированных как в качестве его ДНК- или белковых мишеней, так и в качестве ферментов и модификаторов, влияющих на его функционирование. Наибольший прикладной интерес вызывает лигаза MDM2, обеспечивающая убиквитинилирование белка, приводящее к подавлению трансактивационных механизмов, экспорту из ядра и протеолизу p53. Ингибирование белок-белкового взаимодействия p53–MDM2 считается привлекательной стратегией в разработке противоопухолевых агентов, и многие исследовательские группы сфокусированы на этом направлении (Шувалов и др., 2015; Bulatov et al., 2018; Fe-

dorova et al., 2018; Krasavin et al., 2018; Gri-goreva et al., 2020). Однако известно уже более 20 E3-убиквитинлигаз, не считая ферменты, регулирующие другие посттрансляционные модификации и сборку активных олигомеров, связывающих ДНК, и каждый из них может оказаться полезен для решения тех или иных прикладных задач.

Цель настоящего обзора заключается в обобщении сведений об основных посттрансляционных модификациях p53 и участвующих в них ферментах. Поскольку посттрансляционные модификации позволяют p53 динамично адаптироваться к изменениям условий, то их тонкая настройка может смещать баланс процессов клетки в ту или иную сторону, способствуя выживанию или гибели конкретных клеток. Понимание механизмов действия p53 и влияния посттрансляционных модификаций на регуляцию его активности имеет важное значение для разработки новых подходов к лечению не только рака, но и других заболеваний, таких как нейродегенеративные или метаболические расстройства.

ФУНКЦИИ P53

P53, кодируемый геном *TP53*, является ключевым онкосупрессором млекопитающих. Он выполняет функцию транскрипционного фактора и связывается непосредственно с промоторной областью ДНК-мишеней, реализуя

свою противоопухолевую активность. Этот белок играет существенную роль в регуляции различных клеточных процессов, таких как апоптоз, остановка клеточного цикла и репарация ДНК (рис. 1). Кроме того, ряд исследований продемонстрировал, что p53 также принимает участие в дифференцировке стволовых клеток, аутофагии, метаболических путях и ферроптозе (Чумаков, 2007; Hernandez et al., 2021; Wang et al., 2023).

Хотя p53 широко известен как активатор транскрипции генов (Fedorova et al., 2019), этот белок также влияет на клеточную судьбу путем прямого взаимодействия с белками. Так, индукция апоптоза может осуществляться за счет связывания p53 с антиапоптотическими белками семейства BCL-2 (BCL-XL и BCL-2), что приводит к высвобождению связанных с ними эффекторов клеточной гибели (BAX, BAK) (Moll et al., 2005).

В нормальных условиях p53 подвержен постоянному протеолизу в протеасомах, что обеспечивает его низкое содержание и активность, однако в условиях какого-либо стресса белок стабилизируется за счет различных посттрансляционных модификаций и накапливается в клетке, реализуя свою антионкогенную активность вплоть до индукции апоптотической гибели конкретной клетки.

Таким образом, основная роль p53 заключается в поддержании нормального функционирования отдельных клеток в многоклеточном

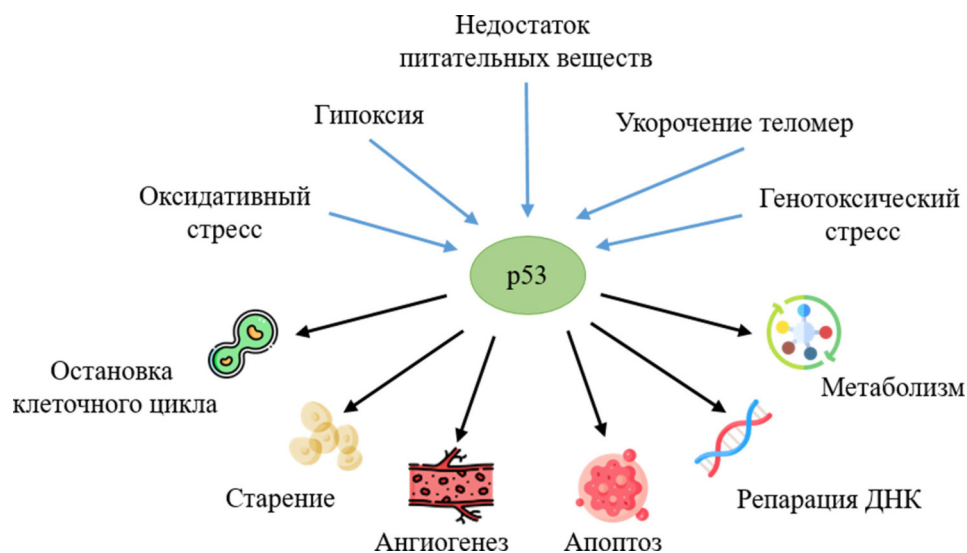


Рис. 1. Функции p53 в многоклеточном организме.

организме, в том числе в защите от передачи поврежденной ДНК в ходе деления и от приобретения абберантного фенотипа.

ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ P53 КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ ЕГО АКТИВНОСТИ

Ген *TP53* состоит из 13 экзонов, 11 из которых участвуют в кодировании полноразмерного p53 (Duffy et al., 2022). Такой белок содержит 393 аминокислотных остатка, образующих 5 основных функциональных доменов: N-концевой (трансактивационный, пролин-богатый, ДНК-связывающий, олигомеризационный) и регуляторный С-концевой. Каждый домен является мишенью для различных посттрансляционных модификаций, которые регулируют функции и определяют судьбу p53 (рис. 2).

Инициация транскрипции с разных промоторов, альтернативный сплайсинг интронов, инициация трансляции на разных кодонах, а также наличие внутреннего сайта входа в рибосому обеспечивают синтез различных вариантов изоформ белка. В результате использования кодонов, иницирующих альтернативную трансляцию из идентичных вариантов транскрипта, возникают дополнительные изоформы (Zhao, Sanayal, 2022). Транскрипты мРНК кодируют 12 различных изоформ: p53 (α /FL, β , γ), $\Delta 40$ p53 (α , β , γ), $\Delta 133$ p53 (α , β , γ) и $\Delta 160$ p53 (α , β , γ), которые можно разделить на 2 группы в зависимости от промотора, с которого иницируется транскрипция (P1 и P2) (Synoradzki et al., 2021). В первом случае белки содержат оба (p53) или только один ($\Delta 40$ p53) трансактивационный субдомен, а во втором — лишены трансактивационных субдоменов и части ДНК-связывающего домена ($\Delta 133$ p53, $\Delta 160$ p53) и, соответственно, являются транскрипционно неактивными (Kim,

An, 2016). Укороченные с С-конца изоформы β и γ , в свою очередь, теряют олигомеризационный и С-концевой домены в ходе альтернативного сплайсинга интрона 9 (Mehta et al., 2021).

Структурные различия между изоформами p53 опосредуют многообразие их функций. P53 реализуется как онкосупрессор за счет трансактивационного и ДНК-связывающего доменов, которые позволяют белку взаимодействовать с p53-респонсивными элементами ДНК мишеней. Кроме того, трансактивационный и С-концевой домены необходимы для негативной регуляции активности p53, осуществляемой различными E3-убиквитинлигазами. Пролинбогатый домен имеет большое значение для стабильности p53, в то время как олигомеризационный домен принимает участие в сборке функционально активного тетрамера (Bai, Zhu, 2006; Capuozzo et al., 2022). Перечисленные домены p53 часто подвергаются посттрансляционным модификациям, а соответствующие изоформы имеют наибольшую функциональную значимость. На ряде клеточных моделей показано, что p53-опосредованный клеточный ответ определяется балансом уровней экспрессии изоформ p53, при этом абберантная гиперэкспрессия каких-либо из них играет существенную роль в канцерогенезе (Асатулова, 2015; Mehta et al., 2021).

Для того, чтобы p53 мог выполнять свою роль транскрипционного фактора необходимо образование олигомеров, при этом связывание p53 с ДНК является высокоэффективным на уровне тетрамерного p53 и в меньшей степени димерного комплекса (Capuozzo et al., 2022). Олигомеризация p53 осуществляется за счет белок-белковых взаимодействий, регулируется посттрансляционными модификациями и зависит от концентрации p53 в клетке (Fischer

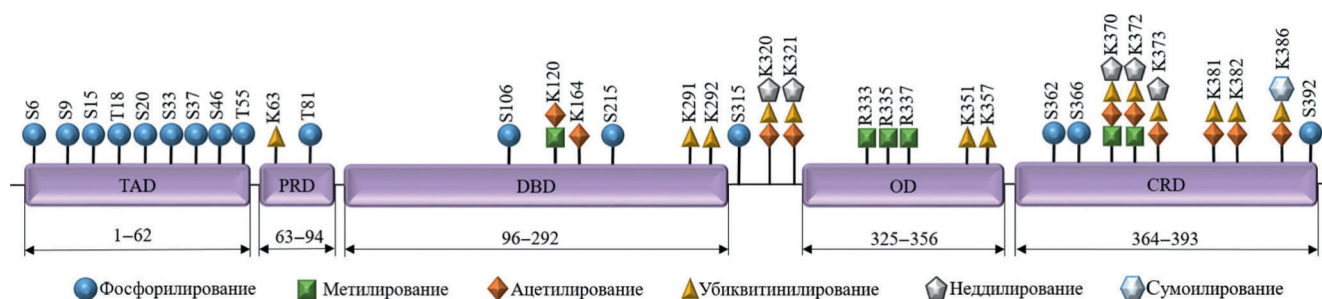


Рис. 2. Основные сайты посттрансляционных модификаций, показанные на доменной структуре полноразмерного p53 (p53 α /FLp53). TAD — трансактивационный домен; PRD — пролинбогатый домен; DBD — ДНК-связывающий домен; OD — олигомеризационный домен; CRD — С-концевой регуляторный домен

et al., 2016). Образование димеров происходит котрансляционно на полисоме, тогда как тетрамеры образуются посттрансляционно (Joerger, Fersht, 2010).

Формирование димерных и тетрамерных комплексов молекул p53 обеспечивается наличием олигомеризационного домена (Bai et al., 2006), причем связывание других белков с этим доменом может модулировать олигомеризацию и влиять на стабильность p53, способствуя (MYBBP1A, BCCIP, 14-3-3, S100) или подавляя (RBEL1A, ARC, S100A4 и S100B) процесс тетрамеризации (Fischer et al., 2016; Gencel-Augusto, Lozano, 2020). Посттрансляционные модификации этого участка также участвуют в регуляции олигомеризации p53. Например, фосфорилирование p53 по S392 способствует тетрамеризации, а по S315, наоборот, противодействует стабилизирующему эффекту фосфорилирования в положении S392 (Kamada et al., 2016; Gencel-Augusto et al., 2020). Показано, что нитрование p53 по Y327 способствует олигомеризации и активации ДНК-связывающей способности p53, а окисление по M340 дестабилизирует тетрамер p53 (Yakovlev et al., 2010; Kamada et al., 2016; Gencel-Augusto et al., 2020).

Как димеры, так и тетрамеры p53 способны связываться с ДНК генов-мишеней, однако конформация димера увеличивает сродство p53 с ДНК примерно в 160 раз, а тетрамера — в 1000 раз по сравнению с мономером (Fischer et al., 2016; Gencel-Augusto et al., 2020). В нормальных условиях наблюдается значительное доминирование димеров p53, в то время как в случае клеточного стресса возрастает доля тетрамеров (Gaglia et al., 2013; Fischer et al., 2016). Важным функциональным различием между димером и тетрамером p53 является неспособность димера вызывать апоптоз (Fischer et al., 2016).

Наиболее активной конформацией p53 является гомотетрамер, состоящий из 4 одинаковых субъединиц p53 (Lubin et al., 2010). Различные изоформы и мутантные p53 могут формировать нестабильные или слабо стабильные гетеротетрамеры из различных гомодимеров и полностью подавлять или изменять транскрипционные функции p53 (Lang et al., 2014; Kamada et al., 2016). Мутанты p53 с дефектом олигомеризации конкурируют с p53

дикого типа за связывание с ДНК-мишенями, подавляя его канонические функции (Lang et al., 2014), а гетеротетрамеры, включающие мутантные и дикого типа p53 проявляют более слабое сродство к связыванию ДНК генов-мишеней, чем гомотетрамеры p53 (Vieler, Sanyal, 2018). Экспрессия изоформ p53, сохранивших олигомеризационный домен, совместно с полноценным p53α за счет формирования гетеротетрамеров также снижает гомотетрамеризацию и транскрипционную активность полноразмерного p53 (Horikawa et al., 2017; Steffens Reinhardt et al., 2022).

Помимо описанных выше, возможно формирование гетеротетрамеров, включающих в свой состав других представителей семейства p53 — высокоомологичных ему белков p63 и p73 (Chillemi et al., 2013). Гомодимеры p63 и p73 могут собираться в гетеротетрамер p63/p73, который будет более термодинамически стабильным, чем гомодимеры, однако структурное различие между доменами p53 и p63/p73 препятствует их стабильному взаимодействию (Osterburg, Dötsch, 2022). Сборка гетеротетрамеров между онкогенными (мутантные или изоформы p53, ΔNp63, ΔNp73) и антионкогенными членами семейства p53 (p53wt, TAp63 и TAp73) коррелирует с потерей онкосупрессорных функций p53 (Vlasic et al., 2022).

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ P53 КАК СПОСОБ РЕГУЛЯЦИИ ЕГО АКТИВНОСТИ

Посттрансляционные модификации p53 можно условно разделить на две группы: те, которые влияют на активность белка (например, фосфорилирование и ацетилирование) и те, которые модифицируют p53 для последующей деградации (убиквитинилирование). Посттрансляционные модификации могут происходить в различных участках белка, а для некоторых аминокислотных остатков возможно модифицирование различными химическими группами (см. рис. 2). Последствия посттрансляционных модификаций p53 зависят не только от сайта модификации, но и от наличия посттрансляционных модификаций иных сайтов одного и того же белка. Более того, исход для p53 (активация или подавление функций) будет сильно отличаться в зависимости от множества

различных условий даже в случае модификации по одному и тому же аминокислотному остатку (Liu et al., 2019).

Фосфорилирование p53. Одной из первых изученных посттрансляционных модификаций p53 является фосфорилирование, которое способствует стабилизации p53 и формированию белок-белковых взаимодействий (Wen, Wang, 2021). Так, в случае различных клеточных стрессов индуцируется сайт-специфичное фосфорилирование p53 с помощью ряда серин/треониновых протеинкиназ ATM/ATR, CHK1/CHK2, ДНК-зависимой протеинкиназы DNA-PK и др. (Reed, Quelle, 2014; Wen, Wang, 2021).

Фосфорилирование белка по S6, S9, S15, S20, S37, S106 и T18 приводит к активации p53-зависимых механизмов за счет высвобождения p53 из белок-белкового взаимодействия с E3-убиквитинлигазой MDM2, которое при нормальных условиях обеспечивает сдерживание проапоптотических функций p53. Фосфорилирование по S15, S33, S37, S46, S215, S392 и T81 модулирует трансактивационные механизмы p53, запуская транскрипцию генов-мишеней (Liu et al., 2019; Wen, Wang, 2021), а S392 также способствует митохондриальной транслокации p53 и транскрипционно-независимой активации апоптоза (Liu et al., 2019).

Фосфорилирование по S315, S362 и S366, напротив, является меткой для убиквитинлигазы и способствует убиквитин-зависимой протеасомной деградации p53 (Wen, Wang, 2021). Более того, некоторые аминокислотные остатки p53 подвергаются фосфорилированию в отсутствие стресса и, в случае, например T55, способствуют протеасомной деградации p53, обеспечивая поддержание белка в низких концентрациях в клетке (Liu et al., 2019). Интересно, что фосфорилирование p53 по T81 также может приводить к димеризации p53 с p73 для активации транскрипции генов-мишеней (Liu et al., 2019; Horvat et al., 2021).

Дефосфорилирование играет важную роль в регуляции p53, так как его длительная активация в неповрежденных клетках не позволяет восстанавливать нормальное функционирование клетки. Процесс дефосфорилирования осуществляется серин/треониновыми фосфатазами PP1, PP2 и PPM (Liu et al., 2019).

Ацетилирование p53. Ацетилирование является важной посттрансляционной модификацией

для регуляции ДНК-связывающей и транскрипционной активности p53, а также ингибирует связывание p53 с его негативным регулятором MDM2. Так, уровни ацетилирования p53 значительно повышаются в ответ на клеточный стресс и коррелируют с активацией и стабилизацией p53 (Tang et al., 2008).

В ацетилировании p53 участвуют 6 ацетилтрансфераз, подразделенных на 2 группы: TIP60/MOF/MOZ и p300/CBP/PCAF, которые модифицируют лизины p53 преимущественно в ДНК-связывающем (K120, K164) и регуляторном (K370, K372, K373, K381, K382 и K386) доменах соответственно (Sykes et al., 2006; Tang et al., 2008; Reed, Quelle, 2014).

Нарушения ацетилирования каждого сайта по отдельности компенсируются модификациями других сайтов, в то время как ацетилирование во всех 8 основных сайтах полностью инактивирует способность p53 трансактивировать *CDKN1A* (p21) и останавливать клеточный рост (Tang et al., 2008).

Ацетилирование K120 происходит сразу после повреждения ДНК, приводя к накоплению ацетилированных форм в промоторах проапоптотических транскрипционных мишеней p53. Потеря способности к ацетилированию p53 по K120 блокирует его способность к индукции транскрипции проапоптотических *BAX* (BAX) и *BBC3* (PUMA) (Sykes et al., 2006). В свою очередь ацетилирование аминокислот в регуляторном С-концевом домене способствует открытой конформации p53 за счет ингибирования связывания и перекрывания ДНК-связывающего домена С-концом белка, тем самым усиливая трансактивационную способность p53 (Reed, Quelle, 2014).

Деацетилирование p53 приводит к подавлению транскрипционной активности p53. HDAC1 участвует в деацетилировании p53 по С-концевым K320, K373 и K382, а SIRT1 — по K382 (Reed, Quelle, 2014). Ацетилирование и деацетилирование позволяют осуществлять тонкую регуляцию p53 в зависимости от сложности, уровня и типа клеточного стресса, определяя p53-зависимый клеточный ответ (остановка клеточного цикла, апоптоз, старение и т.д.).

Метилирование p53. Метилирование является еще одной посттрансляционной модификацией, которая модулирует белок-белковые взаимодействия и клеточные сигнальные пути p53.

Метилирование p53 осуществляется семейством аргининметил-(PRMTs) и лизинметилтрансфераз (SMYD2, SET7/9) (Scoumanne, Chen, 2008; West, Gozani, 2011). Лизин (K) может быть моно-(Kme1), ди-(Kme2) или триметилирован (Kme3) по ϵ -аминогруппе (Wesche et al., 2017).

Метилирование аргинина оказывает влияние на специфичность связывания p53 с той или иной транскрипционной мишенью (Jansson et al., 2008). PRMT1 метилирует p53 в трансактивационном, а CARM1 — в C-концевом домене. Данные ацетилметилтрансферазы действуют как коактиваторы p53 и участвуют в метилировании гистонов H3 и H4, усиливая транскрипционную активность p53 (Scoumanne, Chen, 2008). С помощью масс-спектрометрии было установлено, что PRMT5 метилирует p53 по R333, R335 и R337 в ответ на обработку этопозидом, подавляя трансактивационные механизмы p53 (Jansson et al., 2008; Auclair, Richard, 2013; Yang et al., 2020). Дефицит PRMT5 усиливает связывание p53 с промоторами генов апоптоза и вызывает гибель клеток, в то время как гиперэкспрессия PRMT5 приводит к p21-опосредованной остановке клеточного цикла (Auclair, Richard, 2013).

Такие лизинметилтрансферазы как SMYD2 и SET7/9 осуществляют модификацию C-концевых лизинов p53 и усиливают или подавляют транскрипционную активность p53 в зависимости от сайта метилирования (Scoumanne, Chen, 2008; West et al., 2011; Rada et al., 2016). Интересно, что метилирование предшествует и способствует ацетилированию в соседних положениях (Ivanov et al., 2007). SET7/9 усиливает связывание p53 с промоторами, способствует активации транскрипции генов-мишеней и ингибирует SMYD2-опосредованное метилирование K372 (Lezina et al., 2015; Han et al., 2019). Считается, что метилирование лизинов p53 приводит к различным биологическим эффектам косвенно, действуя в комбинации с другими посттрансляционными модификациями (Han et al., 2019). Деметилирование лизинов p53 осуществляется специфической деметилазой KDM1 (LSD1) (Scoumanne, Chen, 2008). Она деметилирует p53, ингибируя взаимодействие p53 с его коактиватором 53BP1 и последующее индуцирование апоптоза (Nagpal, Yuan, 2021). Однако KDM1 не способен деметилировать монометилированный p53 по K370 или K372 (Scoumanne, Chen, 2008).

В настоящее время идентифицирована только одна аргининдеметилаза JMJD6 (Yang et al., 2020). Данная оксигеназа обладает двойной активностью, катализируя гидроксилирование лизина и деметилирование аргинина гистоновых и негистоновых пептидов (Auclair, Richard, 2013; Wesche et al., 2017). Известно, что JMJD6 осуществляет гидроксилирование p53 по K382, противодействуя p300/CBP-опосредованному ацетилированию (Wang et al., 2014; Yang et al., 2020).

Убиквитинилирование p53. Убиквитинилирование — одна из важнейших посттрансляционных модификаций в клетках эукариот, в ходе которой происходит ковалентное присоединение одного или нескольких остатков белка убиквитина к аминокислотным остаткам в составе белка-мишени. В этом процессе задействован ряд ферментов, среди которых E3-убиквитинлигаза обеспечивает селективное ковалентное присоединение убиквитина, предварительно активированного ферментами E1 (убиквитин-активирующий) и E2 (убиквитин-конъюгирующий), к мишени чаще всего по остаткам лизина. Сайт модификации, а также длина и форма полиубиквитиновой метки определяет судьбу мишени — помимо протеасомной деградация белка возможны также эндоцитоз, репарация ДНК и другие процессы (Grigoreva et al., 2024).

В случае p53 известен целый ряд узнающих его E3-убиквитинлигаз, относящихся к четырем основным типам в зависимости от строения домена, связывающего E2-убиквитин-конъюгирующий фермент: RING-домен (MDM2, PIRH2, CARPs, синовиолин, TRIMs, MKRNs, RNFs и TOPORS); HECT-домен (ARF-BP1); U-Box-домен (CHIP, UBE4B); F-Box-домен (JFK) (Желтухин, Чумаков, 2010; Дакс и др., 2013; Pan, Blattner, 2021).

Убиквитинлигаза E3 ARF-BP1 включает в свою структуру HECT-домен и может напрямую связывать и убиквитинилировать p53. Ядрышковый супрессор опухолей p14ARF, в свою очередь, может связывать как MDM2, так и ARF-BP1, ингибируя их убиквитинлигазную активность (Lee et al., 2012; Дакс и др., 2013). Важно отметить, что p14ARF может ингибировать только MDM2-опосредованное полиубиквитинилирование p53, но не моноубиквитинилирование (Chen et al., 2006).

CHIP и UBE4B являются примерами лигаз p53, имеющих U-box домен. CHIP высоко экспрессируется в поперечнополосатых мышцах взрослого человека и полиубиквитинилирует p53 как дикого, так и мутантного типа (Pan, Blattner, 2021). Отличительной чертой CHIP является его накопление в клетках позднего пассажа, в то время как количество других E3-убиквитинлигаз либо не изменяется, либо снижается с возрастом, что свидетельствует о роли CHIP в деградации p53 в старых или стареющих клетках (Pan, Blattner, 2021). UBE4B, в отличие от CHIP, обладает и E3-, и E4-убиквитинлигазной активностью, то есть способен донаращивать убиквитиновую цепь. UBE4B может напрямую взаимодействовать с MDM2, сокращая период полураспада p53, и осуществлять негативную регуляцию фосфорилированного p53 по S15 и S392 независимо от MDM2 внутри клеточного ядра (Antonioni et al., 2019). Функционируя как E4-убиквитинлигаза, UBE4B модулирует степень убиквитинилирования путем связывания с цепочкой убиквитина или олигоубиквитина, перенесенного на белок-субстрат другими E3-лигазами, дополнительно удлиняя и регулируя длину цепи (Baranes-Bachar et al., 2018).

Среди 68 известных F-Box-содержащих белков у человека JFK является единственным, содержащим KELCH-домен для обнаружения белкового субстрата и присоединения остатка убиквитина. JFK образует убиквитинлигазный комплекс SCF, включающий 4 белка Skp1-Cul1-F-box, который способствует убиквитинилированию и протеасомной деградации p53 (Lee et al., 2012). В составе комплекса JFK способен распознавать только фосфорилированный по ДНК-связывающему домену p53 (Pan, Blattner, 2012).

Ключевой E3-убиквитинлигазой p53 считается MDM2, которая открывает перечень лигаз, содержащих RING-домен. Ген *MDM2* является транскрипционной мишенью p53 и активируется при повышенном уровне p53, обеспечивая поддержание стабильного уровня p53 в клетке. MDM2 катализирует перенос активированного убиквитина с фермента группы E2 на p53, провоцируя деградацию p53 в 26S-протеасоме (Mittenberg et al., 2008). MDM2 полиубиквитинилирует p53 по нескольким C-концевым лизинам (Brooks, Gu, 2006; Желтухин, Чумаков, 2010). При этом молекулы убиквитина присоединяются изопептидной связью между C-кон-

цом убиквитина и ε-аминогруппой лизина p53 (Rodriguez et al., 2000). Кроме того, N-концевой домен MDM2 может связываться с N-концевым доменом p53, подавляя его трансаktивационные свойства и способствуя экспорту p53 из ядра в цитоплазму.

При связывании MDM2 с белком-активатором транскрипции p399/CBP происходит переключение способности MDM2 с моноубиквитинилирования на полиубиквитинилирование. Полиубиквитинилированные формы p53, обычно включающие 4 молекулы убиквитина, поступают в 26S протеасомы, где подвергаются разрушению, в то время как моноубиквитинилированные формы p53 поступают из цитоплазмы в митохондрии, где взаимодействуют с белками семейства BCL-2 (Marchenko et al., 2007). В отсутствие стресса низкие уровни MDM2 индуцируют только моноубиквитинилирование p53, которого недостаточно для его деградации p53 (Brooks, Gu, 2006).

Белок MDMX (MDM4) является структурным гомологом MDM2, однако у него отсутствует E3-лигазная активность, и он не вызывает деградацию p53 самостоятельно (Чумаков, 2007). Как и MDM2, он связывается с трансаktивационным доменом p53 и ингибирует его активность, образуя комплекс p53–MDM2–MDMX (Дакс и др., 2013). MDMX усиливает E3-убиквитинлигазную функцию MDM2, а также способствует его стабилизации путем ингибирования процесса самоубиквитинилирования (Klein et al., 2021).

COP1 также является критическим негативным регулятором p53, содержащим RING-домен и направляющим p53 на деградацию (Ka et al., 2018). В отсутствие внешних стимулов, MDM2 и COP1 усиливают полиубиквитинлигазную активность друг друга в отношении p53, поддерживая его на низком уровне (Maurine, 2012; Дакс и др., 2013).

PIRH2, кодируемый *ZNF363*, связывает и полиубиквитинилирует только тетрамерную форму p53, подавляя его трансаktивационные функции независимо от MDM2 (Leng et al., 2003; Sheng et al., 2008). Как и *MDM2*, *ZNF363* транскрипционно регулируется p53, образуя петлю обратной связи. PIRH2 связывается с центральным ДНК-связывающим доменом p53, но может ли он связывать p53 одновременно с MDM2, неизвестно (Leng et al., 2003).

CARP1 и CARP2 также убиквитинилируют p53 для последующей деградации. Подобно PIRH2, они способны модифицировать фосфорилированный активный p53 и тем самым снижать уровень p53 в клетке после восстановления повреждений ДНК (Дакс и др., 2013; Pan, Blattner, 2021). Кроме того, гиперэкспрессированные CARPs могут ингибировать процесс самоубиквитинирования MDM2, напрямую влияя на его количество в клетке (Pan, Blattner, 2021).

Мембранный белок эндоплазматического ретикулула синовиолин, имеющий в своей структуре RING-домен, связывает p53 в цитоплазме и убиквитинилирует его для последующей протеасомной деградации (Lee et al., 2012).

Семейство белков TRIM насчитывает более 80 членов, содержащих RING-домен и обладающих E3-убиквитинлигазной активностью. TRIMs убиквитинилируют p53, напрямую или связываясь с MDM2, и направляют его на протеасомную деградацию. Помимо этого, некоторые белки семейства (TRIM24, TRIM32) участвуют в петле обратной связи p53 (Liu et al., 2021; Pan, Blattner, 2021).

Белки семейства MKRN (MKRN1 и MKRN2) полиубиквитинилируют p53 (Pan et al., 2021). MKRN1 модифицирует p53 по K291 и K292 для последующей деградации в отсутствие стресса, однако в случае генотоксического стресса он убиквитинилирует p21, но не p53, приводя к p53-зависимой гибели поврежденных клеток (Lee et al., 2012).

Гиперэкспрессированная E3-убиквитинлигаза RNF38 семейства RNF может осуществлять транспорт p53 в отдельные очаги, связанные с ядерными тельцами мембранного белка PLM. В других случаях, RNF38 так же, как и остальные члены семейства (RNF1, RNF2, RNF126, RNF128 и т.д.), опосредует убиквитин-зависимую деградацию p53 (Sheren, Kassenbrock, 2013; Wang et al., 2022).

Еще одной E3-убиквитинлигазой p53 с RING-доменом является TOPORS. Интересно, но помимо своей роли ингибитора p53, в случае гиперэкспрессии данная лигаза способна сумоилировать p53, функционируя как белок с двойной ролью аналогично MDM2 (Sharif et al., 2010; Дакс и др., 2013).

E3-лигазы могут катализировать убиквитинилирование p53, не приводя к протеасомной деградации (Дакс и др., 2013). В этом случае опре-

деленное связывание p53 с убиквитином может приводить к ядерному экспорту, активации или ингибированию транскрипции генов-мишеней p53 (Pan, Blattner, 2021).

Помимо MDM2, чьи функции описаны выше, экспорту p53 из ядра в цитоплазму способствует лигаза WWP1, которая снижает трансактивационные способности p53, связываясь с ним напрямую и моноубиквитинилируя (Дакс и др., 2013; Kuang et al., 2021). В свою очередь MSL2 убиквитинилирует p53 по K351 и K357 независимо от MDM2, способствуя его цитоплазматической транслокации (Pan, Blattner, 2021).

CUL7 также негативно влияет на трансактивационные способности p53, моно- или диубиквитинилируя его (Pan, Blattner, 2021). Также было показано, что CUL7 участвует в олигомеризации p53 в цитоплазме, приводя к снижению эффективности транспорта олигомеризованного p53 в ядро (Дакс и др., 2013). UBC13 также осуществляет экспорт p53 из ядра в цитоплазму, стабилизируя p53 и уменьшая его трансактивационные способности. UBC13 моноубиквитинилирует p53 по K63 и тем самым ослабляет полиубиквитинилирование p53, индуцированное MDM2 (Laine et al., 2006). E4F1, в свою очередь, олигоубиквитинилирует p53 по остаткам K319–K321, отличным от тех, на которые нацелен MDM2, и индуцирует p53-зависимую транскрипционную активацию генов остановки клеточного роста (Amendolare et al., 2022).

Широкое разнообразие E3-убиквитинлигаз p53 позволяет осуществлять тонкую регуляцию его активности и деградации в зависимости от тканей, где экспрессируется белок, а также на разных стадиях развития млекопитающих (Lee et al., 2012). Гиперэкспрессия E3-убиквитинлигаз p53 наблюдается в половине опухолевых заболеваний и приводит к подавлению противоопухолевых функций p53, неконтролируемой пролиферации и онкогенезу (Lee et al., 2012; Grigoreva et al., 2017; Liebl, Hofmann, 2021), а ингибирование белок-белкового взаимодействия p53 с E3-лигазами и, в первую очередь, MDM2 для стабилизации и активации онкопротектора p53 является в настоящее время актуальной задачей (Grigoreva et al., 2017; Gureev et al., 2020).

Сумоилирование и неддильрование p53. Эти модификации осуществляются убиквитинподобными белками SUMO и NEDD8. Основным

отличием данных посттрансляционных модификаций от убиквитинилирования является то, что они не направляют белковую мишень на протеасомную деградацию, при этом SUMO и NEDD8 конкурируют с убиквитином за связывание с остатками лизина p53 (Laine et al., 2006; Bettermann et al., 2012; Pan, Blattner, 2021). Известно, что сумоилирование и неддилирование опосредуются такими лигазами, как MDM2, FBXO11, PIAS и TOPORS (Pan, Blattner, 2021).

Сумоилирование p53 по K386 осуществляется различными изоформами SUMO (SUMO1, SUMO2/3) и опосредуется членами семейства PIAS и TOPORS (Sharif et al., 2010; Guo, Gu, 2017; Xu et al., 2021). Неддилирование p53, в свою очередь, происходит с помощью MDM2 (K370, K372 и K373) и FBXO11 (K320 и K321). Считается, что сумоилирование и неддилирование приводят к ингибированию трансактивационных и, следовательно, онкосупрессорных способностей p53. Однако эффекты, вызываемые данными посттрансляционными модификациями p53, пока хорошо не изучены (Laine et al., 2006; Xu et al., 2021).

Интересно, что MDM2 способен как убиквитинилировать, так и неддилировать p53. При этом, механизм выбора индукции той или иной модификации на данный момент не исследован (Xu et al., 2021). Также неддилирование p53 осуществляется по тем же остаткам лизина, что и ацетилирование. Предполагается, что MDM2 и FBXO11 конкурируют с ацетилтрансферазами за модификацию p53 в этих участках (Laine et al., 2006).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная информация позволяет комплексно взглянуть на регуляцию p53 в отдельной взятой клетке. С одной стороны, необходимо признать чрезвычайно высокую сложность организации функционирования антионкогена. Это связано с большим количеством белков, влияющих на активность p53 путем различных посттрансляционных модификаций, определяющих конформацию, стабильность, локализацию и непосредственно трансактивационную активность белка. Такую многофакторность необходимо учитывать при разработке модуляторов активности p53. В настоящее время главный прикладной аспект

модулирования p53-опосредованных процессов состоит в попытках активации апоптоза опухолевых клеток путем предотвращения протеасомной деградации p53. Для этого ведутся разработки ингибиторов взаимодействия белка с его доминирующей E3-убиквитинлигазой MDM2 (Zhu et al., 2022). Однако несмотря на многолетние исследования ни один кандидат не смог пока успешно пройти клинические испытания. Возможно, это связано именно с недооценкой других взаимодействий и модификаций, характерных для p53.

С другой стороны, получение все новых сведений о модификаторах p53 и задействованных в модификациях белках позволяет расширить арсенал исследователей как в области изучения клеточных процессов, так и в разработке биологически активных молекул, влияющих на p53-опосредованные клеточные механизмы. Современное динамичное развитие бифункциональных низкомолекулярных соединений, провоцирующих взаимодействие какой-либо мишени с определенным ферментом, открывает практически неограниченные возможности не только для принудительного убиквитинилирования, но и для фосфорилирования, ацетилирования и других модификаций при условии грамотного выбора объектов исследования. Успешное прохождение различных стадий клинических испытаний рядом PROTAC (proteolysis targeting chimera), провоцирующих убиквитинилирование клинически значимых мишеней, подтверждает перспективность такого подхода (Li et al., 2022; Grigoreva et al., 2024).

Белок p53 представляет собой важный компонент клеточной регуляции и обеспечения альтруистического поведения клеток многоклеточных организмов, включая человека. Вариативность посттрансляционных модификаций p53 обеспечивает тонкую настройку и быстрый отклик на меняющиеся условия. В свою очередь, исследование механизмов регуляции p53 позволяет не только углубить понимание фундаментальных механизмов клеточных процессов, но и предложить новые прикладные подходы к точечному вмешательству в эти процессы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-13-00344.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Асатурова А.В. 2015. Изоформы белка p53: роль в норме и патологии, особенности выявления и клиническое значение. Успехи современного естествознания. № 3. С. 9. (Asaturova A.V. 2015. Isoforms of p53 protein: role in norm and pathology, features of detection and clinical significance. Successes of Modern Natural Science. No. 3. P. 3.)
- Дакс А.А., Мелино Д., Барлев Н.А. 2013. Роль различных E3-убиквитинлигаз в регуляции активности онкосупрессора p53. Цитология. Т. 55. № 10. С. 673. (Daks A.A., Melino D., Barlev N.A. 2013. The role of different E3 ubiquitin ligases in regulation of the p53 tumor suppressor protein. Tsitologiya. V. 55. P. 673.)
- Желтухин А.О., Чумаков П.М. 2010. Повседневные и индуцируемые функции гена p53. Успехи биол. химии. Т. 50. № 1. С. 447. (Zheltuhin A.O., Chumakov P.M. 2010. Constitutive and induced functions of the p53 gene. Biochemistry (Moscow). V. 75. P. 1692. <https://doi.org/10.1134/s0006297910130110>)
- Чумаков П.М. 2007. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биологической химии. Т. 47. № 1. С. 3. (Chumakov P.M. 2007. P53 protein and its universal functions in the multicellular organism. Adv. Biol. Chem. V. 47. P. 3.)
- Шувалов О.Ю., Федорова О.А., Петухов А.В., Дакс А.А., Васильева Е.А., Григорьева Т.А., Иванов Г.С., Барлев Н.А. 2015. Негативные регуляторы онкосупрессора p53 в контексте направленной противоопухолевой терапии. Цитология. Т. 57. № 12. С. 847. (Shuvalov O. Yu., Fedorova O.A., Petukhov A.V., Daks A.A., Vasilieva E.A., Grigorieva T.A., Ivanov G.S., Barlev N.A. 2015. Negative regulators of tumor suppressor p53 in the context of anticancer therapy. Tsitologiya. V. 57. P. 847.)
- Amendolare A., Marzano F., Petruzzella V., Vacca R.A., Guerrini L., Pesole G., Sbisà E., Tullo A.T. 2022. The underestimated role of the p53 pathway in renal cancer. Cancers. V. 14. Art. ID 5733. <https://doi.org/10.3390/cancers14235733>
- Antoniou N., Lagopati N., Balourdas D.I., Nikolaou M., Papalampros A., Vasileiou P.V.S., Myrianthopoulos V., Kotsinas A., Shiloh Y., Lontos M., Gorgoulis V.G. 2019. The role of E3, E4 ubiquitin ligase (UBE4B) in human pathologies. Cancers. V. 12. P. 62. <https://doi.org/10.3390/cancers12010062>
- Auclair Y., Richard S. 2013. The role of arginine methylation in the DNA damage response. DNA Repair (Amst). V. 12. P. 459. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.006>
- Bai L., Zhu W.G. 2006. P53: structure, function and therapeutic applications. J. Cancer Mol. V. 2. P. 141.
- Baranes-Bachar K., Levy-Barda A., Oehler J., Reid D.A., Soria-Bretones I., Voss T.C., Chung D., Park Y., Liu C., Yoon J.B., Li W., Dellaire G., Misteli T., Huertas P., Rothenberg E. et al. 2018. The ubiquitin E3/E4 ligase UBE4A adjusts protein ubiquitylation and accumulation at sites of DNA damage, facilitating double-strand break repair. Mol. Cell. V. 69. P. 866. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.002>
- Bettermann K., Benesch M., Weis S., Haybaeck J. 2012. SUMOylation in carcinogenesis. Cancer Lett. V. 316. P. 113. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.10.036>
- Brooks C.L., Gu W. 2006. P53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. Mol. Cell. V. 21. P. 307. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.020>
- Bulatov E., Sayarova R., Mingaleeva R., Miftakhova R., Gomzikova M., Ignatyev Y., Petukhov A., Davidovich P., Rizvanov A., Barlev N.A. 2018. Isatin-Schiff base-copper (II) complex induces cell death in p53-positive tumors. Cell Death Discov. V. 4. P. 103. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0120-z>
- Capuozzo M., Santorsola M., Bocchetti M., Perri F., Cascella M., Granata V., Celotto V., Gualillo O., Cossu A.M., Nasti G., Caraglia M., Ottaiano A. 2022. P53: from fundamental biology to clinical applications in cancer. Biology (Basel). V. 11. Art. ID 1325. <https://doi.org/10.3390/biology11091325>
- Chen D., Brooks C.L., Gu W. 2006. ARF-BP1 as a potential therapeutic target. Br. J. Cancer. V. 94. P. 1555. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603119>
- Chillemi G., Davidovich P., D'Abramo M., Mametnabiev T., Garabadzhiu A.V., Desideri A., Melino G. 2013. Molecular dynamics of the full-length p53 monomer. Cell Cycle. V. 12. P. 3098. <https://doi.org/10.4161/cc.26162>
- Duffy M.J., Synnott N.C., O'Grady S., Crown J. 2022. Targeting p53 for the treatment of cancer. Semin. Cancer Biol. V. 79. P. 58. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.07.005>
- Fedorova O., Daks A., Petrova V., Petukhov A., Lezina L., Shuvalov O., Davidovich P., Kriger D., Lomert E., Tentler D., Kartsev V., Uyanik B., Tribulovich V., Demidov O., Melino G. et al. 2018. Novel isatin-derived

- molecules activate p53 via interference with Mdm2 to promote apoptosis. *Cell Cycle*. V. 17. P. 1917.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1506664>
- Fedorova O., Petukhov A., Daks A., Shuvalov O., Leonova T., Vasileva E., Aksenov N., Melino G., Barlev N.A.* 2019. Orphan receptor NR4A3 is a novel target of p53 that contributes to apoptosis. *Oncogene*. V. 38. P. 2108.
<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0566-8>
- Fischer N.W., Prodeus A., Malkin D., Gariépy J.* 2016. P53 oligomerization status modulates cell fate decisions between growth, arrest and apoptosis. *Cell Cycle*. V. 15. P. 3210.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1241917>
- Gaglia G., Guan Y., Shah J.V., Lahav G.* 2013. Activation and control of p53 tetramerization in individual living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 110. P. 15497.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1311126110>
- Gencel-Augusto J., Lozano G.* 2020. P53 tetramerization: at the center of the dominant-negative effect of mutant p53. *Genes Dev*. V. 34. P. 1128.
<https://doi.org/10.1101/gad.340976.120>
- Grigoreva T.A., Novikova D.S., Melino G., Barlev N.A., Tribulovich V.G.* 2024. Ubiquitin recruiting chimera: more than just a PROTAC. *Biology Direct*. V. 19. P. 55.
<https://doi.org/10.1186/s13062-024-00497-8>
- Grigoreva T.A., Novikova D.S., Petukhov A.V., Gureev M.A., Garabadzhiu A.V., Melino G., Barlev N.A., Tribulovich V.G.* 2017. Proapoptotic modification of substituted isoindolinones as MDM2-p53 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. V. 27. P. 5197.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.049>
- Grigoreva T., Romanova A., Sagaidak A., Vorona S., Novikova D., Tribulovich V.* 2020. Mdm2 inhibitors as a platform for the design of P-glycoprotein inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. V. 30. Art. ID 127424.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127424>
- Guo T., Gu C.* 2017. New insights into regulation of p53 protein degradation. *Int. J. Clin. Exp. Med*. V. 10. Art. ID 8773
- Gureev M., Novikova D., Grigoreva T., Vorona S., Garabadzhiu A., Tribulovich V.* 2020. Simulation of MDM2 N-terminal domain conformational lability in the presence of imidazoline based inhibitors of MDM2-p53 protein-protein interaction. *J. Comput. Aided. Mol. Des*. V. 34. P. 55.
<https://doi.org/10.1007/s10822-019-00260-6>
- Han D., Huang M., Wang T., Li Z., Chen Y., Liu C., Lei Z., Chu X.* 2019. Lysine methylation of transcription factors in cancer. *Cell Death Dis*. V. 10. P. 290.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1524-2>
- Horikawa I., Park K.Y., Isogaya K., Hiyoshi Y., Li H., Anami K., Robles A.I., Mondal A.M., Fujita K., Serrano M., Harris C.C.* 2017. $\Delta 133$ p53 represses p53-inducible senescence genes and enhances the generation of human induced pluripotent stem cells. *Cell Death Diff*. V. 24. P. 1017.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2017.48>
- Horvat A., Tadijan A., Vlašić I., Slade N.* 2021. P53/p73 protein network in colorectal cancer and other human malignancies. *Cancers*. V. 13. Art. ID 2885.
<https://doi.org/10.3390/cancers13122885>
- Hernandez Borrero L.J., El-Deiry W.S.* 2021. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer*. V. 1876. Art. ID 188556.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556>
- Ivanov G.S., Ivanova T., Kurash J., Ivanov A., Chuikov S., Gizatullin F., Herrera-Medina E.M., Rauscher F. 3rd, Reinberg D., Barlev N.A.* 2007. Methylation-acetylation interplay activates p53 in response to DNA damage. *Mol. Cell Biology*. V. 27. P. 6756.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00460-07>
- Jansson M., Durant S.T., Cho E.C., Sheahan S., Edelmann M., Kessler B., La Thangue N.B.* 2008. Arginine methylation regulates the p53 response. *Nat. Cell Biol*. V. 10. P. 1431.
<https://doi.org/10.1038/ncb1802>
- Joerger A.C., Fersht A.R.* 2010. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. V. 2. Art. ID a000919.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000919>
- Ka W.H., Cho S.K., Chun B.N., Byun S.Y., Ahn J.C.* 2018. The ubiquitin ligase COP1 regulates cell cycle and apoptosis by affecting p53 function in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer*. V. 25. P. 529.
<https://doi.org/10.1007/s12282-018-0849-5>
- Kamada R., Toguchi Y., Nomura T., Imagawa T., Sakaguchi K.* 2016. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. *Peptide Science*. V. 106. P. 598.
<https://doi.org/10.1002/bip.22772>
- Kim S., An S.* 2016. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)*. V. 95. Art. ID e3993.
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003993>
- Klein A.M., de Queiroz R.M., Venkatesh D., Prives C.* 2021. The roles and regulation of MDM2 and MDMX: it is not just about p53. *Genes Dev*. V. 35. P. 575.
<https://doi.org/10.1101/gad.347872.120>
- Krasavin M., Gureev M., Dar'in D., Bakulina O., Chizhova M., Lepikhina A., Novikova D., Grigoreva T., Ivanov G., Zhumagalieva A., Garabadzhiu A.V., Tribulovich V.* 2018. Design; in silico prioritization and biological profiling of apoptosis-inducing lactams amenable by the Castagnoli-Cushman reaction. *Bioorg. Med. Chem*. V. 26. P. 2651.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.04.036>
- Kuang L., Jiang Y., Li C., Jiang Y.* 2021. WW domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 1: a self-disciplined oncoprotein. *Front. Cell Dev. Biol*. V. 9. Art. ID 757493.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.757493>
- Laine A., Topisirovic I., Zhai D., Reed J.C., Borden K.L., Ronai Z.* 2006. Regulation of p53 localization and activity by Ubc13. *Mol. Cell Biol*. V. 26. P. 8901.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01156-06>

- Lang V., Pallara C., Zabala A., Lobato-Gil S., Lopitz-Otsoa F., Farrás R., Hjerpe R., Torres-Ramos M., Zabaleta L., Blattner C., Hay R.T., Barrio R., Carracedo A., Fernandez-Recio J., Rodríguez M.S. et al. 2014. Tetramerization-defects of p53 result in aberrant ubiquitylation and transcriptional activity. *Mol. Oncol.* V. 8. P. 1026.
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.04.002>
- Lee S.W., Seong M.W., Jeon Y. J., Chung C.H. 2012. Ubiquitin E3 ligases controlling p53 stability. *Animal Cells Syst.* V. 16. P. 173.
<https://doi.org/10.1080/19768354.2012.688769>
- Leng R.P., Lin Y., Ma W., Wu H., Lemmers B., Chung S., Parant J.M., Lozano G., Hakem R., Benchimol S. 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell.* V. 112. P. 779.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00193-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00193-4)
- Lezina L., Aksenova V., Fedorova O., Malikova D., Shuvalov O., Antonov A.V., Tentler D., Garabadgiu A.V., Melino G., Barlev N.A. 2015. KMT Set7/9 affects genotoxic stress response via the Mdm2 axis. *Oncotarget.* V. 6. Art. ID 25843.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4584>
- Li X., Pu W., Zheng Q., Ai M., Chen S., Peng Y. 2022. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy. *Mol. Cancer.* V. 21. P. 99.
<https://doi.org/10.1186/s12943-021-01434-3>
- Liebl M.C., Hofmann T.G. 2021. The role of p53 signaling in colorectal cancer. *Cancers (Basel).* V. 13. Art. ID 2125.
<https://doi.org/10.3390/cancers13092125>
- Liu J., Zhang C., Wang X., Hu W., Feng Z. 2021. Tumor suppressor p53 cross-talks with TRIM family proteins. *Genes Dis.* V. 8. P. 463.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.07.003>
- Liu Y., Tavana O., Gu W. 2019. P53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. *J. Mol. Cell Biol.* V. 11. P. 564.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz060>
- Lubin D.J., Butler J.S., Loh S.N. 2010. Folding of tetrameric p53: oligomerization and tumorigenic mutations induce misfolding and loss of function. *J. Mol. Biol.* V. 395. P. 705.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.013>
- Marine J.C. 2012. Spotlight on the role of COP1 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer.* V. 7. P. 455.
<https://doi.org/10.1038/nrc3271>
- Mehta S., Campbell H., Drummond C.J., Li K., Murray K., Slatter T., Bourdon J.C., Braithwaite A.W. 2021. Adaptive homeostasis and the p53 isoform network. *EMBO Reports.* V. 22. Art. ID e53085.
<https://doi.org/10.15252/embr.202153085>
- Mittenberg A.G., Moiseeva T.N., Barlev N.A. 2018 Role of proteasomes in transcription and their regulation by covalent modifications. *Front. Biosci.* V. 13. P. 7184.
<https://doi.org/10.2741/3220>
- Moll U.M., Wolff S., Speidel D., Deppert W. 2005. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr. Opin. Cell Biol.* V. 17. P. 631.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.007>
- Nagpal I., Yuan Z. 2021. The basally expressed p53-mediated homeostatic function. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 9. Art. ID 775312.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.775312>
- Osterburg C., Dötsch V. 2022. Structural diversity of p63 and p73 isoforms. *Cell Death Differ.* V. 29. P. 921.
<https://doi.org/10.1038/s41418-022-00975-4>
- Pan M., Blattner C. 2021. Regulation of p53 by E3s. *Cancers.* V. 13. Art. ID 745.
<https://doi.org/10.3390/cancers13040745>
- Rada M., Vasileva E., Lezina L., Marouco D., Antonov A.V., Macip S., Melino G., Barlev N.A. 2016. Human EHMT2/G9a activates p53 through methylation-independent mechanism. *Oncogene.* V. 36. P. 922.
<https://doi.org/10.1038/onc.2016.258>
- Reed S.M., Quelle D.E. 2014. P53 acetylation: regulation and consequences. *Cancers.* V. 7. Art. ID 30.
<https://doi.org/10.3390/cancers7010030>
- Rodríguez M.S., Desterro J.M., Lain S., Lane D.P., Hay R.T. 2000. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell Biol.* V. 20. P. 8458.
<https://doi.org/10.1128/MCB.20.22.8458-8467.2000>
- Scoumanne A., Chen X. 2008. Protein methylation: a new regulator of the p53 tumor suppressor. *Histol. Histo-pathol.* V. 23. Art. ID 1143.
<https://doi.org/10.14670/hh-23.1143>
- Sharif J., Tsuboi A., Koseki H. 2010. TOPORS (topoisomerase I binding, arginine/serine-rich). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* V. 14. P. 263.
- Sheng Y., Laister R.C., Lemak A., Wu B., Tai E., Duan S., Lukin J., Sunnerhagen M., Srisailam S., Karra M., Benchimol S., Arrowsmith C.H. 2008. Molecular basis of Pirh2-mediated p53 ubiquitylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* V. 15. P. 1334.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1521>
- Sheren J.E., Kassenbrock C.K. 2013. RNF38 encodes a nuclear ubiquitin protein ligase that modifies p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 440. P. 473.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.031>
- Steffens Reinhardt L., Zhang X., Groen K., Morten B.C., De Iuliis G.N., Braithwaite A.W., Bourdon J.C., Avery-Kiejda K.A. 2022. Alterations in the p53 isoform ratio govern breast cancer cell fate in response to DNA damage. *Cell Death Dis.* V. 13. P. 907.
<https://doi.org/10.1038/s41419-022-05349-9>
- Sykes S.M., Mellert H.S., Holbert M.A., Li K., Marmorstein R., Lane W.S., McMahon S.B. 2006. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol. Cell.* V. 24. P. 841.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.026>
- Synoradzki K.J., Bartnik E., Czarnecka A.M., Fiedorowicz M., Firlej W., Brodziak A., Stasinska A., Rutkowski P., Griep P. 2021. TP53 in biology and treatment of osteosarcoma. *Cancers (Basel).* V. 13. P. 4284.
<https://doi.org/10.3390/cancers13174284>

- Tang Y., Zhao W., Chen Y., Zhao Y., Gu W. 2008. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*. V. 133. P. 612.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.025>
- Vieler M., Sanyal S. 2018. P53 isoforms and their implications in cancer. *Cancers (Basel)*. V. 10. Art. ID 288.
<https://doi.org/10.3390/cancers10090288>
- Vlasic I., Horvat A., Tadijan A., Slade N. 2022. P53 family in resistance to targeted therapy of melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. Art. ID 65.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010065>
- Wang F., He L., Huangyang P., Liang J., Si W., Yan R., Han X., Liu S., Gui B., Li W., Miao D., Jing C., Liu Z., Pei F., Sun L. et al. 2014. JMJD6 promotes colon carcinogenesis through negative regulation of p53 by hydroxylation. *PLoS Biol.* V. 12. Art. ID e1001819.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001819>
- Wang H., Guo M., Wei H., Chen Y. 2023. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* V. 8. P. 92.
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01347-1>
- Wang Y., Zhang Ch., Wang J., Liu J. 2022. P53 regulation by ubiquitin and ubiquitin-like modifications. *Gen. Instab. Dis.* V. 3. P. 179.
<https://doi.org/10.1007/s42764-022-00067-0>
- Wen J., Wang D. 2021. Deciphering the PTM codes of the tumor suppressor p53. *J. Mol. Cell Biol.* V. 13. P. 774.
- Wesche J., Kühn S., Kessler B.M., Salton M., Wolf A. 2017. Protein arginine methylation: a prominent modification and its demethylation. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 74. P. 3305.
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2515-z>
- West L.E., Gozani O. 2011. Regulation of p53 function by lysine methylation. *Epigenomics*. V. 3. P. 361.
<https://doi.org/10.2217/EPI.11.21>
- Xu Z., Wu W., Yan H., Hu Y., He Q., Luo P. 2021. Regulation of p53 stability as a therapeutic strategy for cancer. *Biochem. Pharmacol.* V. 185. Art. ID 114407.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114407>
- Yakovlev V.A., Bayden A.S., Graves P.R., Kellogg G.E., Mikkelsen R.B. 2010. Nitration of the tumor suppressor protein p53 at tyrosine 327 promotes p53 oligomerization and activation. *Biochemistry*. V. 49. P. 5331.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114407>
- Yang J., Chen S., Yang Y., Ma X., Shao B., Yang S., Wei Y., Wei X. 2020. Jumonji domain-containing protein 6 protein and its role in cancer. *Cell Prol.* V. 53. Art. ID e12747.
<https://doi.org/10.1111/cpr.12747>
- Zhao L., Sanyal S. 2022. P53 isoforms as cancer biomarkers and therapeutic targets. *Cancers (Basel)*. V. 14. Art. ID 3145.
<https://doi.org/10.3390/cancers14133145>
- Zhu H., Gao H., Ji Y., Zhou Q., Du Z., Tian L., Jiang Y., Yao K., Zhou Z. 2022. Targeting p53-MDM2 interaction by small-molecule inhibitors: learning from MDM2 inhibitors in clinical trials. *Oncol.* V. 15. P. 91.
<https://doi.org/10.1186/s13045-022-01314-3>

POST-TRANSLATIONAL REGULATION OF THE p53 TUMOR SUPPRESSOR ACTIVITY

A. Romanova^{a,*}, T. A. Grigoreva^a, V. G. Tribulovich^a

^a Research Laboratory "Molecular Pharmacology", Saint-Petersburg State Institute of Technology,
Saint-Petersburg, 190013, Russia

* E-mail: angeliina.romanova@outlook.com

P53, encoded by the *TP53* gene, has attracted researchers' interest for several decades as a key human tumor suppressor protein. P53-mediated tumor suppression is achieved through transactivation of its target genes, or as a consequence of direct binding of p53 to protein targets that are involved in the regulation of various cellular processes. The review briefly discusses mechanisms involved in the regulation of p53 activity at the protein level — from oligomerization required for the implementation of p53 transactivation mechanisms to ubiquitin-dependent proteolysis that maintains a low level of this proapoptotic protein in normal cells. The main enzymes involved in various post-translational modifications and the effects they can lead to are noted. Rational intervention in these pathways at one stage or another can be relevant both for research purposes and in the applied aspect, particularly for the anti-cancer drug development.

Keywords: p53, post-translational modifications (PTM), E3-ubiquitin ligases

УДК 576.08:577.21:617.7-007

ДИЗАЙН И ПОДБОР ГИДОВ ДЛЯ CRISPR/CAS9-ОПОСРЕДОВАННОГО НОКАУТА ГЕНА *Kcnn2* В МЫШИНЫХ КЛЕТКАХ

© 2024 Е. Н. Антонова^{1,*}, А. Б. Сорока¹, О. Н. Митяева^{1–3}, П. Ю. Волчков^{1–3}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Московская область, Долгопрудный, 141701, Россия

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

³Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва, 125315, Россия

*E-mail: antonova.en@genlab.llc

Поступила в редакцию 23.09.2024

После доработки 17.10.2024

Принята к публикации 25.09.2024

Мутации в гене *KCNV2* человека вызывают редкое наследственное заболевание сетчатки — дистрофию колбочек с повышенной активностью палочек (CDSRR), которая характеризуется прогрессирующей потерей зрения и нарушением цветоразличения. Ген *KCNV2* кодирует субъединицу калиевого канала Kv8.2, играющую важную роль в нормальной работе фоторецепторов сетчатки. Поскольку в настоящее время этиотропной терапии для CDSRR не существует, генотерапия представляется перспективным методом лечения. Для проверки эффективности генотерапевтических подходов необходимо создание адекватной экспериментальной модели — нокаутной мышинной линии по гену *Kcnn2*. В нашем исследовании мы сосредоточились на подборе оптимальных гидовых РНК для нокаута данного гена с использованием системы CRISPR/Cas9 и их проверке на мышинной клеточной линии. Результаты экспериментов показали успешное создание одной маленькой 40 нуклеотидов (нт) и нескольких больших делеций (1100–1400 нт) в гене *Kcnn2*. Эти данные подтверждают эффективность выбранных гидов и создают основу для разработки нокаутной мышинной модели, которая позволит изучать патофизиологию заболевания и провести тестирование потенциальных терапевтических методов.

Ключевые слова: гены *Kcnn2*, *KCNV2*, гидовая РНК, делеция, Cas9

Принятые сокращения: нт — нуклеотид; ПЦР — полимеразная цепная реакция; AAV — аденоассоциированный вирус (adeno-associated virus); CDSRR — дистрофия колбочек с повышенной активностью палочек (cone dystrophy with supernormal rod response); MM — mismatches (несоответствия); PAM — мотив, смежный с протоспейсером (protospacer adjacent motif); CRISPR/Cas9 — clustered regularly interspaced short palindromic repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9 (CRISPR associated protein 9); gRNA — гидовая РНК или гид.

DOI: 10.31857/S0041377124050036, EDN: DUVXRC

В настоящее время установлено, что мутации в гене *KCNV2* у человека являются причиной редкого наследственного заболевания — колбочковой дистрофии со сверхнормальной активностью палочек (cone dystrophy with supernormal rod response, CDSRR; OMIM 610356; Wu et al., 2006). CDSRR — это редкое моногенное заболевание, частота встречаемости которого составляет примерно 1 на 800 000 случаев, которое характеризуется нарушением функции фоторецепторов сетчатки, что приводит

к прогрессирующему снижению остроты зрения, особенно при низкой освещенности, а также к ухудшению цветоразличения (Wu et al., 2006; Wissinger et al., 2008). Ген *KCNV2* кодирует одну из субъединиц потенциал-зависимого калиевого канала Kv8.2, который совместно с другими субъединицами участвует в поддержании электрофизиологического баланса в клетках сетчатки (Hunt et al., 2018).

По данным Human Protein Atlas, ген человека *KCNV2* преимущественно экспрессируется

в фоторецепторах сетчатки, что делает его ключевым элементом для поддержания нормальной функции зрения (Czirjak et al., 2007; Aslanidis et al., 2014). Мутации в этом гене нарушают работу калиевых каналов, что приводит к аномальной реакции на свет и нарушению передачи нервных сигналов в зрительном пути (Wissinger et al., 2008). В этом случае это особенно критично для колбочек, у которых наблюдается сниженный ответ на свет при повышенной светочувствительности палочек — одна из характерных особенностей дистрофии CDSRR (Michaelides et al., 2005, 2006; Vincent et al., 2013). Эти нарушения способствуют развитию патологических процессов, ведущих к прогрессирующей потере зрения (Gill et al., 2019).

Этиотропной терапии для CDSRR в настоящее время не существует. Генотерапия представляет собой перспективный подход к лечению генетически обусловленных заболеваний, направленный на доставку здоровой копии гена в клетки-мишени для замены дефектного гена или коррекции его функций. В случае с *KCNV2* генотерапия нацелена на восстановление нормального функционирования калиевых каналов, что может предотвратить дальнейшее прогрессирование заболевания и улучшить состояние фоторецепторов сетчатки (Carvalho et al., 2023).

Существует несколько подходов к генотерапии, включая использование вирусных векторов для доставки гена и редактирование генома с использованием таких технологий, как CRISPR/Cas9 (Uddin et al., 2020). Вирусные векторы, такие как аденоассоциированные вирусы (AAV), активно исследуются для доставки терапевтических генов в сетчатку (Ail et al., 2023). В частности, генотерапия на основе AAV для лечения мутаций в гене *RPE65*, вызывающих амавроз Лебера, была одобрена службой FDA в США (Food and Drug Administration) и показала значительное улучшение зрения у пациентов (Maguire et al., 2021). Эти успехи демонстрируют потенциал генотерапии как метода лечения генетических заболеваний сетчатки, включая CDSRR.

Для оценки эффективности генотерапии в лечении мутаций *KCNV2* важно создание адекватной экспериментальной модели заболевания. Основные модели для доклинических исследований генотерапии сетчатки включают

ретиальные органоиды, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (Andreazzoli et al., 2021), и нокаутные мышинные модели (Shahi et al., 2022; Da Silva-Buttkus et al., 2023). Обе модели имеют свои преимущества и ограничения, однако мышинные модели предпочтительны для оценки физиологической функции фоторецепторов с помощью электроретинографии (Barnard et al., 2012).

Нокаутные модели особенно ценны тем, что позволяют воспроизвести мутации, нарушающие работу гена, и исследовать их влияние на ткани и системы организма в физиологических условиях. В случае с CDSRR они позволяют изучить, как мутации в *KCNV2*, нарушающие функцию белка, влияют на фоторецепторы и оценить терапевтические возможности генотерапии. Например, введение терапевтического гена в сетчатку нокаутных мышей позволяет оценить эффективность генотерапии в восстановлении функции фоторецепторов и предотвращении патологических изменений в сетчатке (Barnard et al., 2012).

Для разработки эффективной генотерапии необходимо предварительно создать адекватные экспериментальные модели, такие как нокаутные мышинные линии, имитирующие патологии человека. Для создания нокаутной модели целевой ген можно «выключить» с помощью внесения индела (вставки или делеции), что приводит к изменению аминокислотной последовательности и появлению преждевременного стоп-кодона (Chirinskaite et al., 2023). Более эффективным является метод удаления гена целиком или значительной его части путем внесения пар двухцепочечных разрывов (Chen et al., 2014). В обоих случаях используется система CRISPR/Cas9 — передовая система для редактирования генов, позволяющая вносить точечные разрезы в ДНК с высокой точностью (Wiles et al., 2015). Есть исследование, где группа ученых создала линию *Kcnv2*^{-/-}, удалив 1-й экзон гена *Kcnv2* домашней мыши (*Mus. musculus*) с использованием системы loxP-Cre (Hart et al., 2019). Однако детали получения флоксированного экзона не описаны, поскольку они были разработаны по заказу другой исследовательской группой (Skarnes et al., 2011). Это ограничивает возможность воспроизведения их исследования, что может затруднить дальнейшие работы в данной области.

В представленной работе мы разработали и протестировали гидовые РНК и выбрали наиболее эффективные пары для разрезов в гене *Kcnv2*. Эти гиды могут быть использованы для создания нокаутных мышинных линий, что открывает новые возможности для изучения патофизиологии заболевания и тестирования генотерапевтических подходов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Дизайн гидов. Для дизайна гидов (gRNA) использовали инструменты ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no>) и CRISPOR (<http://crispor.gi.ucsc.edu/>), которые определяют оптимальные участки в кодирующей последовательности гена на основе наличия РАМ. Оценку проводили по эффективности разреза и риску нецелевых эффектов. ChopChop учитывает такие параметры, как GC-состав (40–70%) и самокомплементарность, а CRISPOR анализирует возможные нецелевые разрезы (офф-таргеты), отображая количество несовпадений (mismatches, ММ) и их расположение в seed region, что критически важно для точности разреза. Для минимизации нежелательных разрезов учитывали гиды с не менее 3–4 несовпадениями или, как минимум, с 2 несовпадениями в seed region. ChopChop также предоставляет визуализацию с оценкой сайтов-мишеней по цветам: зеленый (лучший), желтый (средний) и красный (плохой). Были выбраны гиды с наилучшими параметрами по точности и с минимальным риском офф-таргетов (табл. 1).

Структурный анализ гидовой РНК (gRNA). Для структурного анализа использовали RNAfold Web Server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) (Zuker et al., 1981).

Дизайн праймеров. Для подбора праймеров использовали программу Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Были выбраны праймеры с содержанием гуанина и цитозина от 40 до 60% и температурой отжига в диапазоне 57–63 °С. Кроме того, учитывали само- и гетерокомплементарность. Специфичность праймеров проверяли с помощью Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP_TARGET=on).

Дизайн генетических конструкций и виртуальное клонирование проводили с помощью

инструмента SnapGene (<https://www.snapgene.com/>).

Клонирование. Каждый из гидов был вставлен методом клонирования в плазмиду (Plasmid #52961; Addgene, США) с геном Cas9 и геном устойчивости к пурамицину (см.: Дополнительные материалы (ДМ), рис. ДМ1а). Для синтеза вставки использовали 25-олигонуклеотидные последовательности (табл. ДМ1), частично комплементарные друг другу. В процессе амплификации они соединялись, образуя свободные концы (рис. ДМ1а). Плазида была порезана по сайтам рестрикции BsmBI (рис. ДМ1б, в). Большой фрагмент плазмиды (вектор) был лигирован с гидовыми вставками через липкие концы, после чего полученные конструкции трансформировали в компетентные клетки *Escherichia coli*, штамм XL-Blue. Положительные клоны отбирали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с колоний, после чего проверяли на наличие вставок гидов и отправляли на секвенирование для подтверждения.

Отжиг олигонуклеотидов для гидовой РНК. Для отжига олигонуклеотидов (Olig) использовали смесь, включающую Q5 2-кратный MasterMix Buffer (NEB), прямой и обратный олигонуклеотиды, представленные в табл. ДМ1. ПЦР проводили с программой, включающей стандартные этапы денатурации, отжига и удлинения, при этом отжиг выполняли при 60 °С с декрементом 0.5 °С каждые 30 с.

Плазмиды выделяли из ночной культуры *E. coli* с помощью Plasmid extraction-MiniPrep/MidiPrep (“Евроген”, Россия) (<https://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC221S.pdf>/<https://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC224.pdf>).

Рестрикция. Использовали рестриктазу BsmBI (NEB). Это рестриктаза, узнающая ассиметричную последовательность CGTCTC и делающая разрез в нескольких нуклеотидах от нее. Рестрикцию осуществляли в 10-кратном буфере 3.1 (NEB) при 55 °С в течение 4 ч.

Гель-электрофорез. Для разделения линейных двухцепочечных молекул ДНК, полученных в результате рестрикции, а также в случае скрининга ПЦР с колоний и детекции больших делеций, использовали гель с концентрацией агарозы 1.5% в буфере TAE. В случае детекции маленькой делеции использовали 3%-ный гель. В качестве маркера длин ДНК использовали

Таблица 1. Результаты подбора гидов с помощью ChopChop и CRISPOR

Гид	Узнаваемая последовательность ДНК	Цепь	Офф-таргеты		Общее количество несовпадений (ММ)	Количество ММ в seed region
			Количество	В экзонах		
g1	AATGTCGGTCAGCCTTGCCCTGG	“—”	59	Да	3 с 3 ММ, 56 с 4 ММ	2 с 4 ММ, 1 с 5 ММ
g3	GAGCTCTAATCTTGCTGATAGGG	“—”	113	Нет	8 с 3 ММ, 104 с 4 ММ	3 с 5 ММ
g4	GAACACGACCTGGAGACCGTGGG	“+”	36	Да	36 с 4 ММ	1 с 5 ММ
g6	TCGGTGGAGCACGACGTGCCTGG	“+”	23	Да	1 с 3 ММ, 22 с 4 ММ	1 с 5 ММ
g2/1	GCTCTGTTTCAGCATGGTGGTGG	“—”	199	Нет	21 с 3 ММ, 174 с 4 ММ	1 с 3 ММ, 1 с 4 ММ, 5 с 5 ММ
g3/1	ACAGGCAGGAGAATAGGCGCAGG	“+”	471	Нет	64 с 3 ММ, 402 с 4 ММ	1 с 3 ММ, 1 с 4 ММ, 2 с 5 ММ
g4/1	GGTGGTGGGAGTCAGTTTCCTGG	“—”	201	Нет	28 с 3 ММ, 173 с 4 ММ	3 с 4 ММ, 2 с 5 ММ
gx/2	TGCTGAAACAGAGCAACGAGAGG	“+”	263	Да	54 с 3 ММ, 207 с 4 ММ	0 ММ

Примечание. Жирный шрифт в последовательности – РАМ-мотив. Зеленым цветом выделены более удачные гиды, согласно алгоритму ChopChop.

DNA Ladder 1 kb, DNA Ladder 100+ bp, DNA Ladder 50+ bp (кат. № NL001, NL002 и NL003 соответственно; “Евроген”, Россия),

Денситометрию в программе ImageJ для анализа интенсивности полос на геле использовали для оценки относительного количества разрезанной и неразрезанной ДНК, что позволило более точно оценить эффективность каждого гида. Результаты были представлены в виде графиков интенсивности. Площадь под каждым пиком измеряли для сравнения порезанной и непорезанной ДНК. В случае больших делеций интенсивность средней полосы рассчитывали как сумму порезанной и непорезанной ДНК в соотношении 1:1.

Очистка ДНК из геля. Для выделения ДНК использовали набор Clean Up Mini (“Евроген”, Россия). Очистку проводили в соответствии с протоколом на сайте производителя (<https://evrogen.ru/kit-user-manuals/BC023.pdf>).

Лигирование вектора и вставки осуществляли с использованием лигазы T4 (NEB) по стандартному протоколу. После лигирования смесь использовали для трансформации компетентных клеток.

Для трансформации клеток *E. coli* использовали имеющийся в лаборатории штамм химически компетентных клеток XL-Blue. Трансформацию проводили в соответствии со стандартным протоколом (<https://evrogen.ru/kit-user-manuals/CC001.pdf>).

ПЦР с колоний проводили для проверки наличия вставок гидов в плазидах. Амплификацию осуществляли с использованием набора 5XScreenMix (“Евроген”, Россия) и специфических праймеров. Результаты подтверждали по продуктам ПЦР.

Ведение клеточной культуры и трансфекция. Клеточную линию B16-F10 мышины меланомы (ATCC CRL-6475TM), полученную из метастаза в легких у мыши BALB/c, культивировали в среде DMEM, содержащей глутамин (“ПанЭко”, Россия), 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS; Thermofisher, США) и антибиотик гентамицин (“ПанЭко”, Россия). Перед трансфекцией культуральную среду заменяли на бессывороточную среду Opti-Mem (Gibco, США). Для трансфекции использовали липофильный агент LipofectamineTM 3000 (InvitrogenTM, США)). Трансфекцию проводили,

следуя оптимизированному протоколу от производителя (Lipofectamine 3000 Protocol). На 1 лунку 24-луночного планшета оптимальным количеством сочли 1 мкг плазмидной ДНК, P3000™ Reagent и 1 мкл Lipofectamine™ 3000 Reagent. Трансфекцию клеток линии B16-F10 проводили с использованием плазмид с Cas9 и гидовыми РНК, после чего клетки селектировали с помощью пурамицина для дальнейшей оценки эффективности разреза.

Титрование пурамицина. Чтобы определить оптимальную концентрацию дигидрохлорида пурамицина (10 мг/мл; Gibco, США) для селекции клеток, провели серию разведений. Использовали концентрации 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 и 10 мг/мл. Через 48 ч визуально оценивали выживаемость клеток. Концентрация 5 мкг/мл была выбрана как наиболее эффективная для дальнейших экспериментов.

Выделение геномной ДНК проводили с использованием стандартных методов, включая лизис клеток протеиназой К и очистку с применением набора ExtractDNA Blood & Cells (“Евроген”). Праймеры (прямой PrF и обратный PrR) для амплификации большой делеции:

PrF_big_del – ACAAGTAAGCTCTCTGCTGTCAT,

PrR_big_del – GTAGATGTTTCATGTGTCTCTGGGTC

и

PrF_big_del2 – GTAGATGTTTCATGTGTCTCTGCTGGGTC,

Sanger R1_1 – TCCGCCTTCTGATTCTCTTCGGC.

Для амплификации маленькой делеции:

PrF_small_del – AGCCTGGACTTTTTCAGGACA,

PrR_small_del – TGTTGGTTGCTCCCA GTGTT.

Расположение праймеров на карте гена указано на рис. 1.

Секвенирование по Сэнгеру было сделано в компании “Евроген” (Россия). Выравнивание отсеквенированных последовательностей проводили в Benchling online software tool (<https://www.benchling.com/>).

Анализ эффективности и точности редактирования генома проводили с использованием программного обеспечения TIDE (Tracking of Indels by Decomposition) для декомпозиции хроматограмм (Brinkman et al., 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мышиный ген *Kcnn2*, так же, как и у человека, имеет два экзона и представлен единственной изоформой (NCBI, Gene ID: 169522). Основная часть белка кодируется первым экзоном в 1356 нт, тогда как во втором экзоне кодирующими являются лишь 282 нт, а общий размер белка составляет 562 аминокислоты. Наша цель заключалась в подборе гидовых РНК, или гидов, таким образом, чтобы получилась делеция, которая не просто выключает функцию белка (транспорт

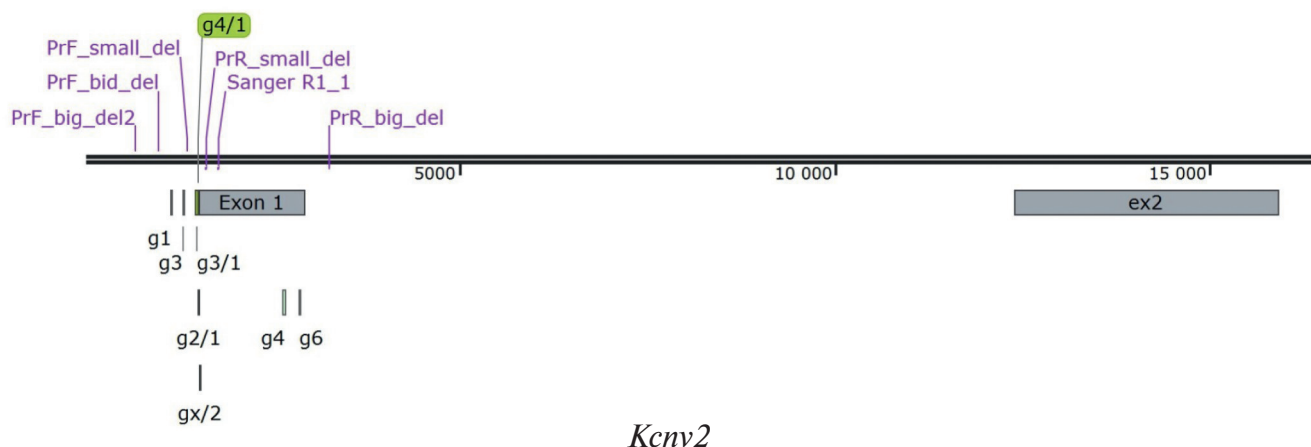


Рис. 1. Схема гена *Kcnn2* с обозначенными сайтами узнавания гидами в программе SnapGene. Фиолетовым цветом показаны названия и расположения праймеров для амплификации области, охватывающей большую и маленькую делеции.

ионов калия), но и полностью останавливает его синтез. Мы условно поделили делеции на маленькие (<50 bp), удаляющие стар-трансляции, и большие (>1000 bp), практически удаляющие первый экзон целиком.

Для дизайна гидовых РНК использовали программы ChopChop и CRISPOR, позволяющие выбрать наиболее эффективные направляющие РНК с минимальными нецелевыми эффектами. На основе их рекомендаций были выбраны гиды, которые представлены в табл. 1. Расположение гидов представлено на схеме (см. рис. 1), а их последовательности — в табл. ДМ1. Далее гиды тестировали на клеточной линии B16-F10. Для этого плазмиды, кодирующие гидовую РНК, ген *Cas9* и *Puro* (ген устойчивости к пурамицину) попарно доставлялись в мышинные клетки в отношении 1:1 для оценки наличия делеции. Пары используемых гидов представлены в табл. 2. В качестве клеточной модели выбрали линию мышины меланомы B16-F10, так как коммерческие линии, экспрессирующие белок KCNV2 пока отсутствуют. Участки ДНК,

предназначенные для редактирования CRISPR/Cas9, были предварительно секвенированы.

Клетки трансфицировали по протоколу, описанному в разделе «Материал и методика». В качестве контроля использовали нетрансфицированные клетки. Линия B16-F10 является труднотрансфицируемой, поэтому для отбора трансфицированных клеток использовали селекцию с помощью пурамицина. К одной половине лунок с контрольными клетками пурамицин добавляли, к другой половине — нет. Предварительный скрининг различных концентраций пурамицина показал, что концентрация 5 мкг/мл является оптимальной для данной линии. Гибель контрольных клеток с добавленным пурамицином указывала на то, что выжившие трансфицированные клетки несли плазмиды с *Cas9* и *gRNA*. Из этих клеток затем выделяли геномную ДНК. Области с маленькими и большими делециями были секвенированы. (см. раздел «Материал и методика» и рис. 1).

Продукты, полученные после реакции и проанализированные методом гель-электрофореза, имели длину малой делеции 253 нт и большой — 2581 нт, что подтверждало успешную работу обоих гидов. Если какой-то из гидов в нескольких парах с уже известными рабочими гидами не позволял получить делецию, то его считали неэффективным. На электрофореграммах (рис. ДМ2 и ДМ3) были выявлены 4 большие делеции (рис. 2а), обнаружены по 3 полосы: верхняя (неразрезанная ДНК, 2581 нт), нижняя (ДНК с делециями разного размера; см. табл. 2) и промежуточная (гетеродуплекс). Среди исследованных пар была получена одна маленькая делеция (рис. 2б).

Для подсчета эффективности внесения делеции пары с обоими рабочими гидами были доставлены в клетки в трех независимых экспериментах. Эффективность оценивали методом денситометрии в ImageJ (см. «Материал и методика»), а результаты представлены на рис. 3 и в табл. ДМ3. Наиболее эффективной оказалась пара гидов *gx/2* и *g4*. Их эффективность была подтверждена анализом TIDE (45.5 и 31.4% соответственно) (рис. 4). Полосы, соответствующие неразрезанной ДНК и ДНК с делецией, были вырезаны из геля и отправлены на секвенирование по Сэнгеру, чтобы подтвердить не только наличие делеции, но и ее точный размер и расположение. Секвенирование ма-

Таблица 2. Используемые в работе комбинации гидов, размер делеций и ожидаемый размер ПЦР-продукта

Комбинация гидов	Размер делеции, нт	ПЦР-продукт (верхний/нижний, нт)
Маленькие делеции		
<i>g4/1–gx/2</i>	35	253/218
<i>g3/1–gx/2</i>	42	253/212
<i>g2/1–gx/2</i>	20	253/233
<i>g3/1–g2/1</i>	22	253/231
Большие делеции		
<i>g3/1–g6</i>	1382	2581/1199
<i>g1–g6</i>	1726	2581/855
<i>g3–g6</i>	1569	2581/1012
<i>g3/1–g4</i>	1169	2581/1412
<i>g1–g4</i>	1513	2581/1068
<i>gx/2–g4</i>	1127	2581/1454
<i>gx/2–g6</i>	1340	2581/1241
<i>g1–g3/1</i>	344	1112/768
<i>g1–g2/1</i>	366	1112/746
<i>g1–gx/2</i>	386	1112/726
<i>g3–gx/2</i>	229	1112/883

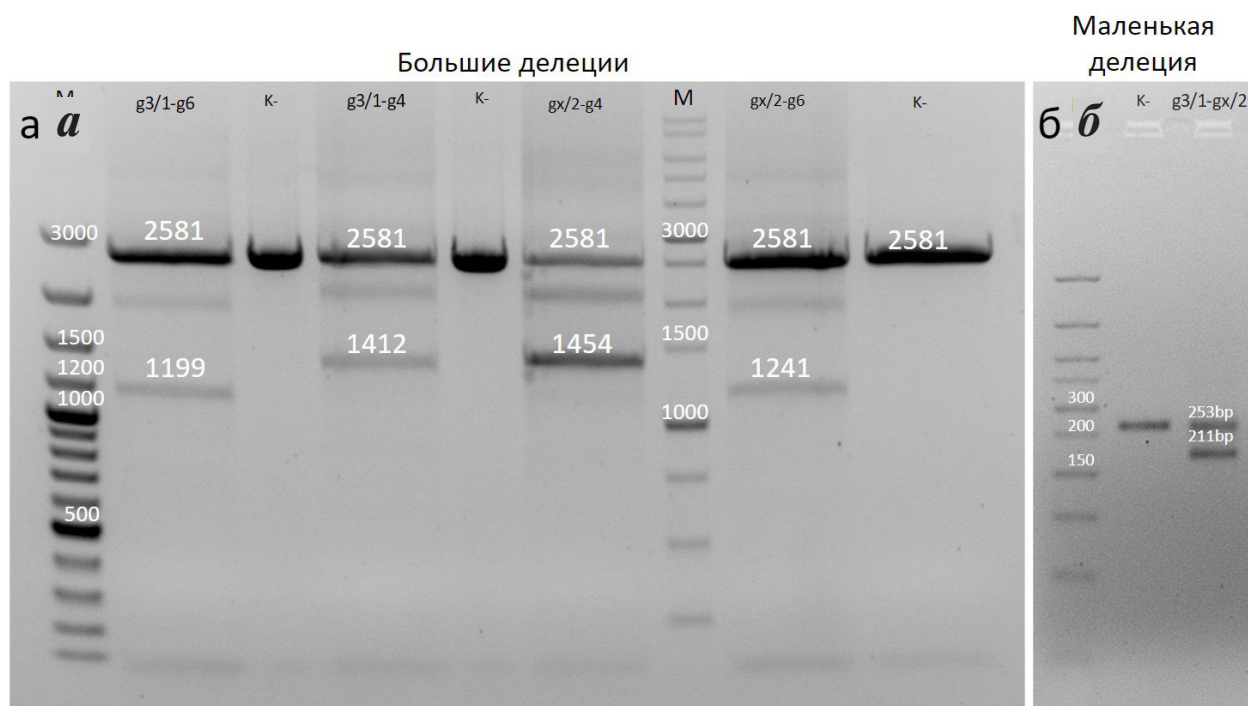


Рис. 2. Электрофореграмма по результатам ПЦР-скрининга клеток B16-F10. *а* – Большие делеции, *б* – маленькая делеция. (К–) – ПЦР-продукт из нетрансфицированных клеток (отрицательный контроль), М – маркер длин ДНК. Электрофорез в 1.5%- (*а*) и 3%-ном (*б*) агарозном геле.

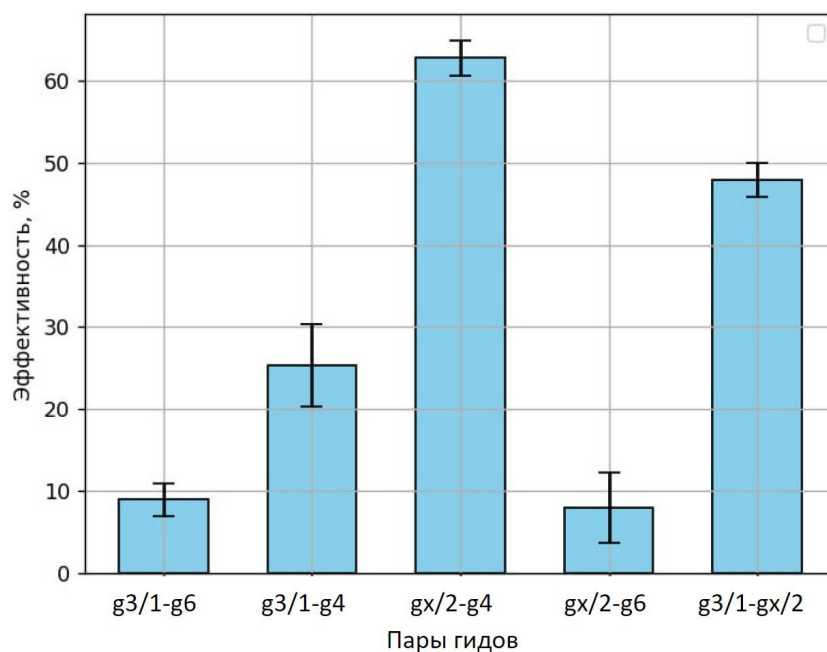


Рис. 3. Эффективность индукции делеций, полученная по результатам анализа электрофореграмм с помощью денситометрии в программе ImageJ.

ленькой делеции подтвердило удаление 42 нт, что исключает синтез белка за счет удаления старт-кодона (рис. 5). Секвенирование больших делеций также подтвердило удаление значительных участков (рис. 6*а–г*). Делеции

затрагивали старт-кодон или кодирующие участки от 7 до 453 аминокислот, что также делает синтез белка невозможным.

Таким образом, все полученные делеции могут приводить к нокауту гена.

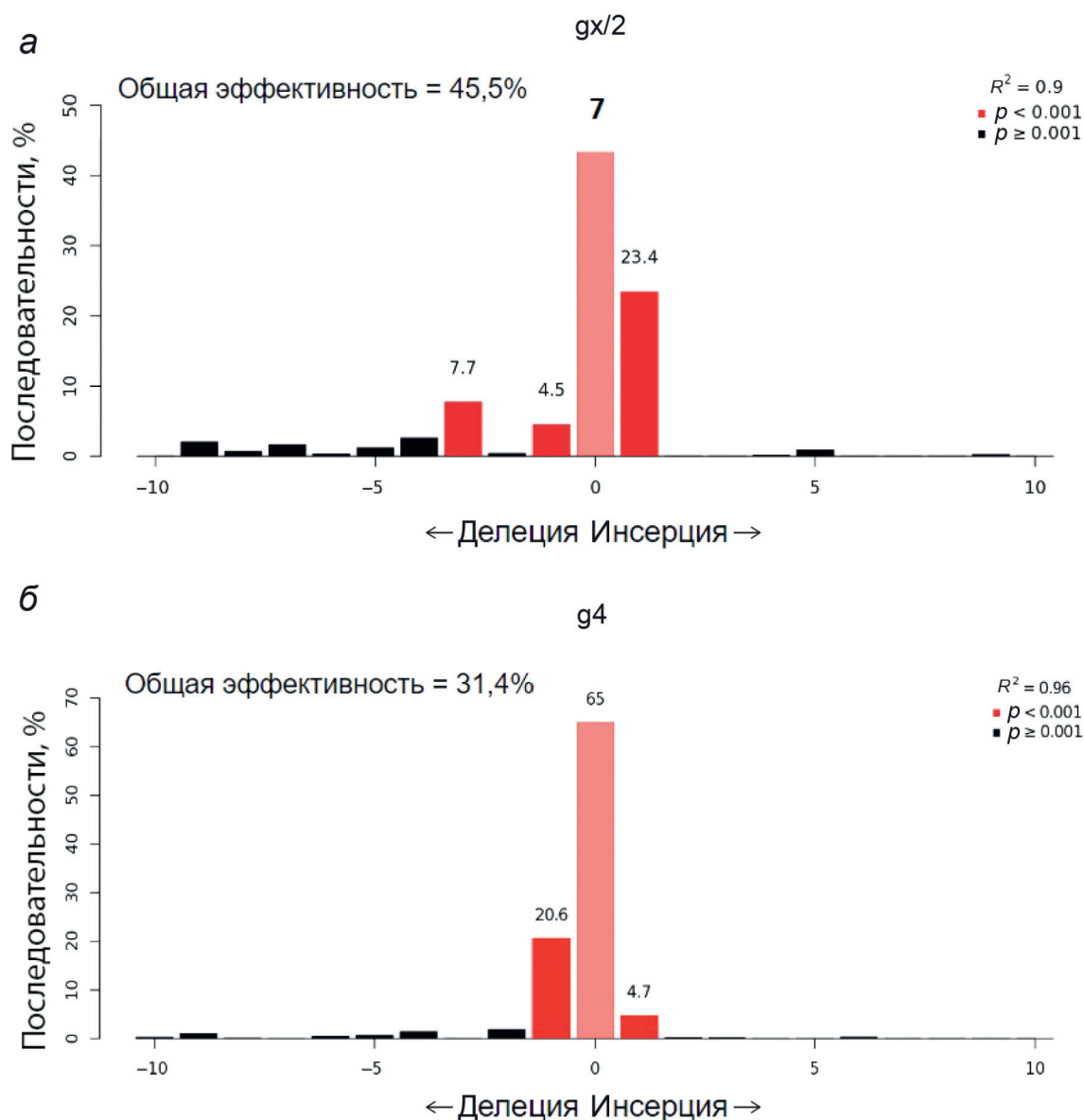


Рис. 4. Частоты инделов в диапазоне 10 нуклеотидов от предсказанного сайта разрезания. *а* — для гида *gx/2*, *б* — для гида *g4*.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе данного исследования была получена одна маленькая (40 нт) и три больших делеции, варьирующих от 1100 до 1400 нт. Эффективность одной делеции из больших оказалась наивысшей, а маленькая делеция заняла второе место по эффективности. Небольшие делеции чаще происходят благодаря простоте репарации через негомологичное соединение концов (NHEJ — non-homologous end joining), в то время как крупные делеции (>1 kb) требуют более сложных механизмов восстановления, таких

как гомологичная рекомбинация, что может снижать эффективность редактирования. Тем не менее одна из наших больших делеций оказалась более эффективной благодаря удачному выбору гидов.

На эффективность CRISPR/Cas9 также влияют дизайн и вторичная структура гидовой РНК, а также доступность хроматина (Jensen et al., 2017). Для более глубокого понимания факторов, влияющих на эффективность работы гидов, был проведен структурный анализ всех направляющих РНК с использованием программы RNAfold Web Server (рис. ДМ4). Мы оценивали

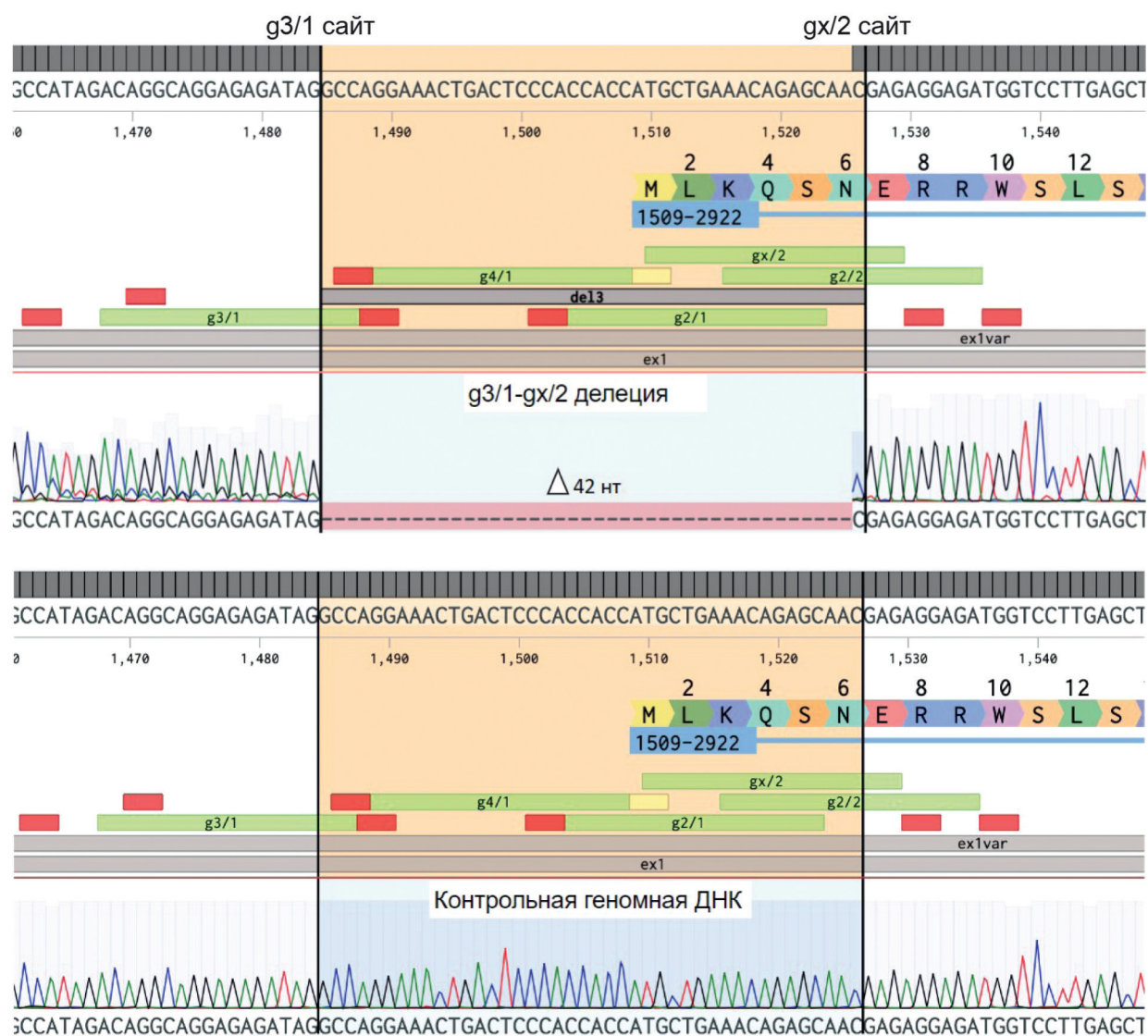


Рис. 5. Подтверждение маленькой делеции секвенированием по Сэнгеру. Хромотограмма, соответствующая делеции гидами g3/1–gx/2 (вверху), и контрольная хромотограмма, полученная из клеток без делеции (внизу).

наличие шпилек в структуре, степень неспаренности нуклеотидов в seed region и количество внутренних связей между уникальной последовательностью гидовой РНК и остальной частью РНК. Допустимые параметры включают не более 12 связей между уникальной частью гидовой РНК и остальной последовательностью [общим количеством спаренных оснований (ОКСО), не более 7 последовательных связей (последовательных спаренных оснований (ПСО)] и не более 6 связываний уникальной последовательности с самой собой (internal base pair) (Liang et al., 2016).

Данные по оценке этих параметров представлены в табл. 3. Лучшие результаты показал гид

gx/2, у которого структура оказалась наиболее подходящей для эффективного разрезания. На втором месте — гид g4, у которого есть связи между seed region и последовательность gRNA-scaffold (каркас гидовой РНК, обеспечивающей связывание с Cas9), но они не последовательные, в отличие от гидов g1, g3 и g4/1. Пара гидов gx/2 и g4 продемонстрировала наилучшие результаты в создании крупной делеции. Интересно, что гид g3/1 проявил активность, несмотря на отсутствие оптимальных характеристик и отсутствие stem loop 2, что согласуется с данными из другой работы (Bruegmann et al., 2019). Хотя биоинформатические инструменты часто предсказывают эффективность гидовой РНК,

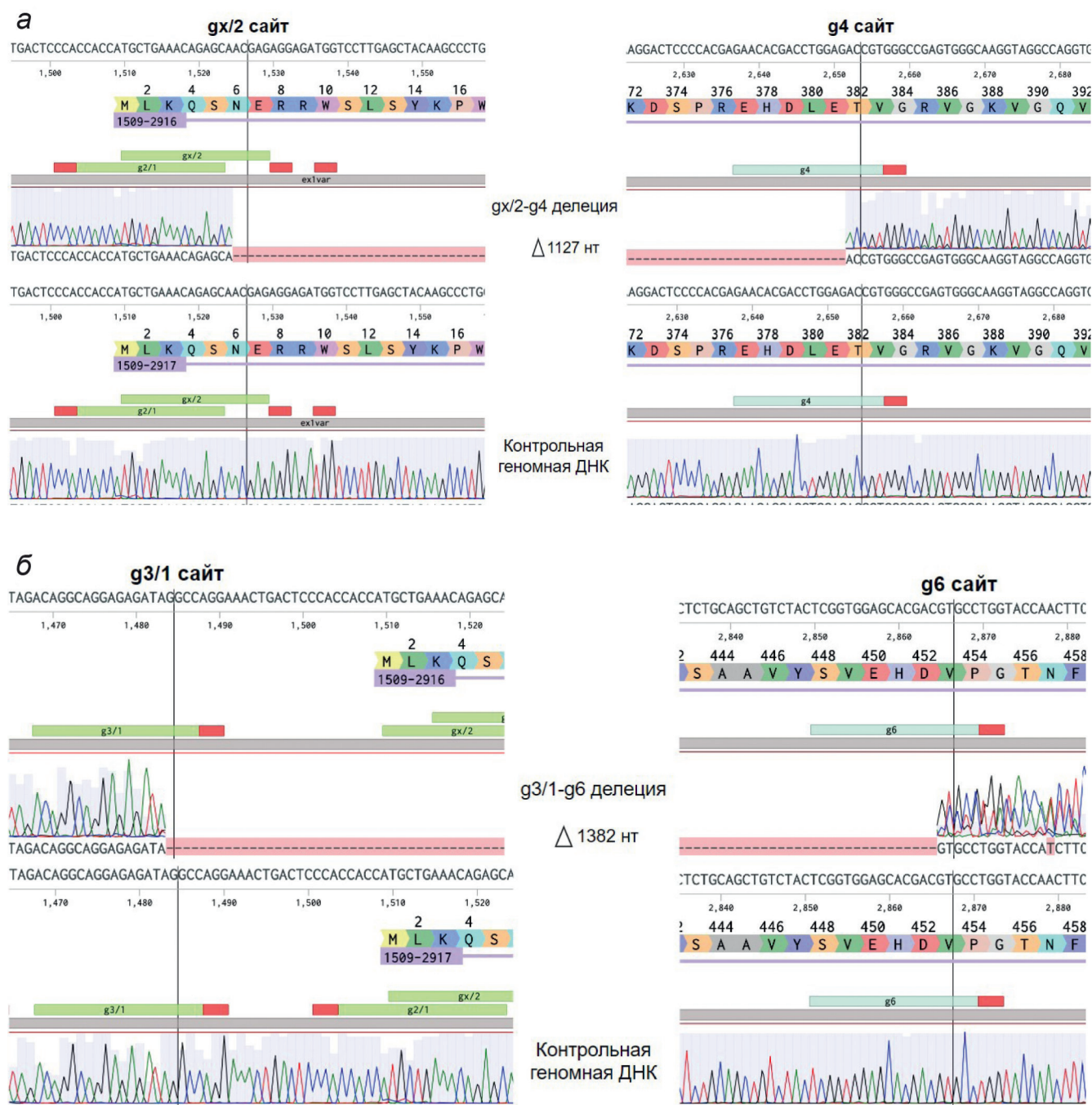


Рис. 6. Подтверждение больших делеций секвенированием по Сэнгеру. Верхние хроматограммы получены из фрагмента ДНК с делецией, а нижние — из фрагмента ДНК без делеции: *а* — *gx/2*–*g4*, *б* — *g3/1*–*g6*. Окончание рисунка — на следующей странице.

в некоторых случаях они оказываются менее точными, что подчеркивает ограниченность предсказательных моделей и необходимость экспериментальной проверки.

Настоящее исследование сосредоточено на дизайне и проверке направляющих РНК для CRISPR/Cas9, нацеленных на нокаут гена

Kcny2 у мышей. Проведенные эксперименты подтвердили высокую эффективность выбранных гидов, что подчеркивает их потенциал в дальнейших исследованиях. Поиск и проверка гидов на мышинных клетках являются ключевым этапом перед созданием нокаутной мышинной линии, позволяющим оценить их эф-

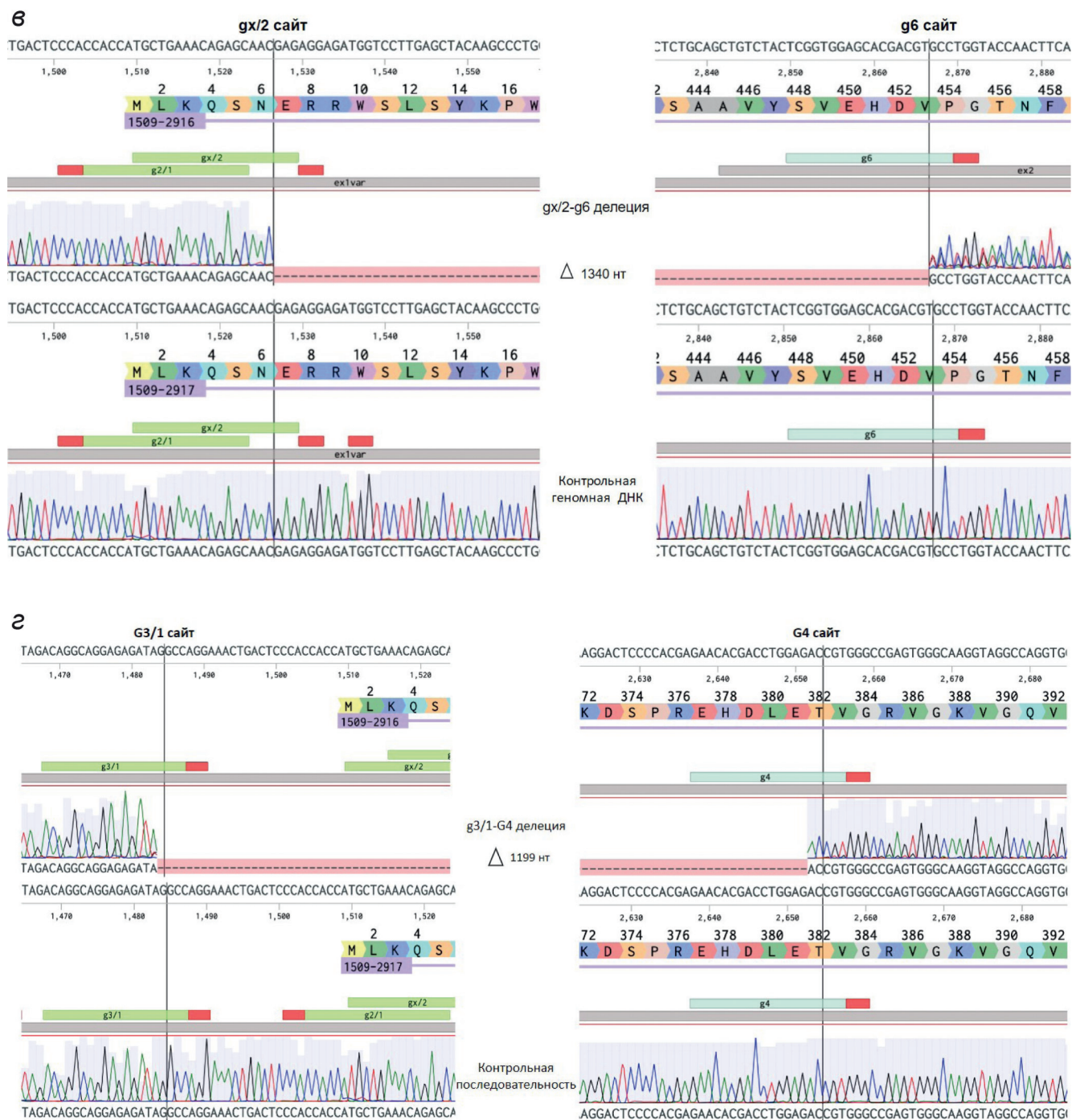


Рис. 6. (Окончание). Подтверждение больших делеций секвенированием по Сэнгеру. Верхние хроматограммы получены из фрагмента ДНК с делецией, а нижние — из фрагмента ДНК без делеции: *в* — gx/2–g6, *г* — g3/1–g4.

фективность и точность. Успешная проверка на клетках является важным шагом перед созданием нокаутной мышиной модели, которая будет использоваться для изучения патофизиологии заболевания и тестирования генотерапевтических методов. Полученные нами данные могут стать основой для дальнейших исследований по созданию моделей заболевания,

а также изучению функции белка. Например, гид 3/1 расположен непосредственно перед кодирующей частью и может быть использован для встраивания конститутивного промотора перед геном с целью получения мышиной модельной клеточной линии любого происхождения, где данный ген будет экспрессироваться. Такая клеточная линия может быть использована

Таблица 3. Оценка параметров вторичной структуры гидов

Гид	Шпилька 2	Шпилька 3	RAR-шпилька	Спаренные 18–20 нт	ОКСО	ПСО	GC, %
g6	–	+	+	3/3	15	5	70
g4	+	+	+	(1+1)/3	11	4	60
g1	+	+	–	2/3	10	4	60
g3/1	–	+	+	3/3	13	4	60
g3	+	+	+	2/3	11	6	40
g4/1	–	+	–	2/3	11	8	60
g2/1	–	+	+	0/3	10	7	55
gx/2	+	+	+	0/3	7	6	50

Примечание. RAR-шпилька – область повтор-анти-повтор, ОКСО – общее количество спаренных оснований, ПСО – последовательные спаренные основания. GC – нуклеотиды гуанин и цитозин и их процентное содержание в последовательности гида. Жирным шрифтом выделены неоптимальные параметры, курсивным – полное соответствие оптимальным параметрам.

для изучения функции гена. Также пара гидов, создающих большую делецию, может быть использована для получения гуманизированной модельной линии, где под эндогенный промотор будет встроена последовательность гена *KCNV2* человека, на которой можно будет моделировать известные мутации человека. Таким образом, результаты нашего исследования закладывают основу для создания новых экспериментальных моделей, способствующих более глубокому пониманию патогенеза CDSRR и разработке эффективных терапевтических подходов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственных заданий Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Москва) и Федерального исследовательского центра оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий (Москва; проект № FGFG-2024-0004, соглашение № 075-03-2024-323/3).

СОБЛЮДЕНИЕ
ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Andreazzoli M., Barravecchia I., De Cesari C., Angeloni D., Demontis G.C. 2021. Inducible pluripotent stem cells to model and treat inherited degenerative diseases of the outer retina: 3D-organoids limitations and bioengineering solutions. *Cells*. V. 10. Art. ID 2489. <https://doi.org/10.3390/cells10092489>

Aslanidis A., Karlstetter M., Walczak Y., Jägle H., Langmann T. 2014. RETINA-specific expression of Kcnv2 is controlled by cone-rod homeobox (Crx) and neural retina leucine zipper (Nrl). *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 801. P. 31. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8_5

Ail D., Malki H., Zin E.A., Dalkara D. 2023. Adeno-associated virus (AAV) – based gene therapies for retinal diseases: where are we? *Ther. Adv. Chronic. Dis.* V. 16. P. 111. <https://doi.org/10.2147/TACG.S383453>

Barnard A.R., Tolmachova T., Seabra M.C., MacLaren R.E. 2012. Assessment of visual function by electroretinography following rAAV2-CHM/REPL gene therapy in a mouse model of choroideremia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* V. 53. P. 1933. <https://doi.org/10.1167/iovs.53.3.1933>

Brinkman E.K., Chen T., Amendola M., van Steensel B. 2014. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic. Acids. Res.* V. 42. Art. ID e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1112>

- Bruegmann T., Deecke K., Fladung M. 2019. Mediated genome editing in poplars: evaluating the efficiency of gRNAs in CRISPR/Cas9. *Mol. Biol. Rep.* V. 20: 3623. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04952-8>
- Carvalho L., Rashwan R., Lim X.R., Brunet A., Miller A.L., Bhatt Y., Fuller-Carter P., Hunt D. 2023. Pre-clinical efficacy testing of AAV-based gene therapy for KCNV2-deficiency. *Investigative Ophthalmol. Visual Sci.* V. 64. P. 477. <https://doi.org/10.1167/iovs.64.6.477>
- Chen X., Xu F., Zhu C., Ji J., Zhou X., Feng X., Guang S. 2014. Dual sgRNA-directed gene knockout using CRISPR/Cas9 technology in *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Rep.* V. 4. Art. ID 7581. <https://doi.org/10.1038/srep07581>
- Chirinskaite A.V., Rotov A.Y., Ermolaeva M.E., Tkachenko L.A., Vaganova A.N., Danilov L.G., Fedoseeva K.N., Kostin N.A., Sopova J.V., Firsov M.L., Leonova E.I. 2023. Does background matter? A comparative characterization of mouse models of autosomal retinitis pigmentosa rd1 and Pde6b-KO. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. Art. ID 17180. <https://doi.org/10.3390/ijms242417180>
- Czirjak G., Toth Z.E., Enyedi P. 2007. Characterization of the heteromeric potassium channel formed by kv2.1 and the retinal subunit kv8.2 in *Xenopus* oocytes. *J. Neurophysiol.* V. 98. P. 1213. <https://doi.org/10.1152/jn.00093.2007>
- Da Silva-Buttkus P., Spielmann N., Klein-Rodewald T., Schütt C., Aguilar-Pimentel A., Amarie O.V., Becker L., Calzada-Wack J., Garrett L., Gerlini R., Kraiger M., Leuchtenberger S., Östereich M.A., Rathkolb B., Sanz-Moreno A., Stöger C., Hölter S.M., Seisenberger C., Marschall S., Fuchs H., Gailus-Durner V., Hrabě de Angelis M. 2023. Knockout mouse models as a resource for the study of rare diseases. *Mamm. Genome.* V. 34. P. 244. <https://doi.org/10.1007/s00335-023-09986-z>
- Gill J.S., Georgiou M., Kalitzeos A., Moore A.T., Michaelides M. 2019. Progressive cone and cone-rod dystrophies: clinical features, molecular genetics and prospects for therapy. *Br. J. Ophthalmol.* V. 103. P. 711. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-312983>
- Hart N.S., Mountford J.K., Voigt V., Fuller-Carter P., Barth M., Nerbonne J.M., Hunt D.M., Carvalho L.S. 2019. The role of the voltage-gated potassium channel proteins Kv8.2 and Kv2.1 in vision and retinal disease: insights from the study of mouse gene knock-out mutations. *eNEURO.* V. 6. Art. ID 0032. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0032-19.2019>
- Hunt D.M., Har N., Mountford J.K., Barth M., Fuller-Carter P., Carvalho L.S. 2018. Role of the voltage-gated potassium channel subunit Kv8.2 in inherited retinal disease and interaction with other channel proteins. *ARVO Ann. Meeting Abstract.* V. 59. Art. ID 2328. <https://doi.org/10.1167/iovs.59.6.2328>
- Jensen K.T., Floe L., Petersen T.S., Huang J., Xu F., Bolund L., Luo Y., Lin L. 2017. Chromatin accessibility and guide sequence secondary structure affect CRISPR-Cas9 gene editing efficiency. *FEBS Lett.* V. 591. V. 1892. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12694>
- Liang G., Zhang H., Lou D., Yua D. 2016. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci. Rep.* V. 6. P. 21451. <https://doi.org/10.1038/srep21451>
- Maguire A.M., Bennett J., Aleman E.M., Leroy B.P., Aleman T.S. 2021. Clinical perspective: treating RPE65-associated retinal dystrophy. *Mol. Ther.* V. 29. P. 442. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.10.025>
- Michaelides M., Hardcastle A.J., Hunt D.M., Moore A.T. 2006. Progressive cone and cone-rod dystrophies: phenotypes and underlying molecular genetic basis. *Surv. Ophthalmol.* V. 51. P. 232. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2006.02.008>
- Michaelides M., Holder G.E., Webster A.R., Hunt D.M., Bird A.C., Fitzke F.W., Mollon J.D., Moore A.T. 2005. A detailed phenotypic study of “cone dystrophy with supernormal rod ERG”. *Br. J. Ophthalmol.* V. 89. P. 332. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.047746>
- Shahi P.K., Srinivasan A., Pattnaik B.R. 2022. A novel Kcnv2 nonsense mutation mouse model of cone dystrophy with supernormal rod response. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* V. 63. Art. ID 1784. <https://doi.org/10.1167/iovs.63.6.1784>
- Skarnes W.C., Rosen B., West A.P., Koutsourakis M., Bushell W., Iyer V., Mujica A.O., Thomas M., Harrow J., Cox T., Jackson D., Severin J., Fu J., Nefedov M., de Jong P. J., Stewart A.F., Bradley A. 2011. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature.* V. 474. P. 337. <https://doi.org/10.1038/nature10163>
- Uddin F., Rudin C.M., Sen T. 2020. CRISPR Gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. *Front. Oncol.* V. 10. Art. ID 1387. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>
- Vincent A., Wright T., Garcia-Sanchez Y., Kisilak M., Campbell M., Westall C., Heon E. 2013. Phenotypic characteristics including in vivo cone photoreceptor mosaic in KCNV2-related “cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram”. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* V. 54. P. 898. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10664>
- Wiles M.V., Qin W., Cheng A.W., Wang H. 2015. CRISPR–Cas9-mediated genome editing and guide RNA design. *Mamm. Genome.* V. 26. P. 501. <https://doi.org/10.1007/s00335-015-9579-0>

- Wu H., Cowing J.A., Michaelides M., Wilkie S.E., Jeffery G., Jenkins S.A., Mester V., Bird A.C., Robson A.G., Holder G.E., Moore A.T., Hunt D.M., Webster A.R. 2006. Mutations in the gene KCNV2 encoding a voltage-gated potassium channel subunit cause “cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram” in humans. *Am. J. Hum. Genet.* V. 79. P. 574.
<https://doi.org/10.1086/507885>
- Wissinger B., Dangel S., Jagle H., Hansen L., Baumann B., Rudolph G., Wolf C., Bonin M., Koeppen K., Ladewig T., Kohl S., Zrenner E., Rosenberg T. 2008. Cone dystrophy with supernormal rod response is strictly associated with mutations in *KCNV2*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* V. 49. P. 751.
<https://doi.org/10.1167/iovs.07-1038>
- Zuker M., Stiegler P. 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* V. 9. P. 133.
<https://doi.org/10.1093/nar/9.1.133>

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Таблица ДМ1. Олигонуклеотиды для отжига

Название олигонуклеотида	Последовательность прямая (F) и обратная (R)
<i>Kcnv2</i> -KO_g1	F: CAC CGG GGC AAG GCT GAC CGA CAT T R: AAA CAA TGT CGG TCA GCC TTG CCC C
<i>Kcnv2</i> -KO_g3	F: CAC CGT ATC AGC AAG ATT AGA GCT C R: AAA CGA GCT CTA ATC TTG CTG ATA C
<i>Kcnv2</i> -KO_g4	F: CAC CGG AAC ACG ACC TGG AGA CCG T R: AAA CAC GGT CTC CAG GTC GTG TTC C
<i>Kcnv2</i> -KO_g6	F: CAC CGT CGG TGG AGC ACG ACG TGC C R: AAA CGG CAC GTC GTG CTC CAC CGA C
<i>Kcnv2</i> -KO_g2/1	F: CAC CGC CAC CAT GCT GAA ACA GAG C R: AAA CGC TCT GTT TCA GCA TGG TGG C
<i>Kcnv2</i> -KO_g3/1	F: CAC CGA CAG GCA GGA GAG ATA GGC C R: AAA CGG CCT ATC TCT CCT GCC TGT C
<i>Kcnv2</i> -KO_g4/1	F: CAC CGG GAA ACT GAC TCC CAC CAC C R: AAA CGG TGG TGG GAG TCA GTT TCC C
<i>Kcnv2</i> -KO_gx/2	F: CAC CGT GCT GAA ACA GAG CAA CGA G R: AAA CCT CGT TGC TCT GTT TCA GCA C

Таблица ДМ2. Последовательности гидовых RNA

Гид	Последовательность
g1	GGGCAAGGCUGACCGACAUUUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU
g3	UAUCAGCAAGAUUAGAGCUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU
g4	GAACACGACCGUGGAGACCGUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU
g6	UCGGUGGAGCACGACGUGCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU

Таблица ДМ2. Окончание

Гид	Последовательность
g2/1	CCACCAUGCGUGAAACAGAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU
g3/1	ACAGGCAGGAGAGAUAGGCCUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUU
g4/1	GGAAACUGACUCCACCACCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU
gx/2	UGCUGAAACAGAGCAACGAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU

Примечание: черным цветом выделена уникальная часть, или спейсер, определяющая таргетирование, а голубым – gRNA-scaffold, или каркас гидовой РНК, обеспечивающей связывание с Cas9.

Таблица ДМ3. Эффективность разрезания каждой парой гидов в трех независимых экспериментах

Пара гидов	Эксперимент			Среднее значение	Стандартное отклонение
	1	2	3		
g3/1–g6	11.5	8.5	6.8	8.92	2.36
g3/1–g4	21.3	32.5	22.3	25.35	6.21
gx/2–g4	60.9	65.7	61.6	62.73	2.59
gx/2–g6	11.8	10.1	2.0	7.97	5.24
g3/1–gx/2	50.2	45.2	48.4	47.93	2.53

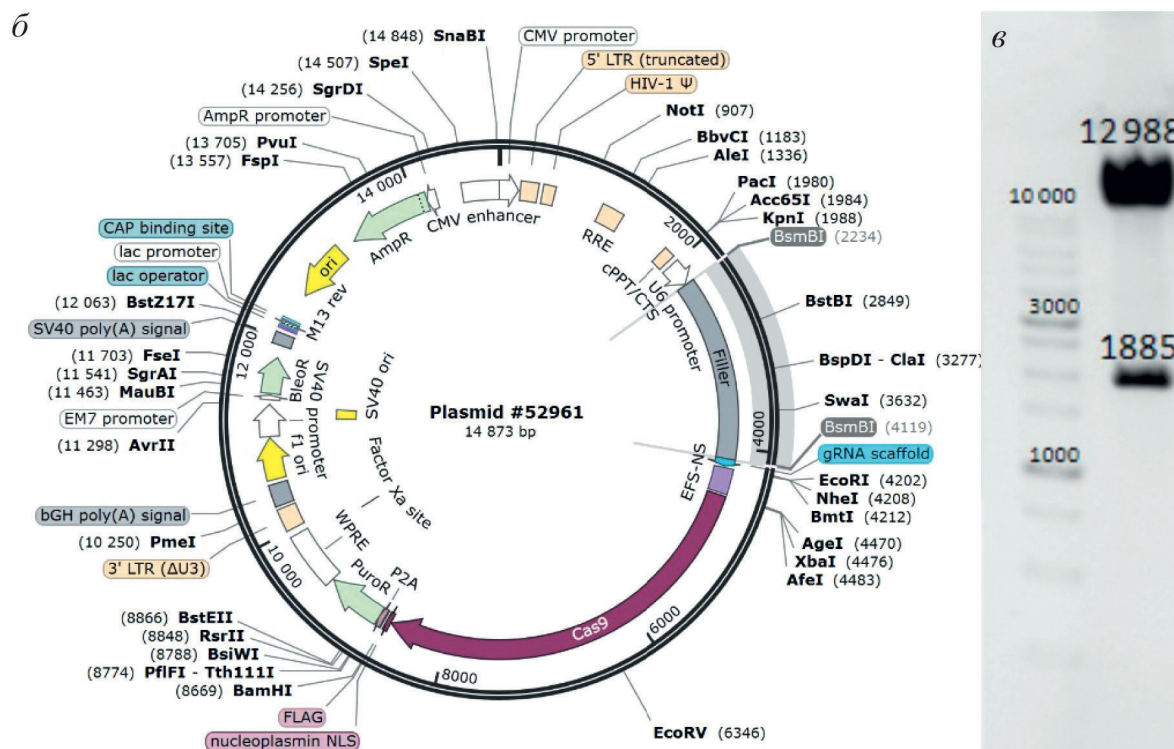
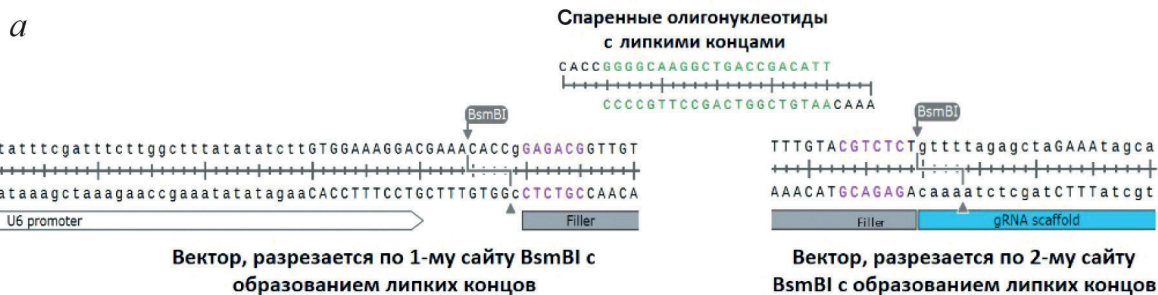


Рис. ДМ1. Плазмиды (# 52961; Addgene, США). *а* – Схема, показывающая соответствие липких концов вектора и липких концов спаренных олигонуклеотидов; фиолетовым цветом выделены сайты узнавания рестриктазой BsmBI, зеленым – уникальная часть гида на примере гида g1. *б* – Карта плазмиды с обозначениями сайтов рестрикции BsmBI и вырезаемого продукта. *в* – Продукт рестрикции на электрофореграмме.

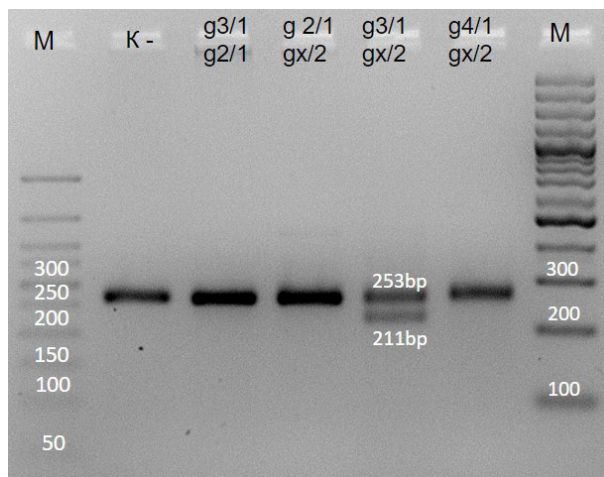


Рис. ДМ2. Электрофореграмма по результатам ПЦР-скрининга геномной ДНК с маленькими делециями, выделенной из клеток В16-F10. На электрофореграмме указаны пары гидов, используемые для создания маленькой делеции: g3/1 и g2/1, g2/1 и gx/2, g3/1 и gx/2, g4/1 и gx/2. М – маркер длин ДНК, К – отрицательный контроль.

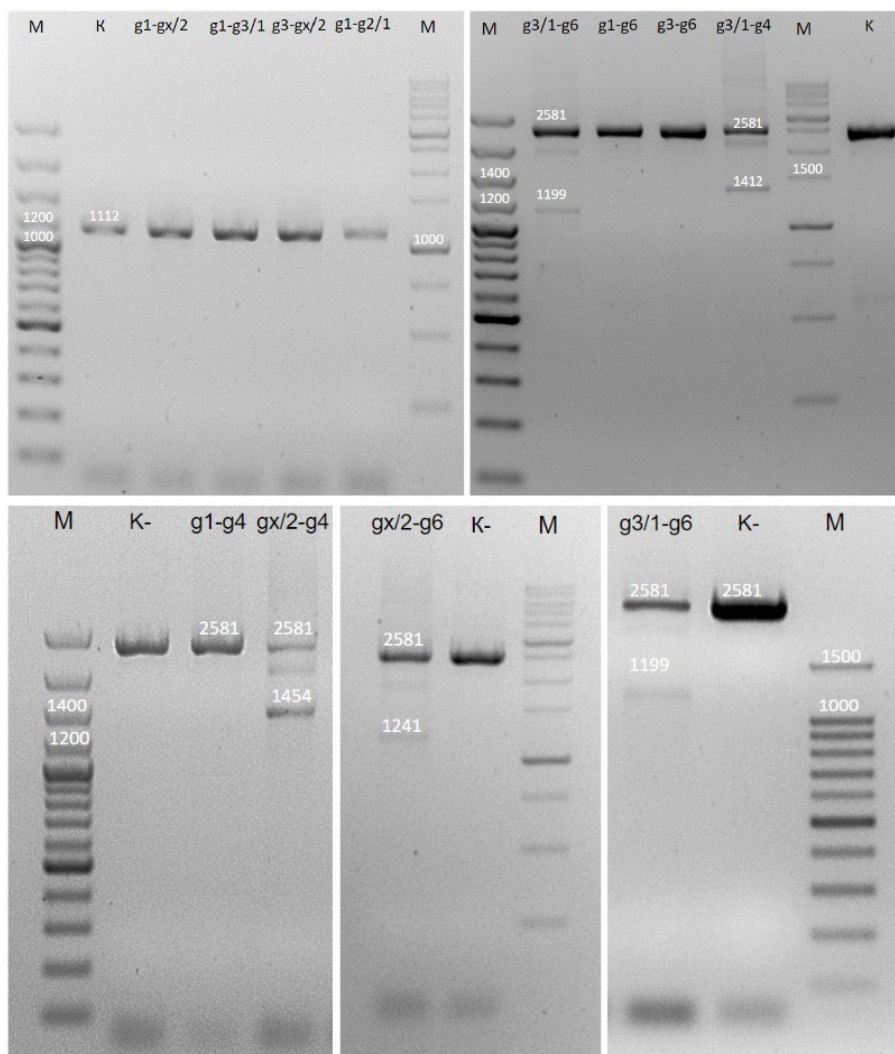


Рис. ДМ3. Гель-электрофорез по результатам ПЦР-скрининга геномной ДНК с большими делециями, выделенной из клеток В16-F10. На электрофореграмме указаны пары гидов, используемые для создания большой делеции: g1-gx/24; g1-g3/1; g3-gx/2; g-g2/1; g3/1-g6; g1-g6; g3-g6; g3/1-g4; g1-g4; gx/2-g4; gx/2-g6; g3/1-g6. М – маркер длин ДНК, К – отрицательный контроль.

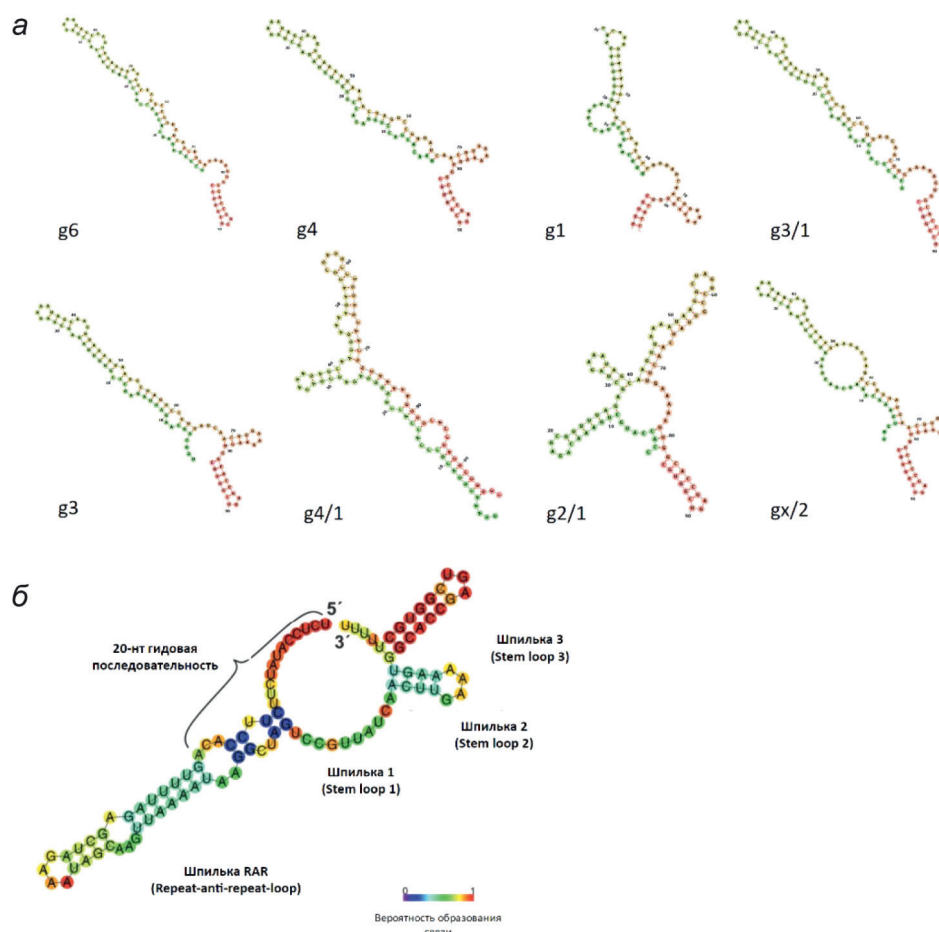


Рис. ДМ4. Вторичные структуры гидов, полученные в RNAfold Web Server. *а* — Вторичные структуры используемых гидов; *б* — вторичная структура с обозначениями RAR-шпилька (repeat and anti-repeat region — область повтор-анти-повтор), шпильки (stem loop) 1, 2 и 3, 20-нуклеотидная последовательность (Bruegmann et al., 2019).

DESIGN AND SELECTION OF GUIDES FOR CRISPR/CAS9-MEDIATED KNOCKOUT OF THE *Kcnv2* GENE IN MOUSE CELLS

E. N. Antonova^{a,*}, A. B. Soroka^a, O. N. Mityaeva^{a,b,c}, P.Y. Volchikov^{a,b,c}

^a Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),

Moscow oblast, Dolgoprudny, 141701, Russia

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

^c Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, 125315, Russia

* E-mail: antonova.en@genlab.llc

Mutations in the human *KCNV2* gene cause a rare hereditary disease — cone dystrophy with supernormal rod response (CDSRR), characterized by progressive vision loss and impaired color discrimination. The *KCNV2* gene encodes the Kv8.2 subunit of a potassium channel that is critical for the normal function of retinal photoreceptors. Gene therapy offers a promising treatment approach for this condition. To test the efficacy of gene therapy, an appropriate experimental disease model, such as a knockout mouse model, is required. This study focused on selecting optimal guide RNAs for knocking out the *Kcnv2* gene using the CRISPR/Cas9 system and testing their efficiency in a mouse cell line. The selected guide RNAs can be utilized to generate a *Kcnv2*^{-/-} mouse model.

Keywords: *KCNV2* gene, *Kcnv2* gene, guide RNA, deletion, Cas9

УДК 576.54:619

МИКРОВЕЗИКУЛЫ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ПРИ ОСТЕОАРТРИТЕ ЛОШАДЕЙ

© 2024 г. А. М. Аймалетдинов^{1, *}, А. Г. Маланьева¹, М. А. Тамбовский¹, Е. Ю. Закирова¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия,

* E-mail: aimaletdinowam@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2024

После доработки 02.09.2024

Принята к публикации 04.09.2024

Современные стратегии лечения остеоартрита (ОА) в основном направлены на устранение симптомов. В настоящее время в медицине и ветеринарии практикуется использование клеточных методов терапии, включающих мезенхимные стволовые клетки (МСК). Также в настоящее время с целью регенерации применяют микровезикулы (МВ), полученные из МСК. Цель настоящего исследования — изучить возможность потенциального влияния искусственных МВ на хондроциты крысы. Проведенные *in vitro* эксперименты показали, что МВ, полученные из МСК, оказывали положительное действие на жизнеспособность и миграционную способность культуры клеток хондроцитов. МВ *in vitro* при 3D-моделировании ОА нивелировали действие провоспалительных факторов IL-1b и TNF-α. Эксперименты показали, что МВ взаимодействуют и сливаются непосредственно с мембранами хондроцитов. Таким образом, нами показано влияние МВ из МСК лошади на хондроциты *in vitro*.

Ключевые слова: остеоартрит, мезенхимные стволовые клетки, микровезикулы, лошадь, хондроциты, хрящевая ткань, крыса

Принятые сокращения: МВ — микровезикулы; МСК — мезенхимные стволовые клетки; ОА — остеоартрит.

DOI: 10.31857/S0041377124050044, **EDN:** DUTHUG

Остеоартрит (ОА) — хроническое дегенеративное заболевание многофакторной этиологии, характеризующееся утратой или повреждением суставного хряща, а также ремоделированием образующих сустав костей. ОА вызывает боль в суставах, обычно усиливающуюся при нагрузке и физической активности. Симптомом ОА также является тугоподвижность после бездействия (Thomas et al., 2017). ОА является одним из наиболее часто диагностируемых заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Это заболевание имеет сложный патогенез. Современные исследования указывают на многофакторный характер развития ОА. При развитии заболевания происходят значительные изменения на всех уровнях организации, в том числе изменения молекулярных процессов в хряще, сопровождающиеся нарушениями его структуры и функциональных свойств, а также регуляции синтеза компонентов хрящевого

матрикса хондроцитами. Этиопатогенез ОА может быть первичным (идиопатическим) или вторичным (с влиянием наследственных факторов) (Mahajan et al., 2005).

ОА обычно поражает животных старшего и среднего возраста. Поскольку это заболевание обычно развивается с возрастом, владельцы домашних животных часто путают изменения в поведении своих животных с нормальными возрастными изменениями (такими как снижение активности), тогда как на самом деле животное может страдать от довольно сильной артритной боли (Rychel, 2010).

ОА является наиболее распространенной причиной хромоты у лошадей, примерно 60% случаев приходится на это заболевание (Go-drich 2006; Bertoni et al 2020). Развитие ОА связано с множеством предрасполагающих факторов, таких как возраст, острая травма и (или) нерегулярная или повторяющаяся

перегрузка суставных структур. Каждое из этих состояний может приводить к прогрессирующему износу хрящевых поверхностей, а также ремоделированию мягких тканей и субхондральной кости (Lories, Luyten, 2012).

Диагностика ОА в первую очередь основывается на тщательном анамнезе и результатах рентгенологического обследования. Сложность в постановке диагноза заключается в том, что у многих животных заболевание протекает бессимптомно (Taruc-Uy, Lynch, 2013).

Современные стратегии лечения ОА в основном направлены на устранение симптомов. Лечение ОА включает облегчение боли, уменьшение скованности, поддержание функциональных возможностей и улучшение качества жизни (Bhattacharjee et al., 2022). Для терапии чаще всего применяют нестероидные противовоспалительные препараты, анальгетики, а также внутрисуставные препараты, такие как гиалуроновая кислота и стероиды (Weinstein et al., 2013). Часто применяют и хирургические методы лечения (Revenaugh et al., 2005). Однако многие методы лечения имеют побочные эффекты (Li et al., 2019).

В настоящее время в медицине и ветеринарии практикуется использование клеточных методов терапии (Kriston-Pál et al., 2020). В случае такой терапии используются стволовые клетки, включая мезенхимные стволовые клетки (МСК), эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (Atala, 2004). Однако клеточная терапия имеет ряд ограничений. Исследования показали, что трансплантированные стволовые клетки в пораженном суставе с наличием внутри воспалительных цитокинов могут усиливать воспалительную реакцию и ускорять прогрессирование заболевания (Lee et al., 2010). Несмотря на то, что МСК из одной и той же ткани характеризуются способностью подавлять воспаление, необходимо учитывать влияния и изменения свойств, зависящие от партии и донора (Wang et al., 2013). Причиной такой вариативности является существование гетерогенности МСК, заключающейся в том, что разные субпопуляции могут демонстрировать разные профили генной экспрессии специфических факторов и функциональные свойства (Phinney et al., 2005).

Кроме того, в настоящее время применяют микровезикулы (МВ), полученные из МСК. Их эффективность с точки зрения восстановления хряща, транспорта микроРНК и ряда других функций свидетельствует о их регенеративном потенциале и делает их перспективными бесклеточными терапевтическими агентами для лечения ОА (Wu et al., 2019).

Цель настоящей работы — изучить потенциальную терапевтическую эффективность МВ, полученных из МСК для лечения ОА у лошадей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение МСК лошади. МСК были получены из жировой ткани лошади. Забор жировой ткани осуществляли в стерильных условиях ветеринарной клиники Казанского ипподрома. Далее работу проводили в лабораторных условиях. Взятые образцы очищали от соединительной ткани, промывали фосфатным буферным физиологическим раствором (PBS, “Панэко”, Россия) и измельчали вручную. Измельченную ткань инкубировали 1 ч в шейкере-инкубаторе с 0.2%-ной коллагеназой краба (ООО “Биолот”, Россия). Далее клетки осаждали центрифугированием, супернатант сливали, осадок ресуспендировали в физиологическом растворе. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 800 g. Отмытый осадок клеток повторно суспендировали в культуральной среде DMEM-Glutamax I (“Панэко”, Россия) с 10% сыворотки плодов коров (FBS; “Панэко”, Россия) и 1% смеси пенициллин–стрептомицин (“Панэко”, Россия), и высевали на культуральные флаконы. Через 24 ч прикрепившиеся клетки отмывали физиологическим раствором и полученную культуру клеток поддерживали в ростовой среде (DMEM/F12 с 10% FBS, L-глутамином и антибиотиками) в увлажненной атмосфере при 37 °C, 95% O₂ и 5% CO₂. Смену среды проводили через 3 сут.

Получение МВ из культуры МСК лошади. Использовали методику, опубликованную ранее (Zakirova et al., 2024). При достижении культурой клеток плотности монослоя 90%, отбирали питательную среду, дважды промывали культуру от остатков среды с помощью PBS. Клетки открепляли от культурального пластика при помощи 0.25%-ного раствора трипсина–ЭДТА (“ПанЭко”, Россия), затем

отмывали клетки PBS. Полученную суспензию инкубировали в среде DMEM без сыворотки крови, содержащей 10 мкг/мл цитохалазина В (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Далее осуществляли серию последовательных центрифугирований, отбирая супернатант: 10 мин при 100 g, 20 мин при 100 g и 25 мин при 1400 g. Осадок, содержащий МВ, отмывали большим количеством PBS, центрифугируя 25 мин при 1400 g и использовали далее в работе.

Выделение хондроцитов крысы. Использовали лабораторных белых беспородных крыс (*Rattus albus*). Животных содержали в виварии в клетках со свободным доступом к воде и корму. Для эксперимента отбирали самцов с массой не более 250–300 г и не старше 12 мес. Для выделения клеток хрящевую ткань брали из суставных поверхностей бедренной и большой берцовой кости. Их удаляли хирургическим путем в стерильных условиях. Сразу после удаления костные срезы переносили в стерильный контейнер, заполненный PBS. Далее хрящевую ткань (ее осторожно удаляли с поверхности костных разрезов с помощью лезвия) переносили в чашку Петри, наполненную PBS для предотвращения высыхания ткани. После этого PBS осторожно удаляли пипеткой и чашку Петри немедленно заполняли 10 мл раствора 0.25%-ного раствора трипсин–ЭДТА (“ПанЭко”, Россия). Свежеприготовленные кусочки хряща инкубировали в течение 3 ч при 37 °C и 5% CO₂. После этого к суспензии клеток добавляли 20 мл модифицированной среды Игла (DMEM, “ПанЭко”, Россия). Суспензию переносили в центрифужную пробирку на 50 мл и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Супернатант осторожно сливали, а осадок клеток ресуспендировали в 20 мл DMEM и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Супернатант снова осторожно отбрасывали, а осадок клеток ресуспендировали в 10 мл DMEM, содержащей 100 МЕ/мл пенициллина, 1 мг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин и 5% FBS. Клеточную суспензию переносили в культуральный флакон Т-25 с оставшимися после обработки 0.25%-ным раствором трипсин–ЭДТА кусочками хрящевой ткани. Через 1 нед. культивирования наблюдали выплзание клеток из фрагментов ткани. Среду для культивирования

меняли каждые 3 сут. Клетки культивировали до образования монослоя при 37 °C и 5% CO₂.

Проточная цитометрия выделенных клеток. Принадлежность клеток к клеточному пулу стволовых клеток оценивали иммуноцитохимически, окрашивая их меченными антителами против мембранных маркеров клеток мезенхимного происхождения. Использовали антитела против CD44 (clone IM7; Biolegend, США) и CD90 (№ 1612630; Sony Biotechnology США). Для отрицательного контроля использовали антитела к CD34 (IC0115) (sc-7324; Santa Cruz, США) и CD45 (№ 202205; BioLegend, США). Окрашивание клеток проводили согласно инструкции фирмы-производителя. Результаты анализировали с помощью проточного цитофлюориметра Guava EasyCyte 8HT (Millipore, США). Содержание клеток с маркером выражали в % от общего числа клеток в образце (не менее 100 тыс. клеток на 1 аликвоту).

Для подтверждения биологической активности выделенных клеток проводили дифференцировку в трех направлениях (остеогенном, хондрогенном и адипогенном) по методике, описанной ранее (Закирова и др. 2021). Далее клетки фиксировали и результаты дифференцировки визуализировали с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Выделенные хондроциты окрашивали меченными антителами на наличие мембранных маркеров мезенхимных стволовых клеток. Для этого использовали антитела к: CD90 (clone 5E10; Biolegend, США), CD29 (№ 102218; BioLegend, США), CD44 (clone IM7; Biolegend, США), CD105 (№ 323218; BioLegend, США), STRO1 (№ 340104; BioLegend, США) и специфическим для хрящевой ткани – агреккану (PAB908Ra01; “БелкиАнтитела”, Россия) и коллагену II (ab79013; Abcam, США). В качестве отрицательного контроля клетки окрашивали антителами к CD34 (IC0115) (Santa Cruz, sc-7324, USA), CD117 (MAA121Ra21; “БелкиАнтитела”, Россия) и CD45 (№ 202205; BioLegend, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Результат выражали в % от общего числа клеток в образце (не менее 100 тыс. клеток на 1 аликвоту).

Оценка возможности слияния МВ из МСК лошади и хондроцитов крысы. Для этого использовали мембранные витальные флюоресцентные красители разных цветов.

Цитоплазматическую мембрану клеток лошади окрашивали DiO, а крысы — DiD (V22889 и V22889 соответственно; Life Technologies, США). Ядра хондроцитов окрашивали DAPI (Biotium, США).

Клеточную суспензию отмывали от питательной среды дважды PBS, ресуспендировали в среде без сыворотки из расчета 10^6 кл./мл, добавляли краситель до конечной концентрации 5 мкМ и окрашивали клетки в течение 15 мин в инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После этого клетки промывали, добавляли краситель Dapi и окрашивали еще 15 мин. Далее клетки трижды промывали полной питательной средой. Хондроциты высевали на 96-луночный планшет в концентрации 50 000 кл./лунка. В экспериментальные лунки планшета добавляли МВ, полученные из такого же количества лошадиных МСК, что и хондроциты (соотношение МВ и хондроцитов 1:1). Перед и после добавления МВ окрашенные хондроциты культивировали 24 ч в стандартных условиях. После этого клетки трижды отмывали PBS с целью удаления не слившихся с клетками МВ и визуализировали с помощью лазерной конфокальной микроскопии (микроскоп Zeiss LSM780; Carl Zeiss, Германия). Кроме того, клетки анализировали, используя проточную цитофлуориметрию, для чего клетки трижды отмывали PBS, снимали с культурального планшета с помощью 0.25%-ной смеси трипсина–ЭДТА (“ПанЭко”, Россия), отмывали PBS дважды. Анализ проводили на приборе Guava EasyCyte 8HT (Millipore, США).

Оценка влияния полученных МВ на миграцию хондроцитов. Миграция клеток является событием, ограничивающим скорость заживления при повреждении суставов. Следовательно, изучение факторов, которые влияют на хондроциты может помочь целевым методам лечения для улучшения при ОА. Миграцию оценивали методом царапины. Для этого в 24-луночные культуральные планшеты высевали хондроциты до конечной плотности 100 000 на 1 лунку и культивировали в инкубаторе в течение 24 ч. Затем в 12 лунок добавляли МВ, полученные из МСК лошади (соотношение МВ и хондроцитов 1:1) и культивировали еще 24 ч. Далее клетки отмывали от остатков МВ. Через 48 ч стерильным наконечником

пипетки оставляли царапину шириной приблизительно 0.4–0.5 мм во всех лунках планшета. Проводили смену ростовой среды для удаления открепившихся клеток. С помощью инвертированного микроскопа AxioVision 4.8 (CarlZeiss, Германия) измеряли ширину царапин в лунке. Измерение повторяли каждые 24 ч до полного закрытия царапины монослоем.

Оценка влияния МВ на жизнеспособность хондроцитов крысы. Жизнеспособность определяли с помощью реагента CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) на планшетном анализаторе CERES 900HDi (Bio-Tek Instruments Inc., США), основной фильтр — 490 нм, референс-фильтр — 630 нм. Перед проведением теста хондроциты культивировали с МВ в течение 24 ч, как описано выше. Эксперимент повторяли трижды.

Определение индекса пролиферации (ИП). В лунку 24-луночного планшета засевали клетки по 100 000 на 1 лунку. Далее хондроциты культивировали в течение 24 ч с МВ. Далее среду с МВ удаляли, клетки отмывали в PBS, добавляли свежую среду и культивировали в стандартных условиях 72 ч. Затем клетки снимали с пластика, считали и определяли ИП по отношению числа выросших клеток к посеянным.

3D-модель ОА и оценка влияния МВ. Для исследования влияния МВ на хрящевую ткань при ОА использовали метод трехмерного (3D) моделирования (Wu et al., 2011; Aimaletdinov et al., 2023). Для создания модели ОА с помощью технологии 3D-биопринтинга сначала готовили клеточный материал, который затем печатали с помощью биопринтера. В качестве клеточного материала использовали хондроциты. Для воспроизведения модели применяли провоспалительные цитокины интерлейкин-1β (IL-1β) и фактор некроза опухоли α (TNF-α). Для проведения эксперимента клеточный материал хондроцитов делили на три группы. Первая группа — позитивный контроль (ОА без МВ); к клеткам этой группы добавляли среду DMEM/F12 (“ПанЭко”, Россия), содержащую 10 нг/мл IL-1β и 20 нг/мл TNF-α (RPA563Ra01 и RPA133Ra01 соответственно; “БелекиАнтитела”, Россия). Вторая группа — негативный контроль, только хондроциты без добавления провоспалительных факторов. В третьей группе (ОА с МВ) клетки культи-

вировали в среде, содержащей 10 нг/мл IL-1 β , 20 нг/мл TNF- α , а также МВ (соотношение МВ и хондроцитов 1:1). Концентрация хондроцитов при биопечати составляла 10⁷ кл./мл. Биопечать проводили на экструзионном принтере Cel-link Inkredible (Швеция), для печати использовали гидрогель GelMa (Cellink, Швеция). Биопечать проводили при давлении 28 кПа. Размер напечатанного образца составлял 1.0 × 1.0 × 0.5 см. После печати образцы хрящевой ткани инкубировали 10 мин в физиологическом растворе (PBS; “Панэко”, Россия). Далее его помещали в среду DMEM/F12 и культивировали после биопечати 4 нед.

После окончания культивирования полученные образцы анализировали гистологически и для определения распределения клеток в трехмерных конструкциях образцы окрашивали гематоксилин–эозином. Для этого образцы в течение 1 ч фиксировали в 4%-ном формалине при комнатной температуре, затем окрашивали раствором гематоксилина–эозина (АО “Лен-реактив”, Россия) при комнатной температуре в течение 30 мин. Иммуногистохимически определяли присутствие коллагена II типа. Для этого образцы после фиксации помещали в 0.1%-ный раствор тритона на 1 ч, отмывали 3 раза физиологическим раствором (PBS, “Панэко”, Россия) и окрашивали антителами к коллагену 2 (ab79013; Abcam, США) в разведении, рекомендованном производителем. Присутствие протеогликана во внеклеточном матриксе определяли с помощью окрашивания альциановым синим. Для этого клетки после фиксации в 4%-ном формалине отмывали и окрашивали 30 мин в растворе альцианового синего (1 г сухого красителя в 100 мл 0.1 М соляной кислоты). После этого клетки отмывали в физиологическом растворе (PBS, Панэко, Россия). Для визуализации клеток использовали инвертированный микроскоп AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ. Обработку результатов проводили методами первичного статистического анализа, результаты которых представлены в виде среднего арифметического значения по выборке и его стандартного отклонения. Вторичную статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–

Уитни. Различия считали значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ данных проточной цитометрии показал, что клетки, полученные из хрящевой ткани крысы, экспрессировали маркеры МСК CD29 (87%), CD44 (93%), CD90 (100%), CD105 (96%), STRO-1 (60%), а также специфический маркер агрекан (54%), коллаген I (20%) и коллаген II (60%) (рис. 1). Таким образом, полученные клетки являются хондроцитами.

Клетки, полученные из жировой ткани лошади, были отрицательными по маркерам CD34 (маркер гемопоэтических клеток) и CD45 (лейкоцитарный антиген) и положительными по маркерам CD44 (91%) и CD90 (100%) (маркеры МСК) (рис. 2). Клетки, выделенные из жировой ткани лошади, дифференцировались в адипо-, хондро- и остеогенном направлениях при культивировании в соответствующих дифференцировочных средах (рис. 3). Таким образом, полученные нами данные показывают, что клетки из жировой ткани лошади являются МСК.

Проведенные эксперименты показали, что МВ способны встраиваться в мембраны клеток. Нами выявлено наличие вкраплений МВ, окрашенных флуоресцентным красителем DiO (Life Technologies, США), на поверхности хондроцитов крысы (рис. 4). Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что количество хондроцитов с наличием обоих красителей составлял 38.5%.

Исследование миграционной способности при помощи метода царапин выявило незначительное влияние МВ на миграцию хондроцитов. Значимые изменения наблюдали только через 36 ч после совместного культивирования клеток с МВ. Ширина царапины была меньше, чем в контроле на 24%. А через 48 ч значимых различий между группой контрольной и экспериментальной группой не наблюдали. Через 72 ч после нанесения царапины в обеих группах формировался полный монослой. Результаты измерений представлены в табл. 1.

Тест, проведенный для оценки жизнеспособности клеток показал, что добавление МВ в культуру первичных хондроцитов не влияло на жизнеспособность последних. При

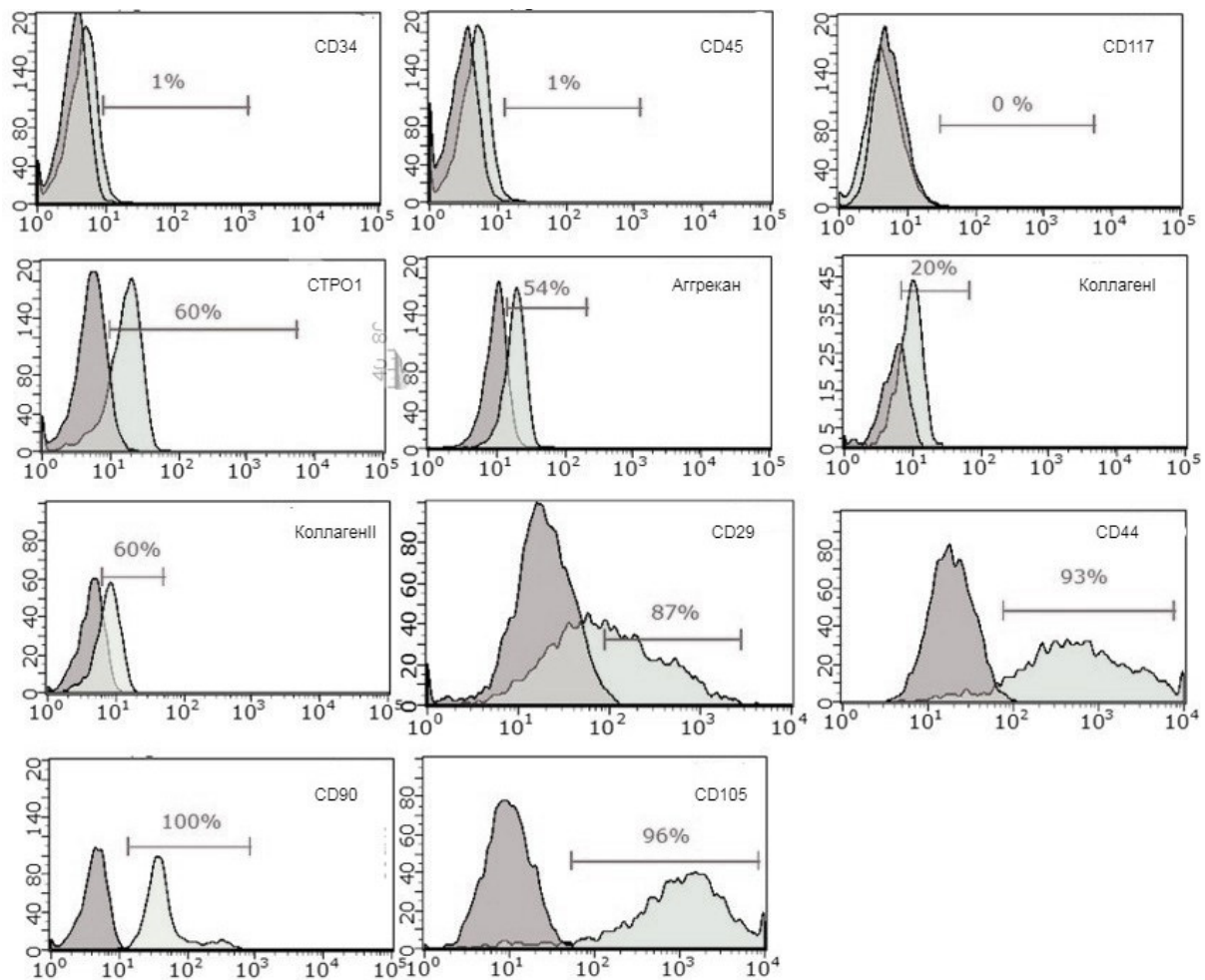


Рис. 1. Гистограммы проточной цитометрии клеток, выделенных из хрящевой ткани крысы с использованием специфических флуоресцентно-меченных антител, демонстрирующие количество клеток, несущих антигены CD34, CD45, CD117, STRO1, агрекан, коллаген I, коллаген II, CD29, CD44, CD90. По горизонтали – интенсивность флуоресценции, по вертикали – число клеток.

Темным цветом выделены гистограммы, соответствующие неокрашенным контрольным клеткам; светлым – гистограммы, соответствующие окрашиванию специфическими АТ, меченными флуоресцентными метками.

Таблица 1. Изменение ширины царапины в течение 72 ч в культуре хондроцитов крысы в контроле и после взаимодействия с МВ

Монослой	Ширина царапины, мкм				
	Контроль	24 ч	36 ч	48 ч	72 ч
Интактный	686.2 ± 9.1	505.1 ± 16.4*	571.6 ± 3 7.0*	483.9 ± 4.3*	0
После добавления МВ	669.8 ± 15.8	461.2 ± 17.1*	434.6 ± 20.2*	407.9 ± 35.2*	0

(*) – Различия контролем достоверны при $P \leq 0.05$ (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

исследовании влияния МВ на пролиферацию хондроцитов было показано, что МВ оказывают незначительное действие на этот показатель. Изменения по отношению к контрольной группе (снижение индекса пролиферации на 18%) наблюдали только через 24 ч после начала эксперимента. Результаты показаны в табл. 2.

Для оценки эффективности МВ при помощи биопринтера была воспроизведена 3D-модель остеоартрита. Результаты 3D-печати представлены на рис. 5. На рисунке показано, что при световой микроскопии хондроциты после биопринтинга были равномерно распределены по всей поверхности и толще напечатанной

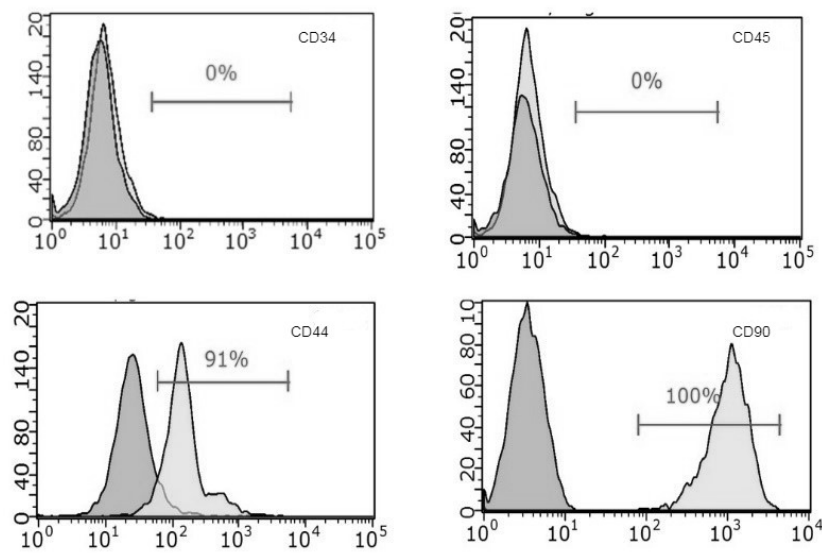


Рис. 2. Гистограммы проточной цитометрии клеток, выделенных из жировой ткани лошади с использованием специфических флуоресцентно-меченных антител, демонстрирующие количество клеток, несущих антигены CD34, CD45, CD44, CD90.

Темным цветом выделены гистограммы, соответствующие неокрашенным контрольным клеткам; светлым — гистограммы, соответствующие окрашиванию специфическими АТ, мечеными флуоресцентными метками.

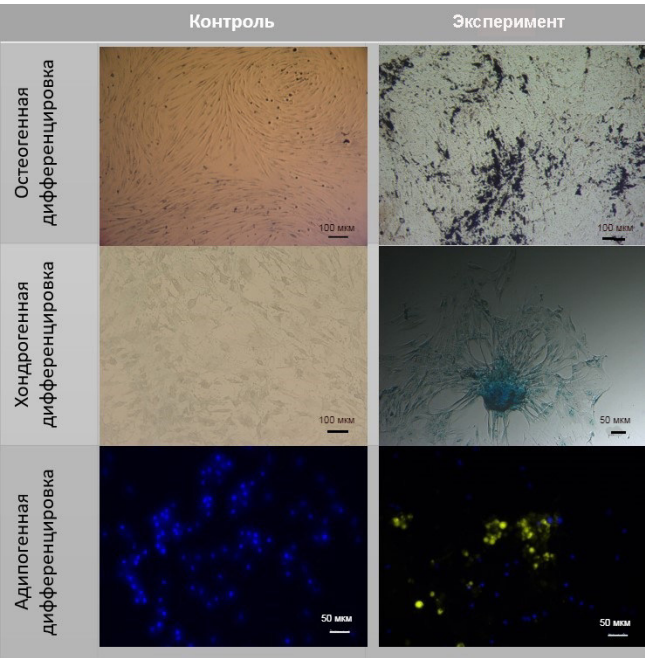


Рис. 3. Визуализация дифференцировки МСК лошади в остеогенном (окраска ализариновым красным), хондрогенном (окраска альциановым синим) и адипогенном (окраска Nile Red) направлении.

модели. То есть напечатанная модель напоминает хрящевую ткань.

Исследованиями установлено, что при 3D-моделировании ОА полученные из МСК лошади внеклеточные везикулы положительно

Таблица 2. Результаты исследования влияния МВ из МСК лошади на индекс пролиферации хондроцитов крысы

Условие	ИП после добавления МВ		
	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	1.65 ± 0.07	2.46 ± 0.03	3.38 ± 0.05
МВ	1.35 ± 0.04*	2.38 ± 0.03	3.4 ± 0.02

(*) — Различие с контролем достоверно при $P \leq 0.05$ (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

влияли на хондроциты. Результаты показаны на рис. 6. Окрашивание гематоксилин-эозином показало, что клеточность в образцах негативного контроля (без добавления МВ и провоспалительных факторов) и в опытных образцах (хондроциты + МВ + провоспалительные факторы) была высокой, хондроциты в гидрогеле располагались равномерно. В образцах позитивного контроля (хондроциты + провоспалительные факторы) количество клеток было заметно меньше. При окрашивании альциановым синим отмечали наиболее интенсивное окрашивание в образцах негативного контроля. В экспериментальных образцах отмечали менее интенсивное окрашивание альциановым синим, в образцах позитивного контроля окрашивание было

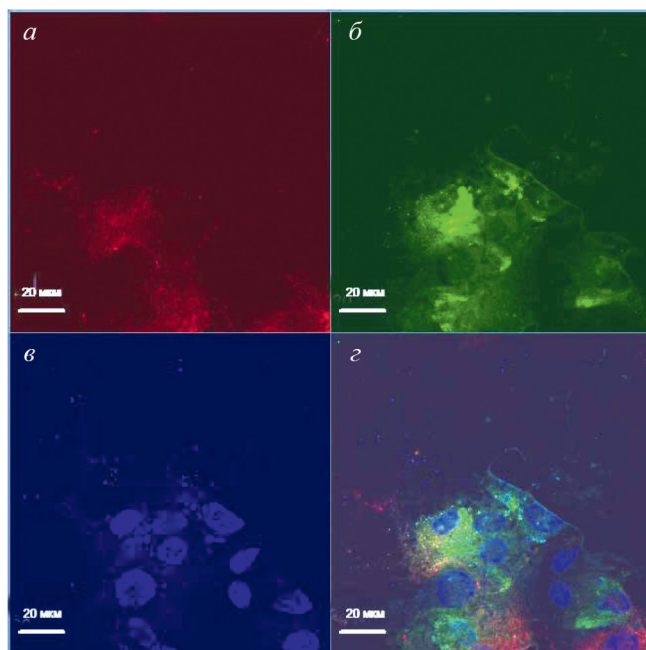


Рис. 4. Слияние МВ, полученных из МСК лошади, с хондроцитами крысы. Цитоплазматическая мембрана МСК окрашена флуоресцентным красителем DiI, а хондроциты крысы — флуоресцентным DiO (оба от Life Technologies, США). Конфокальная микроскопия.

а — МВ, окрашенные DiO; *б* — хондроциты, окрашенные DiI; *в* — ядра хондроцитов, окрашенные DAPI; *г* — совмещение.

очаговым и неравномерным, имелись значительные неокрашенные участки. При окрашивании на коллаген II типа наибольшую интенсивность отмечали в экспериментальных образцах; свечение отмечали и в образцах негативного контроля; в образцах позитивного контроля свечение было слабым и очаговым.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно современным исследованиям, МСК могут нивелировать деградацию хряща при ОА (Chen et al., 2006). В настоящее время принята концепция влияния МСК на ткани организма посредством паракринных механизмов (Murray, Réault, 2015). В ряде исследований показано, что существенную роль в репарации ОА при применении МСК играют цитокины и молекулы, которые они выделяют. Внеклеточные везикулы, продуцируемые стволовыми клетками, содержат мРНК, микроРНК и другие биоактивные вещества (Zhuang et al., 2022; Тамбовский и др.,

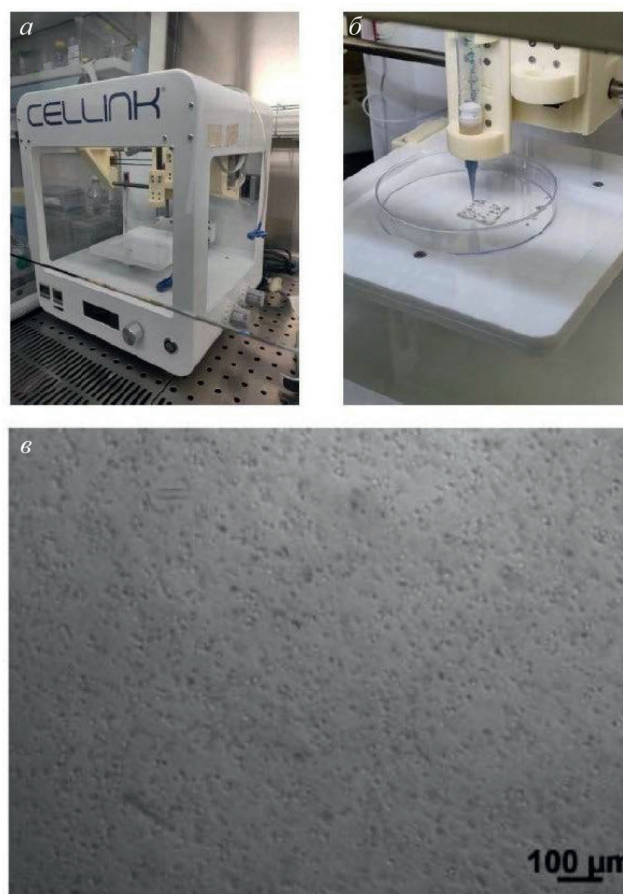


Рис. 5. Напечатанная на биопринтере Cellink 3D-модель хрящевой ткани.

а — Экструзионный принтер Cellink Inkredible (Швеция); *б* — процесс биопечати; *в* — образец хондроцитов, напечатанный на биопринтере, световая микроскопия.

2023). Однако многие исследователи отмечают, что МСК во время длительного культивирования теряют свой дифференцировочный потенциал и подвергаются различным морфологическим изменениям, в том числе и злокачественной трансформации (Bonab et al., 2006; Røslund et al., 2009).

Новым подходом в терапии стволовыми клетками является использование МВ, которыми можно заменить МСК. МВ, полученные из МСК, наследуют ценные характеристики МСК, из которых были получены. В отличие от клеток, МВ не вызывают острого иммунного отторжения, их можно производить в больших количествах (La Greca et al., 2018). В настоящее время МВ используют для терапии как в медицине, так и в ветеринарной практике (Zakirova et al., 2022).

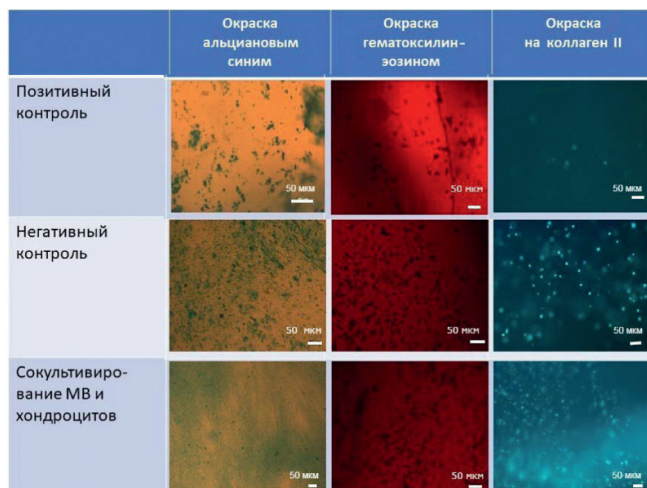


Рис. 6. Визуализация влияния МВ на 3D-модели ОА. Окрашивание показывает: альциановым синим — выработку гликозаминогликанов, гематоксилином и эозином — клеточность напечатанных образцов, на наличие коллагена II — функциональность хондроцитов.

В настоящей работе для моделирования ОА *in vitro* из хряща бедренной кости крысы были выделены хондроциты, экспрессирующие агрекан (54%), коллаген типов II (60%) и I (20%), которые являются специфичными маркерами этих клеток. Агрекан — высокомолекулярный протеогликан, который играет решающую роль в структуре хряща. Он наделяет суставной хрящ способностью выдерживать нагрузки (Wu et al., 2018). Коллаген — это наиболее распространенный белок внеклеточного матрикса, принадлежит к семейству волокнистых белков, которые переносят нагрузку в тканях и обеспечивают высоко биосовместимую среду для клеток (Meyer, 2019). Для хрящевой ткани наибольшее значение имеет коллаген II, на долю которого приходится 95% коллагенов в хрящевой ткани (Lumi et al., 2015). В суставном хряще иногда можно обнаружить и коллаген I типа. Его количество увеличивается, как правило, при длительной культивации хондроцитов (Wu et al., 2014). Выделенные нами из хрящевой ткани клетки имеют на своей поверхности маркеры МСК (рис. 1), по-видимому, по причине общего их предшественника (Kaufman, Tobias, 2003). Клетки, выделенные нами из жировой ткани лошади, являлись МСК, что подтверждают результаты цитометрии (рис. 2) и дифференцировки (рис. 3).

Совместное культивирование хондроцитов крысы с МВ из МСК лошади не влияло на жизнеспособность и на миграционные свойства хондроцитов. Ранее нами на примере МВ из МСК лошади и теноцитов крысы было показано их влияние на жизнеспособность и на миграционные свойства клеток. Также в этой же работе показаны слияние мембран клеток и МВ (Zakirova et al., 2024).

3D-моделирование ОА показало, что при индукции ОА везикулы, полученные из МСК, оказывают положительное влияние на напечатанные хондроциты. Эффективность МВ оценивали при помощи различных методов окрашивания. Для оценки клеточности, а также их морфологического строения были использованы гематоксилин и эозин. Для этих же целей этот метод применяли и другие исследователи, которые доказали, что хондроциты в напечатанном образце морфологически соответствовали клеткам хрящевой ткани (например, Galuzzi et al., 2018). В качестве доказательства того, что клетки в 3D-образце являются хондроцитами, их окрашивали на коллаген II типа. Этот маркер специфичен для хондроцитов и используется для оценки функциональности хондроцитов (Galuzzi et al., 2018). В образцах с моделированием ОА и добавлением МВ хондроциты интенсивнее синтезировали коллаген II по сравнению с группой позитивного контроля. Для оценки выработки гликозаминогликанов часто проводят окрашивание напечатанных хондроцитов альциановым синим (Kesti et al., 2015). При окрашивании отмечали наиболее интенсивное окрашивание в образцах негативного контроля. В экспериментальных образцах отмечали менее интенсивное окрашивание альциановым синим, в образцах позитивного контроля окрашивание было очаговым и неравномерным, что указывает на положительное действие МВ на хондроциты при моделировании ОА.

В совокупности проведенные эксперименты показали, что для лечения ОА и восстановления хряща можно использовать не только МСК, но и полученные на их основе МВ. Предлагаемый метод терапии является более безопасным аналогом клеточной терапии и позволяет преодолеть в значительной степени ограничения современных методов клеточной терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-26-00158).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с лабораторными животными проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>) и были одобрены экспертным комитетом по биомедицинской этике Казанского федерального университета (протокол № 3 от 5 мая 2015 г.; Казань, Россия).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Закирова Е.Ю., Аймалетдинов А.М., Тамбовский М.А., Ризванов А.А. 2021. Сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток различных видов животных. Цитология. Т. 63. № 2. С.139. (E.Yu. Zakirova, A.M. Aimaletdinov, M.A. Tambovsky, A.A. Rizvanov. 2021. Comparative characteristics of mesenchymal stem cell lines from different animal species. Tsitologiya. V. 63. No. 2. P. 139).
- Тамбовский М. А., Аймалетдинов А.М., Закирова Е.Ю. 2023. Современные тенденции применения стволовых клеток и их производных при криоконсервации спермы животных. Биол. мембраны. Т. 40. № 5. С. 328. (M. A. Tambovsky, A. M. Aimaletdinov, E. Yu. Zakirova. 2023. Current trends in the application of stem cells and their derivatives in animal sperm cryopreservation. Biochem. Moscow Suppl. Ser. A. V. 17. P. 243.) <https://doi.org/10.31857/S0233475523050110>
- Aimaletdinov A.M. Iuferova A.K., Zakirova. E.Yu. 2023. Isolation and cultivation of sterlet myoblasts. Opera Medica Physiologica. V. 3. P. 167. <https://doi.org/10.24412/2500-2295-2023-3-167-173>
- Atala A. 2004. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. Rejuvenation Res. V. 7. №1. P.15. <https://doi.org/10.1089/154916804323105053>
- Bertoni L., Jacquet-Guibon S., Branly T., Legendre F., Desancé M., Mespoulhes C., Melin M., Hartmann D.J., Schmutz A., Denoix J.M., Galéra P., Demoor M., Audigé F. 2020. An experimentally induced osteoarthritis model in horses performed on both metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints: technical, clinical, imaging, biochemical, macroscopic and microscopic characterization. PLoS One. V. 15: e0235251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235251>
- Bhattacharjee M., Escobar Ivirico J.L., Kan H.M., Shah S., Otsuka T., Bordett R., Barajaa M., Nagiah N., Pandey R., Nair L.S., Laurencin C.T. 2022. Injectable amnion hydrogel-mediated delivery of adipose-derived stem cells for osteoarthritis treatment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 119: e2120968119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2120968119>
- Bonab M.M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari S.H., Ghavamzadeh A., Nikbin B. 2006. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell Biol. V. 7. P. 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-14>
- Chen F.H., Rousche K.T., Tuan R.S. 2006. Technology insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. Nat. Clin. Pract. Rheumatol. V. 2. P. 373. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0216>
- Galuzzi M., Perteghella S., Antonioli B., Tosca M.C., Bari E., Tripodo G., Sorrenti M., Catenacci L., Mastracci L., Grillo F., Marazzi M., Torre M.L. 2018. Human engineered cartilage and decellularized matrix as an alternative to animal osteoarthritis model. Polymers (Basel). V. 10. Art. ID 738. <https://doi.org/10.3390/polym10070738>
- Goodrich L.R., Nixon A.J. 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – a review. Vet. J. V. 171. P. 51. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.07.008>
- Kaufman M.R., Tobias G.W. 2003. Engineering cartilage growth and development. Clin. Plast. Surg. V. 30. P. 539. [https://doi.org/10.1016/s0094-1298\(03\)00071-3](https://doi.org/10.1016/s0094-1298(03)00071-3)
- Kesti M., Eberhardt C., Pagliccia G., Kenkel D., Grande D., Boss A., Zenobi-Wond M. 2015. Bioprinting complex cartilaginous structures with clinically compliant biomaterials. Advanced Functional Materials. V. 25. P. 7406. <https://doi.org/10.1002/adfm.201503423>
- Kriston-Pál É., Haracska L., Cooper P., Kiss-Tóth E., Szukacsov V., Monostori É. 2020. A regenerative approach to canine osteoarthritis using allogeneic, adipose-derived mesenchymal stem cells. safety results of a long-term follow-up. Front. Vet. Sci. V. 7: P. 510. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00510>
- La Greca A., Solari C., Furmento V., Lombardi A., Biani M.C., Aban C., Moro L., García M., Guberman A.S., Sevelever G.E., Miriuka S.G., Luzzani C. 2018. Extracellular vesicles from pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells acquire a stromal modulatory proteomic pattern during differentiation. Exp. Mol. Med. V. 50. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0142-x>

- Lee M.J., Kim J., Kim M.Y., Bae Y.S., Ryu S.H., Lee T.G., Kim J.H. 2010. Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha-induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Proteome Res.* V. 9. P. 1754.
<https://doi.org/10.1021/pr900898n>
- Li J.J., Hosseini-Beheshti E., Grau G.E., Zreiqat H., Little C.B. 2019. Stem cell-derived extracellular vesicles for treating joint injury and osteoarthritis. *nanomaterials (Basel)*. V. 9. Art. ID 261.
<https://doi.org/10.3390/nano9020261>
- Lories R.J., Luyten F.P. 2012. Osteoarthritis, a disease bridging development and regeneration. *Bonekey Rep.* V. 1. Art. ID 136.
<https://doi.org/10.1038/bonekey.2012.136>
- Lumi X., Hawlina M., Glavač D., Facskó A., Moe M.C., Kaarniranta K., Petrovski G. 2015. Ageing of the vitreous: from acute onset floaters and flashes to retinal detachment. *Ageing Res. Rev.* V. P. 71.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.03.006>
- Mahajan A., Verma S., Tandon V. 2005. Osteoarthritis. *J. Assoc. Physicians India*. V. 53. P. 634.
- Meyer M. 2019. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomed. Eng. Online*. V. 18. Art. ID 24.
<https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>
- Murray I.R., Péault B. 2015. Q&A: Mesenchymal stem cells – where do they come from and is it important? *BMC Biol.* V. 13. Art. ID 99.
<https://doi.org/10.1186/s12915-015-0212-7>
- Phinney D.G., Hill K., Michelson C., DuTreil M., Hughes C., Humphries S., Wilkinson R., Baddoo M., Bayly E. 2006. Biological activities encoded by the murine mesenchymal stem cell transcriptome provide a basis for their developmental potential and broad therapeutic efficacy. *Stem Cells*. V. 24. P. 186.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0236>
- Revenaugh M.S. 2005. Extracorporeal shock wave therapy for treatment of osteoarthritis in the horse: clinical applications. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* V. 21. P. 609.
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2005.09.001>
- Rosland G.V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E., Immervoll H., Mysliwicz J., Tonn J.C., Goldbrunner R., Lønning P.E., Bjerkvig R., Schichor C. 2009. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* V. 69. P. 5331.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4630>
- Rychel J.K. 2010. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Top Companion Anim. Med.* V.25. P.20.
<https://doi.org/10.1053/j.tcam.2009.10.005>
- Taruc-Uy R.L., Lynch S.A. 2013. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Prim. Care*. V. 40. P. 821.
<https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.08.003>
- Thomas A.C., Hubbard-Turner T., Wikstrom E.A., Palmieri-Smith R.M. 2017. Epidemiology of posttraumatic osteoarthritis. *J. Athl. Train.* V.52. P. 491.
<https://doi.org/10.4085/1062-6050-51.5.08>
- Wang J., Liao L., Wang S., Tan J. 2013. Cell therapy with autologous mesenchymal stem cells-how the disease process impacts clinical considerations. *Cytotherapy*. V. 15. P. 893.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.01.218>
- Weinstein A.M., Rome B.N., Reichmann W.M., Collins J.E., Burbine S.A., Thornhill T.S., Wright J., Katz J.N., Losina E. 2013. Estimating the burden of total knee replacement in the United States. *J. Bone Joint Surg. Am.* V. 95. P. 385.
<https://doi.org/10.2106/JBJS.L.00206>
- Wu C.C., Chen W.H., Zao B., Lai P.L., Lin T.C., Lo H.Y., Shieh Y.H., Wu C.H., Deng W.P. 2011. Regenerative potentials of platelet-rich plasma enhanced by collagen in retrieving pro-inflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis. *Biomaterials*. V. 32. Art. ID 5847.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.002>
- Wu L., Petrigliano F.A., Ba K., Lee S., Bogdanov J., McAllister D.R., Adams J.S., Rosenthal A.K., Van Handel B., Crooks G.M., Lin Y., Evseenko D. 2014. Lysophosphatidic acid mediates fibrosis in injured joints by regulating collagen type I biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*. V. 23. P. 308.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.11.012>
- Wu T.J., Fong Y.C., Lin C.Y., Huang Y.L., Tang C.H. 2018. Glucose enhances aggrecan expression in chondrocytes via the PKC α /p38-miR141-3p signaling pathway. *J. Cell Physiol.* V. 233. P. 6878.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26451>
- Wu X., Wang Y., Xiao Y., Crawford R., Mao X., Prasad I. 2019. Extracellular vesicles: potential role in osteoarthritis regenerative medicine. *J. Orthop. Translat.* V. 21. P. 73.
<https://doi.org/10.1016/j.jot.2019.10.012>
- Zakirova E., Aimaltdinov A., Mansurova M., Titova A., Kurilov I., Rutland C.S., Malanyeva A., Rizvanov A. 2024. Artificial microvesicles: new perspective on healing tendon wounds. *Cells Tiss. Organs*. V. 213. P. 24.
<https://doi.org/10.1159/000526845>
- Zakirova E., Valeeva A., Sofronova S., Tambovsky M., Rutland C., Rizvanov A., Gomzikova M. 2022. Application of mesenchymal stem cells derived artificial microvesicles for the treatment of canine skin wound. *BioNanoSci.* V. 12. P. 83.
<https://doi.org/10.1007/s12668-021-00928-0>
- Zhuang Y., Jiang S., Yuan C., Lin K. 2022. The potential therapeutic role of extracellular vesicles in osteoarthritis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 10: 1022368.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1022368>

MICROVESICLES FROM MESENCHYMAL STEM CELLS FOR CARTILAGE TISSUE REGENERATION IN EQUINE OSTEOARTHRITIS

M. Aimaletdinov^{a, *}, A. G. Malanyeva^a, M. A. Tambovsky^a, E. Y. Zakirova^a

^a *Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan, 420008, Russia*

** E-mail: aimaletdinowam@gmail.com*

Current treatment strategies for osteoarthritis primarily focus on symptom management. Currently, the use of cell therapy methods, including mesenchymal stem cells (MSCs), is practiced in medicine and veterinary medicine. Microvesicles (MVs) obtained from MSCs are also currently used for the purpose of regeneration. The purpose of this study was to investigate the potential effects of artificial MVs on rat chondrocytes. In vitro experiments showed that MVs obtained from MSCs had a positive effect on the viability and migration ability of the chondrocyte cell culture. In 3D modeling of OA in vitro, MVs neutralized the effect of pro-inflammatory factors IL-1b and TNF- α . Most likely, these effects were due to the direct penetration of MVs contents into chondrocytes, since The possibility of fusion of MVs membranes with chondrocyte membranes was experimentally demonstrated. Thus, we have shown the positive effect of MVs on an in vitro model of OA.

Keywords: mesenchymal stem cells, horse, chondrocytes, cartilage tissue, rat, microvesicles, osteoarthritis

УДК 577.353.2

КАТЕХИН ЗЕЛЕНОГО ЧАЯ EGCG СПОСОБЕН ЧАСТИЧНО ВОССТАНАВЛИВАТЬ РЕГУЛЯЦИЮ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ ТРОПОНИН-ТРОПОМИОЗИНОВЫМ КОМПЛЕКСОМ, НАРУШЕННУЮ ЗАМЕНОЙ GLU150ALA В ГАММА-ТРОПОМИОЗИНЕ

© 2024 г. М. В. Тишкова^{1, *}, О. Е. Карпичева^{1, 2}, Ю. С. Боровиков¹, С. В. Аврова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

²Бостонский университет, Бостон, 02118, США

* E-mail: mariiatiskova@gmail.com

Поступила в редакцию 11.07.2024

После доработки 31.07.2024

Принята к публикации 10.08.2024

Идентифицировано множество точечных мутаций в генах сократительных и регуляторных белков скелетных мышц, способных приводить к дисфункции мышечной ткани. Молекулярные механизмы мышечного сокращения в присутствии мутантных мышечных белков в саркомере остаются мало изученными. В представленной работе было исследовано влияние аминокислотной замены остатка глутамата на остаток аланина в позиции 150 (Glu150Ala) γ -тропомииозина, ассоциированной с кэп-миопатией и диспропорцией мышечных волокон человека, на молекулярные механизмы регуляции мышечного сокращения тропонин-тропомииозиновым комплексом в одиночном мышечном волокне. Считается, что остаток Glu150 тропомииозина не принимает непосредственного участия во взаимодействии тропомииозина с актином и миозином; однако, согласно структурным моделям тонких филаментов в условиях низкого уровня Ca^{2+} , этот остаток расположен вблизи участка связывания с С-концевым доменом тропонина I. Для оценки работы миозиновых головок в присутствии Glu150Ala-мутантного тропомииозина мы измерили поляризованную флуоресценцию зонда 1,5-IAEDANS, связанного с SH1-спиралью головки миозина. Полученные данные показали аномальное увеличение числа сильно связанных с актином головок миозина при расслаблении мышечного волокна, содержащего Glu150Ala-мутантный тропомииозин. Оказалось, что катехин зеленого чая EGCG, известный как модулятор функции тропонина, ингибирует преждевременный переход миозиновых головок в сильную форму связывания и таким способом ослабляет повреждающее влияние замены GluAla в γ -тропомииозине. Однако EGCG полностью не восстанавливает эффективное прохождение АТФазного цикла миозиновыми поперечными мостиками.

Ключевые слова: регуляция, мышечное сокращение, АТФазный цикл, мутации тропомииозина, врожденные миопатии, конформационные изменения, Ca^{2+} -чувствительность; галлат эпигаллотекатехина

Принятые сокращения: ПЦР — полимеразная цепная реакция; 1,5-IAEDANS — N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)-этилендиамин; EGCG — галлат эпигаллотекатехина; F-актин — фибриллярный актин; S1 — субфрагмент-1 миозина; WT — дикий тип.

DOI: 10.31857/S0041377124050058, **EDN:** DUSZTJ

Наследственные миопатии — это гетерогенная группа наследственных заболеваний скелетных мышц, которая включает немалиновую миопатию, кэп-миопатию, миопатию с зебра-тельцами и стержневую миопатию (North et al., 2014). Характерным свойством этих патологий является генерализованная слабость скелетных мышц различной степени выраженности, начиная от слабой степени вплоть до слабости, представляющей угрозу для жизни,

часто проявляющейся в раннем детском возрасте (Sewry et al., 2017). Морфологические изменения, обнаруживаемые в скелетной мышечной ткани пациента, обычно дают название варианту наследственной миопатии. Например, кэп-структуры при кэп-миопатии представляют собой хорошо видимые в мышечных волокнах периферические структуры, распределение и размер которых зависит от тяжести заболевания (Malfatti et

al., 2014; Sewry et al., 2017). Электронная микроскопия показала, что кэп-структуры образованы дезорганизованными тонкими филаментами и белками Z-линий — α -актином, актином, тропомиозином, небулином, десмином, миотилином, титином, тропонином T и SERCA2. Гипотрофия медленных скелетных мышечных волокон и их преобладание вместе с компенсаторной гипертрофией быстрых скелетных мышечных волокон является одним из общих морфологических изменений скелетной мышечной ткани при наследственных миопатиях, хотя процентное соотношение размеров волокон разного типа может значительно различаться (Clarke et al., 2011). При выраженной разнице размеров в отсутствие гистологически обнаруживаемых включений ставится диагноз врожденной диспропорции типов мышечных волокон (CFTD), который может быть впоследствии изменен на другой диагноз при обнаружении кэп-структур, немалиновых телец или других клеточных включений. Механизмы формирования патологических клеточных структур остаются не исследованными.

Для наследственных миопатий описаны доминантные и рецессивные мутации по крайней мере в 12 генах. Во многих случаях наследственные миопатии можно рассматривать как заболевания тонких филаментов, поскольку мутации вызывают нарушение структуры и функции белков тонких филаментов, снижают стабильность тонких филаментов и сродство актин-связывающих белков к актину, а также вызывают дезорганизацию компартментов мышечных волокон и агрегацию белков (Martilla et al., 2012).

Хорошо известно, что сокращение мышцы обеспечивается циклическим связыванием миозиновых головок с актином и их отсоединением, и основная регуляция этого взаимодействия осуществляется расположенным на актине тропонин-тропомиозиновым комплексом Ca^{2+} -зависимым образом (Gordon et al., 2000). Увеличение концентрации саркоплазматического Ca^{2+} при нервно-мышечной активации вызывает конформационные перестройки тропонинового комплекса, состоящего из трех субъединиц, что приводит к смещению тропомиозиновых тяжей на актине. Поскольку тропомиозин

взаимодействует с актином за счет электростатических связей (Lorenz et al., 1995), легко представить, что он изменяет свое расположение относительно сайтов связывания миозиновой головки с актином, стерически закрывая или открывая к ним доступ для миозина. Кроме того, сам актин испытывает конформационные перестройки (Oosawa et al., 1972; Popp et al., 1991) и изменения пространственной организации миозин-связывающего сайта (Borovikov, 1999) и помогает регуляторному комплексу ингибировать или активировать сильное связывание миозина с актином. Область взаимодействия миозина с актином занимает большую площадь и испытывает значительные перестройки в обоих белках; в том числе происходит захлопывание актин-связывающей щели (Llinas et al., 2015). Связывание молекулы АТФ в активном центре головки миозина, сильно связанной с актином, приводит к отсоединению миозина от актина и повторению АТФазного цикла. С понижением концентрации Ca^{2+} тонкие филаменты переходят обратно в состояние, при котором сильное связывание миозина с актином затруднительно (Lehman, Rynkiewicz, 2023).

Имеющиеся данные о конформационных перестройках актина позволяют предполагать, что актин может находиться, по крайней мере, в двух конформационных состояниях — выключенном и включенном, в зависимости от его способности активировать АТФазную активность миозина. При низкой концентрации Ca^{2+} актин находится в выключенной конформации (Borovikov, 1999; Borovikov et al., 2018); тропомиозиновые тяжи на актиновых филаментах смещены ближе к их периферии, а взаимодействие актина с миозином слабое. В этом случае тонкий филамент находится в блокирующем функциональном состоянии (Lehman, Rynkiewicz, 2023). При высокой концентрации Ca^{2+} тропомиозиновые тяжи смещаются ближе к центру актинового филамента; актин переходит во включенное конформационное состояние, и весь тонкий филамент принимает сначала закрытое, а потом открытое функциональное состояние (Vibert et al., 1997; Gordon et al., 2000). В соответствии с функциональным состоянием тонких филаментов различают три позиции

тропомиозина — блокирующую, закрытую и открытую.

Модуляторы функции миозина и тропонина, способные влиять на АТФазную активность миозина и Ca^{2+} -чувствительность мышечного волокна, могут рассматриваться в качестве фармакологических агентов для лечения первичных причин заболеваний скелетной мускулатуры (Claasen et al., 2023). Для использования этих модуляторов необходимо выяснить механизмы нарушения мышечного сокращения вследствие мутаций в генах мышечных белков. При нарушении расслабления в мышечном волокне может остаться аномальное количество миозиновых поперечных мостиков, образующих с актином сильную форму связывания. Такие мостики не способны эффективно проходить АТФазный цикл. При недостаточной активации поперечных мостиков их способность формировать сильную форму связывания, напротив, снижается. В норме же тропонин и тропомиозин определяют возможность миозина сильно связываться с актином при прохождении АТФазного цикла. Тропонин является непосредственным сенсором Ca^{2+} , а тропомиозин обеспечивает доступ миозиновых головок к актину согласно Ca^{2+} -сигналу и высокую кооперативность активации мышечного сокращения и релаксации (Moore et al., 2016).

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния аминокислотной замены Glu150Ala в γ -изоформе тропомиозина медленных скелетных мышц Tpm3.12, связанной с кэп-миопатией и CFTD, на механизмы взаимодействия мышечных белков, а также поиск путей восстановления сократительной функции мышечной ткани. Данная аминокислотная замена происходит в *c*-положении гептапептидного повтора, что указывает на ее расположение на наружной поверхности молекулы (Moraczewska, 2020). Предполагается, что остатки 150–180 тропомиозина играют ключевую роль в запуске конформационных изменений, необходимых для полной активации актинового филамента (Sakuma et al., 2006). Аминокислотная замена Glu150Ala как в одной, так и в обеих цепях тропомиозина (Borovikov et al., 2018; Matyushenko et al., 2020), может приводить к развитию гипертрофического фенотипа (Marston et al., 2013). Мы предположили, что аномальная

активация тонких филаментов в присутствии замены Glu150Ala может быть потенциальной терапевтической мишенью и оценили возможность восстановления сократительной функции с использованием ингибитора тропонина — биологически активного вещества галлата эпигаллоткатехина (EGCG).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Использованные реактивы: N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)-этилендиамин (1,5-IAEDANS; Molecular Probes, Орегон, США); α -химотрипсин, АТФ, АДФ, ЭДТА (Sigma–Aldrich, Миссури, США); EGCG (Merck, Дармштадт, Германия).

Выделение и очистка белков. С использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) была наработана кДНК человека, несущая ген *TPM3*, кодирующий изоформу тропомиозина медленных скелетных мышц Tpm3.12 (UniProtcode: P06753). Отсутствие ацетилирования и как следствие сниженное сродство рекомбинантного тропомиозина к актину компенсировали включением N-концевой вставки, кодирующей дополнительную последовательность аминокислот Met–Ala–Ser. Полученной конструкцией трансформировали клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Массачусетс, США). Для внесения точечных мутаций в последовательность гена тропомиозина использовали метод направленного мутагенеза, основанный на двухстадийной ПЦР. Рекомбинантный белок очищали с помощью анионообменной хроматографии.

Миозин и тропонин выделяли из медленных скелетных мышц (Spudich, Watt, 1971; Margossian, Lowey, 1982; Potter, 1982). Исследования с применением животных проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Головки миозина (субфрагмент-1 миозина или S1) получали расщеплением миозина α -химотрипсином при 25 °С в течение 20 мин (Okamoto, Sekine, 1985). Специфическую модификацию S1 осуществляли с использованием флуоресцентного зонда 1,5-IAEDANS (Borejdo, Putnam, 1977; Borovikov et al., 2009). Концентрацию красителя подбирали таким образом, чтобы соотношение красителя и белка состав-

ляло не более 1:1 для предотвращения неспецифической модификации других цистеиновых остатков миозина.

Подготовка модельных мышечных волокон. Изучение конформационных перестроек миозина проводили на «теневого» волокнах, выделенных из *m. psoas* кролика с реконструированными регуляторной и сократительной системами (Borovikov, Gusev, 1983; Borovikov et al., 2017). Теневые волокна на 80–90% состояли из фибриллярного актина, на 100% идентичного актину скелетной мускулатуры человека. Реконструкцию регуляторной системы осуществляли с использованием рекомбинантного тропомиозина и тропонина из медленной скелетной мускулатуры кролика. Сократительный аппарат восстанавливали с использованием S1, способного проникать через мембрану теневого волокна и изменять свою конформацию при связывании нуклеотидов и аналогов АТФ (Borovikov et al., 2009). Инкубация мышечных волокон в растворе, содержащем S1 в концентрации 2.2 мг/мл на протяжении двух часов приводила к связыванию S1 с актином в молярном соотношении 1:2.8 (± 0.4) в отсутствие тропомиозина и 1:4.2 (± 0.3) в присутствии тропомиозина.

Включение мутантного тропомиозина в тонкие филаменты отслеживали с помощью флуоресцентной метки 5-IAF и конфокального микроскопа Olympus FLUOVIEW FV3000 (Karpicheva et al., 2016).

Белковый состав мышечных волокон контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле с использованием камеры Mini-PROTEAN® Tetra (BioRad, Калифорния, США) с последующим анализом гелей в системе гель-документирования ChemiDocMP (BioRad, Калифорния, США) и в программе ImageLab (версия 6.0.0).

Поляризационная микрофлуориметрия. Поляризационную флуоресценцию зонда 1,5-IAEDANS, связанного с 707 остатком цистеина в SH1-спирали S1, измеряли в стационарных экспериментах в теневых волокнах с использованием проточной камеры с помощью поляризационного микрофлуориметра (Borovikov et al., 2004). Для возбуждения флуоресценции 1,5-IAEDANS использовали длину волны 407 ± 5 нм; регистрацию осуществляли в диапазоне 500–600 нм, измеряя 4 компонента интенсивно-

сти поляризованной флуоресценции: $I_{||}$, $I_{\perp}$, I_{45} и I_{135} . Индексы $||$ (параллельно) и $\perp$ (перпендикулярно) обозначают направление поляризации относительно оси мышечного волокна. Первый индекс указывает на направление поляризации падающего света, второй — на направление поляризации излучаемого света. Во всех экспериментах величина фоновой флуоресценции, полученная для теневых волокон, была на 2–3 порядка ниже интенсивности флуоресценции мышечных волокон, содержащих S1-AEDANS; при обработке полученных данных эти значения учитывались.

Анализ экспериментальных данных осуществляли модель-зависимым методом (Yanagida, Oosawa, 1978; Kakol et al., 1987; Borovikov et al., 2004), согласно которому в мышечном волокне существует две популяции флуорофоров: упорядоченные флуорофоры (в количестве $1-N$), осцилляторы поглощения и излучения которых расположены под углами Φ_A и Φ_E относительно оси мышечного волокна соответственно, и хаотически расположенные флуорофоры в количестве N , число которых отражает подвижность миозиновой головки. Подвижность флуоресцентной метки в головке миозина оценивали величиной угла γ между диполями поглощения и излучения зонда (Borovikov et al., 2004).

Измерения флуоресценции проводили в отсутствие нуклеотидов, в присутствии 3 мМ Mg-АДФ и 5 мМ Mg-АТФ для моделирования стадий цикла гидролиза АТФ: AM, $AM^* \cdot ADP$ и $AM^* \cdot ATP$ соответственно, где A — актин, M^* и M^* — разные конформационные состояния миозина.

С помощью модель-зависимого метода определяли следующие параметры поляризованной флуоресценции: ориентацию диполей излучения флуоресцентной метки (Φ_E) и число дезориентированных флуорофоров (N) (Borejdo, Putnam, 1977; Roopnarine, Thomas, 1996). С помощью этих параметров оценивали изменения характера связывания головок миозина с актином, в частности относительное количество поперечных мостиков, сильно связанных с F-актином, и их подвижность (Borovikov et al., 2009).

Для моделирования функциональных состояний тонких филаментов мышечное волокно инкубировали в ряде растворов, содержащих 5 мМ ЭГТА для связывания свободных ионов кальция или 5 мМ ЭГТА и 4.5 мМ $CaCl_2$ для

моделирования повышения концентрации Ca^{2+} до 10^{-5} М, что соответствует физиологическим показателям при активации сокращения. Эффект модулятора функции тропонина оценивали путем добавления к волокну 30 мкМ EGCG. Для каждого конформационного состояния было проведено 20–25 измерений в 4–5 теневых волокнах. Статистическую значимость изменений в экспериментах оценивали попарно (в присутствии мутантного тропомиозина и тропомиозина дикого типа; в отсутствие и в присутствии EGCG) с использованием *t*-критерия Стьюдента; различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевые особенности подхода, позволяющего получать данные о конформационных перестройках миозина в одиночном мышечном волокне. Данные о конформационных перестройках головок миозина, меченных флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS, получали непосредственно в мышечном волокне при моделировании разных функциональных состояний тонких филаментов и стадий АТФазного цикла. Замена Glu150Ala в тропомиозине не препятствовала включению белка в состав тонких филаментов (рис. 1). Следовательно, мутантный тропомиозин может действовать в тонких филаментах как токсичный белок и изменять механизмы регуляции актин-миозинового взаимодействия. Как показало высокоскоростное соосаждение тропомиозина с F-актином, замена Glu150Ala не снижает сродства тропомиозина к актину (Matyushenko et al., 2020).

Ранее было показано, что модификация S1 флуоресцентной меткой существенно не влияет на сродство миозина к актину (Borovikov et al., 2015). Встраивание S1 в мышечное волокно вызывало появление поляризованной флуоресценции. Модельные мышечные волокна считали полностью функциональными, если параметры поляризованной флуоресценции S1-AEDANS изменялись при изменении концентрации Ca^{2+} и при добавлении АДФ и АТФ. Это означало, что мышечные белки сохраняли способность к конформационным перестройкам, которые лежат в основе генерации силы. При низкой концентрации Ca^{2+} и при добавлении АТФ моделировали состояние деактивации

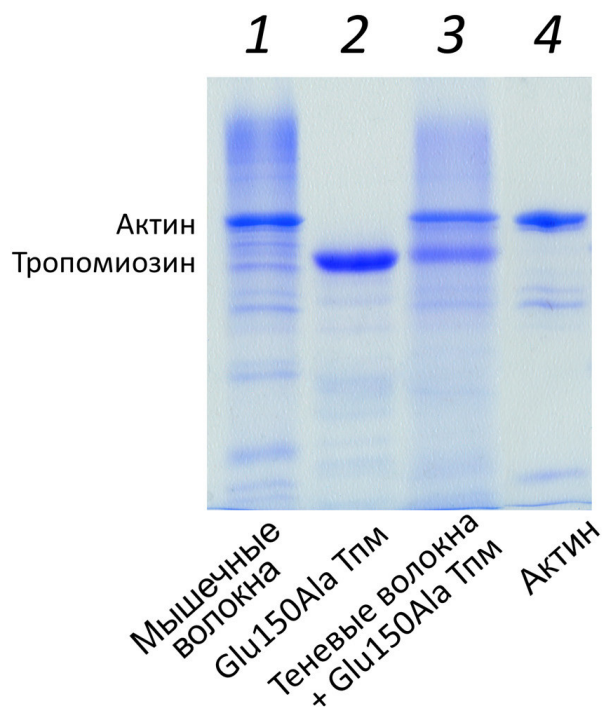


Рис. 1. Контрольная электрофореграмма связывания Glu150Ala-мутантного тропомиозина (Glu150Ala Тпм) с актином.

Из мышечных волокон (дорожка 1) были экстрагированы миозин и регуляторные белки для получения теневых волокон, тонкие филаменты в которых были реконструированы тропомиозином (дорожка 3), а затем тропонином. Изолированные тропомиозин и актин показаны на дорожках 2 и 4 соответственно.

сократительного аппарата, при высокой концентрации Ca^{2+} и в отсутствие нуклеотидов или в присутствии АДФ моделировали состояние активации сократительного аппарата.

Поскольку флуоресцентный зонд специфично связывался с SH1-спиралью, то изменения ориентации диполей зонда и их подвижности рассматривали как изменения ориентации и подвижности этой спирали.

Головка миозина в течение АТФазного цикла претерпевает конформационные перестройки (Borovikov et al., 2009). Ранее было показано, что SH1-спираль изменяет свою ориентацию при переходе из слабой формы связывания с актином в сильную. Методом электронной микроскопии показано, что моторный домен головки миозина наклоняется к актиновому филаменту при образовании сильного связывания с актином. При этом диполи флуоресцентной метки 1,5-IAEDANS, прикрепленной к Cys707 SH1-спирали головки

миозина, наклоняются также к оси мышечного волокна. При добавлении в мышечное волокно АДФ при высокой концентрации Ca^{2+} значения угла диполей метки оказываются наименьшими, что говорит о повороте SH1-спирали, значения количества дезориентированных флуорофоров также наименьшие, что свидетельствует об иммобилизации головки миозина.

При слабом взаимодействии миозина с актином головка миозина отдаляется от актина, при этом угол диполей красителя увеличивается, достигая максимального значения при добавлении АТФ при низкой концентрации Ca^{2+} . Количество дезориентированных флуорофоров увеличивается, а анизотропия флуоресценции снижается, поскольку слабо связанная головка очень подвижна. Одновременно в мышечном волокне головки миозина могут быть в разных функциональных состояниях, то есть наблюдается несколько популяций миозиновых головок. Таким образом, анализ ориентации SH1-спирали может предоставить информацию о конформационном состоянии всей головки миозина и характере ее связывания с актином.

При моделировании перехода от слабой формы связывания к сильной диполи флуорофоров S1-AEDANS поворачиваются на несколько градусов. Высокая специфичность окрашивания препарата миозина, а также высокое качество используемых белков позволяли получить амплитуду изменений в ориентации

SH1-спирали миозина до 11 град. (Borovikov et al., 2009). Одновременно сравнивали две модельные системы, в одной из которых присутствовал тропомиозин дикого типа (WT), в другой — мутантный белок. Затем к мутантному тропомиозину добавляли ингибитор тропонина EGCG и выявляли эффекты этого соединения. Результаты измерений флуоресценции представлены в виде гистограмм значений угла ориентации диполей излучения красителя (Φ_E) и количества дезориентированных флуорофоров (N).

Замена Glu150Ala в тропомиозине активирует образование сильной формы связывания миозиновых мостиков с актином. Характерная картина изменений значений Φ_E для S1-AEDANS наблюдалась при измерении параметров флуоресценции в мышечных волокнах, содержащих WT-тропомиозин Trp3.12 в составе тонких филаментов (рис. 2, голубые и синие столбики). При этом наблюдали снижение значений Φ_E в диапазоне 1.0–2.1 град. при создании активирующих условий для тонких филаментов, то есть при увеличении концентрации ионов кальция и связывании с актином головок миозина в отсутствие нуклеотидов и в присутствии АДФ. Если изменение концентрации Ca^{2+} имело модулирующее действие на конформационные перестройки в области SH1-спирали миозина, то нуклеотиды АДФ и АТФ вызывали больший эффект,

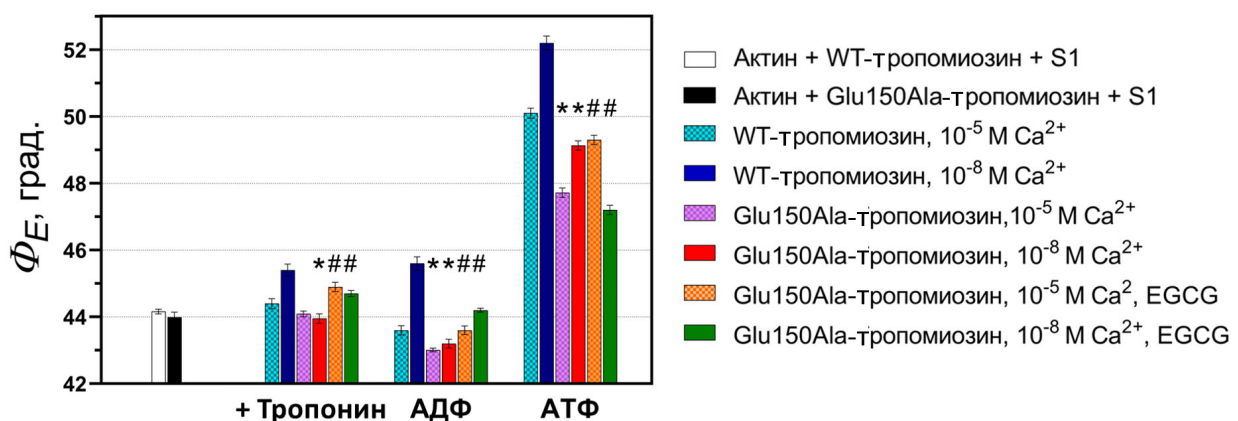


Рис. 2. Влияние замены Glu150Ala в тропомиозине на значение угла ориентации диполей излучения Φ_E S1-AEDANS в мышечных волокнах, содержащих регулируемые тонкие филаменты, в отсутствие и в присутствии ингибитора тропонина EGCG.

Измерения проводили при низкой (10^{-8} M) и высокой (10^{-5} M) концентрации ионов Ca^{2+} в отсутствие нуклеотидов (+ Тропонин) и в присутствии АДФ и АТФ. Изменения значений Φ_E между мышечными волокнами, содержащими тропомиозин дикого типа (WT-тропомиозин) и тропомиозин с заменой Glu150Ala (Glu150Ala-тропомиозин) (*), а также между мышечными волокнами, содержащими тропомиозин с заменой Glu150Ala в отсутствие и в присутствии EGCG (#) достоверны при $P < 0.05$.

провоцируя наклон SH1-спирали к оси волокна на 8.6 град. при переходе от слабой формы связывания к сильной.

Присутствие в тропомиозине замены Glu150Ala влияло на характер изменений Φ_E (рис. 2, розовые и красные столбики). Значение Φ_E больше не реагировало на изменение концентрации Ca^{2+} в мышечном волокне в отсутствие нуклеотидов и в присутствии АДФ. То есть присутствие мутантного тропомиозина ингибировало характерные при увеличении Ca^{2+} конформационные перестройки миозина в области SH1-спирали; по-видимому, нарушалась передача Ca^{2+} -сигнала с тропонинового комплекса на миозин. Кроме того, при моделировании каждой стадии АТФазного цикла значение Φ_E снижалось, что типично для наклона SH1-спирали миозина к оси мышечного волокна при образовании сильной формы связывания с актином. В присутствии АТФ значение Φ_E также снижалось (на 2.3–3.1 град.), что указывало на то, что в мышечном волокне оставалось больше миозиновых головок в сильной форме связывания. В целом при моделировании перехода от слабой формы связывания к сильной SH1-спираль миозина поворачивалась азимутально на 6.1 град. (в отличие от 8.6 град. для WT-тропомиозина) в основном за счет ингибирования перехода в слабую форму связывания миозиновых головок в присутствии мутантного

тропомиозина. Таким образом, конформационные переходы миозина были выражены слабее в присутствии мутантного тропомиозина.

Выводы об увеличении числа головок миозина в сильной форме связывания подтверждались данными об уменьшении количества дезориентированных флуорофоров (N , рис. 3), которое может наблюдаться при иммобилизации миозиновых головок. Для мышечных волокон, содержащих WT-тропомиозин, наблюдали слабую дезориентацию проб при высокой концентрации ионов кальция (значения N низкие: 0.17–0.18 отн. ед.). Величина N повышалась при низкой концентрации Ca^{2+} (до 0.27–0.28 отн. ед.) и достигала наибольшего значения в присутствии АТФ (0.46 отн. ед.). Для мышечных волокон, содержащих мутантный тропомиозин, значение N аномально снижалось при низкой концентрации ионов кальция (до 0.15 отн. ед.) и в присутствии АТФ (до 0.13 отн. ед.). Такое снижение значений N характерно для образования конформации миозина, имеющей множественные связи с актином, ограничивающие ее подвижность. Данные об ориентации SH1-спирали миозина в совокупности с данными о подвижности S1 свидетельствуют об увеличении популяции миозиновых головок в сильной форме связывания с актином и ингибировании Ca^{2+} -чувствительности конформационных перестроек

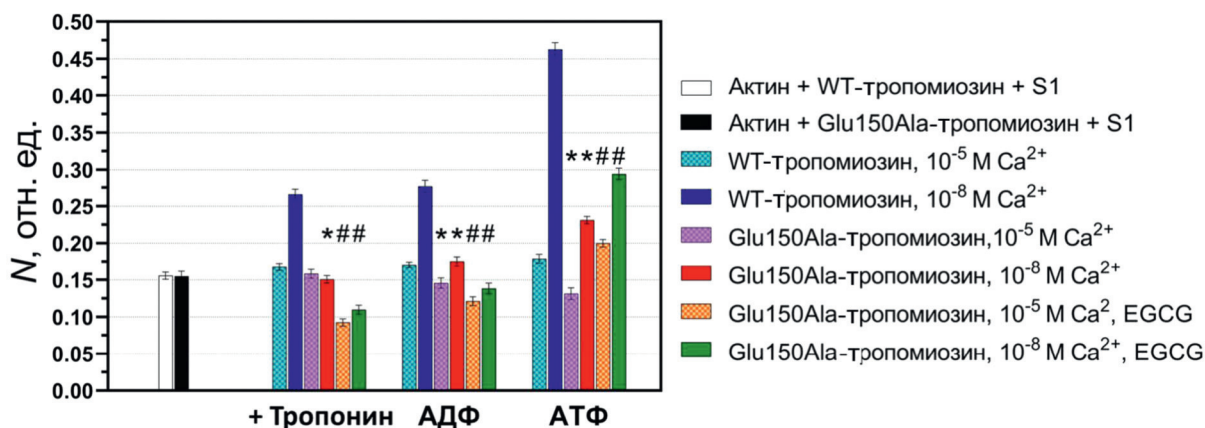


Рис. 3. Влияние замены Glu150Ala в тропомиозине на количество дезориентированных флуорофоров 1,5-IAEDANS, связанных с SH1-спиралью миозина (N) в мышечных волокнах, содержащих регулируемые тонкие филаменты, в отсутствие и в присутствии ингибитора тропонина EGCG.

Измерения проводили при низкой (10^{-8} М) и высокой (10^{-5} М) концентрации ионов Ca^{2+} в отсутствие нуклеотидов (+ Тропонин) и в присутствии АДФ и АТФ. Изменения значений N между мышечными волокнами, содержащими тропомиозин дикого типа (WT-тропомиозин) и тропомиозин с заменой Glu150Ala (Glu150Ala-тропомиозин) (*), а также между мышечными волокнами, содержащими тропомиозин с заменой Glu150Ala в отсутствие и в присутствии EGCG (#) достоверны при $P < 0.05$.

миозина в присутствии замены Glu150Ala в тропомиозине.

Ранее с помощью анализа подвижности *in vitro* было показано, что мутация снижает скорость движения миозиновых головок на 25–35% (Matyuschenko et al., 2020). Исследования *in vivo* на трансгенных *Danio rerio* демонстрировали снижение скорости плавания рыб на 7 сут после оплодотворения (Hsu et al., 2021). Снижение скорости может быть напрямую связано с ингибированием конформационных переходов миозина вследствие неправильной передачи Ca^{2+} -сигнала. Несмотря на увеличение числа сильно связанных головок миозина, не следует ожидать усиления сократительной функции мышечных волокон, так как для нее необходима эффективная работа миозина и полный конформационный переход от слабой формы связывания к сильной. В случае мутации, с одной стороны, увеличивалось количество миозиновых головок в сильной форме связывания при низком уровне Ca^{2+} , с другой стороны – подавлялась Ca^{2+} -чувствительность конформационных переходов миозина. Нарушения могут происходить в процессе приема Ca^{2+} -сигнала мутантным тропомиозином с тропонином или (и) вследствие изменения взаимодействия между мутантным тропомиозином и миозином.

Влияние ингибитора тропонина EGCG на конформационное состояние головок миозина в мышечном волокне в присутствии мутантного тропомиозина. Наши ранее полученные данные (Borovikov et al., 2018) и настоящая работа дают представление о потенциальных мишенях, на которые можно воздействовать для восстановления сократительной функции в присутствии мутации Glu150Ala в Trp3.12. Такими мишенями может служить ингибирование сильных форм связывания миозина с актином и снижение Ca^{2+} -чувствительности тропонин-тропомиозиновой регуляции.

Мы оценили эффекты биологически активного соединения зеленого чая EGCG, которое, как известно, ингибирует аномальную чувствительность к Ca^{2+} в изолированных волокнах сердца в модели гипертрофической кардиомиопатии (Tadano et al., 2010). EGCG обладает выраженной антиоксидантной, противоопухолевой, кардиопротекторной и проти-

вовирусной активностью (Chakrawarti et al., 2016). В *in vitro* исследованиях EGCG стабилизировал структурную целостность тонких филаментов и способствовал восстановлению некоторых аспектов сокращения, нарушенных мутациями в субъединицах С и I тропонина, связанных с кардиомиопатиями (Hassoun et al., 2021). Таким образом, EGCG является потенциальным фармакологическим агентом для восстановления сократительной функции при значительном увеличении Ca^{2+} -чувствительности.

Поскольку флуоресценция S1-AEDANS высокочувствительна к изменению концентрации Ca^{2+} и к характеру связывания миозина с актином, можно оценить эффект модуляторов тропонина и миозина непосредственно в упорядоченной системе мышечного волокна. Анализ поляризованной флуоресценции зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с Cys707 S1, обнаружил в присутствии EGCG изменения параметров Φ_E и N . В мышечных волокнах, содержащих мутантный тропомиозин (рис. 2, 3, оранжевые и зеленые столбики), при низкой концентрации Ca^{2+} в состояниях цикла актин-миозин и актин-миозин-АДФ происходило повышение параметров Φ_E , что характерно для отклонения головок миозина от оси мышечного волокна, хотя значение и не достигало значения Φ_E , полученного в присутствии WT-тропомиозина. EGCG оказывал эффект и при высокой концентрации Ca^{2+} , не восстанавливая в итоге Ca^{2+} -зависимые конформационные переходы миозина.

При моделировании слабой формы связывания миозина с актином (в присутствии АТФ) EGCG оставлял значения Φ_E низкими, что характеризовало наклон головок к оси мышечного волокна и задерживание головок миозина в сильной форме связывания с актином. Значения Φ_E изменялись при переходе от слабой формы связывания к сильной на 5.7 град, то есть EGCG существенно (на 34%) ингибировал конформационные перестройки головок миозина, не позволяя поперечным миозиновым мостикам эффективно проходить стадии АТФазного цикла.

Добавление EGCG при моделировании сильных форм связывания миозина с актином снижало количество дезориентированных флуорофоров до 0.09 отн. ед. Это указывает на то, что миозин был существенно иммоби-

лизирован на актине и подвижность мало зависела от изменения концентрации Ca^{2+} , как и в отсутствие EGCG. Однако в присутствии АТФ значения N увеличивались, что говорит о некотором увеличении подвижности миозиновых головок.

Известно, что EGCG связывается с тропонином С вблизи сайта связывания сенсibilизатора кальция EMD 57033, хотя и с меньшим сродством (Botten et al., 2013). В присутствии тропонина I катехин EGCG образует тройной комплекс, заякоривается на Е- и Н-спиралях тропонина С, ослабляет сродство тропонина С к тропонину I и таким образом передает ингибирующий сигнал вдоль всего тонкого филамента. Флуоресценция S1-AEDANS не изменялась в отсутствие тропонина под действием EGCG, но изменялась в его присутствии (данные не приведены). Следовательно, EGCG связывается с тропонином С и передает сигнал через тропонин I к тропомиозину и далее к актин-миозиновому комплексу.

На основании вышеизложенного мы использовали измерения поляризованной флуоресценции метки в SH1-спирали головки миозина, чтобы исследовать влияние замены Glu150Ala в тропомиозине, связанной с кэп-миопатией и CFTD, на конформационные переходы миозина между различными состояниями АТФазного цикла. Аминокислотная замена Glu150Ala приводила к аномальному увеличению числа миозиновых головок в сильной форме связывания даже при моделировании расслабления мышечного волокна. Отсутствие одного из солевых мостиков вследствие замены Glu150 на Ala в тропомиозине запускает переключение тропонина I на связывание с актином, а не с тропомиозином, что позволяет тропомиозину покинуть блокирующую позицию, и активирует прочное связывание головки миозина с актином.

Впервые показано, что ингибитор тропонина EGCG способен модулировать регуляторную функцию тропонин-тропомиозиновой системы в скелетном мышечном волокне, однако его применение не приводит к полной нормализации регуляции актин-миозинового взаимодействия в присутствии тропомиозина с заменой Glu150Ala. Тем не менее результаты работы имеют важное значение для понимания механизмов регуляции мышечного сокращения и дальнейшего нап-

равления исследований. Показана важность баланса конформационных состояний актин-миозинового комплекса в АТФазном цикле и описаны детали регуляторной функции тропонина и тропомиозина. Оказалось, что недостаточно скорректировать силу связывания миозина с актином при низких концентрациях Ca^{2+} . Обязательным условием для нормализации сократительной функции является сохранение эффективности работы поперечных мостиков, то есть прохождение ими полного АТФазного цикла. Проблема применения EGCG в отношении Glu150Ala-мутантного тропомиозина заключается в ингибировании конформационных перестроек миозина от слабой формы связывания с актином к сильной, поскольку EGCG влияет на каждую стадию АТФазного цикла. Возможным решением проблемы может служить модификация соединения или его применение совместно с другими модуляторами функции миозина или тропонина.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00534).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с лабораторными животными проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>); они были одобрены комиссией по биомедицинской этике Института цитологии РАН (протокол № 15/23 от 15.08.2023, Санкт-Петербург).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Borejdo J., Putnam S. 1977. Polarization of fluorescence from single skinned glycerinated rabbit psoas fibers in rigor and relaxation. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 459. P. 578.
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(77\)90056-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(77)90056-1)

- Borovikov Y.S., Gusev N.B.* 1983. Effect of troponin-tropomyosin complex and Ca^{2+} on conformational changes in F-actin induced by myosin subfragment-1. *Eur. J. Biochem.* V. 136. P. 363.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07750.x>
- Borovikov Y.S.* 1999. Conformational changes of contractile proteins and their role in muscle contraction. *Int. Rev. Cytol.* V. 189. Art. ID 267.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61389-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61389-3)
- Borovikov Y.S., Dedova I.V., dos Remedios C.G., Vikhoreva N.N., Vikhorev P.G., Avrova S.V., Hazlett T.L., Van Der Meer B.W.* 2004. Fluorescence depolarization of actin filaments in reconstructed myofibers: the effect of S1 or pPDM-S1 on movements of distinct areas of actin. *Biophys. J.* V. 86. P. 3020.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74351-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74351-9)
- Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Avrova S.V., Redwood C.S.* 2009. Modulation of the effects of tropomyosin on actin and myosin conformational changes by troponin and Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1794. P. 985.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.014>
- Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Avrova S.V., Robinson P., Redwood C.S.* 2009. The effect of the dilated cardiomyopathy-causing mutation Glu54Lys of alpha-tropomyosin on actin-myosin interactions during the ATPase cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 489. P. 20.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.07.018>
- Borovikov Y.S., Avrova S.V., Rysev N.A., Sirenko V.V., Simonyan A.O., Chernev A.A., Karpicheva O.E., Piers A., Redwood C.S.* 2015. Aberrant movement of β -tropomyosin associated with congenital myopathy causes defective response of myosin heads and actin during the ATPase cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 577. P. 11.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.05.002>
- Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Simonyan A.O., Avrova S.V., Rogozovets E.A., Sirenko V.V., Redwood C.S.* 2018. The primary causes of muscle dysfunction associated with the point mutations in Tpm3.12; conformational analysis of mutant proteins as a tool for classification of myopathies. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. Art. ID 3975.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123975>
- Borovikov Y.S., Rysev N.A., Karpicheva O.E., Sirenko V.V., Avrova S.V., Piers A., Redwood C.S.* 2017. Molecular mechanisms of dysfunction of muscle fibres associated with Glu139 deletion in TPM2 gene. *Sci. Rep.* V. 7. Art. ID 16797.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17076-9>
- Botten D., Fugallo G., Fraternali F., Molteni C.* 2013. A computational exploration of the interactions of the green tea polyphenol (-)-Epigallocatechin 3-Gallate with cardiac muscle troponin C. *PLoS One.* V. 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070556>
- Chakrawarti L., Agrawal R., Dang S., Gupta S., Gabrani R.* 2016. Therapeutic effects of EGCG: a patent review. *Expert. Opin. Ther. Pat.* V. 26. P. 907.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1203419>
- Claassen W.J., Baelde R.J., Galli R.A., de Winter J.M., Ottenheijm C.A.C.* 2023. Small molecule drugs to improve sarcomere function in those with acquired and inherited myopathies. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* V. 325. P. 60.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00047.2023>
- Clarke N.F.* 2011. Congenital fiber-type disproportion. *Semin. Pediatr. Neurol.* V. 18. P. 264.
<https://doi.org/10.1016/j.spen.2011.10.008>
- Gordon A.M., Homsher E., Regnier M.* 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* V. 80. P. 853.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>
- Hassoun R., Budde H., Mannherz H.G., Lódi M., Fujita-Becker S., Laser K.T., Gärtner A., Klingel K., Möhner D., Stehle R., Sultana I., Schaaf T., Majchrzak M., Krause V., Herrmann C. et al.* 2021. De novo missense mutations in TNNC1 and TNNI3 causing severe infantile cardiomyopathy affect myofilament structure and function and are modulated by troponin targeting agents. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. Art. ID 9625.
<https://doi.org/10.3390/ijms22179625>
- Hsu P.J., Wang H.D., Tseng Y.C., Pan S.W., Sampurna B.P., Jong Y.J., Yuh C.H.* 2021. L-Carnitine ameliorates congenital myopathy in a tropomyosin 3 de novo mutation transgenic zebrafish. *J. Biomed. Sci.* V. 28. P. 8.
<https://doi.org/10.1186/s12929-020-00707-1>
- Kakol I., Borovikov Y.S., Szczesna D., Kirillina V.P., Levitsky D.I.* 1987. Conformational changes of F-actin in myosin-free ghost single fiber induced by either phosphorylated or dephosphorylated heavy meromyosin. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 913. P. 1.
[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90225-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90225-1)
- Karpicheva O.E., Simonyan A.O., Kuleva N.V., Redwood C.S., Borovikov Y.S.* 2016. Myopathy-causing Q147P TPM2 mutation shifts tropomyosin strands further towards the open position and increases the proportion of strong-binding cross-bridges during the ATPase cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1864. P. 260.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.12.004>
- Lehman W., Rynkiewicz M.J.* 2023. Troponin-I-induced tropomyosin pivoting defines thin-filament function in relaxed and active muscle. *J. Gen. Physiol.* V. 155.
<https://doi.org/10.1085/jgp.202313387>
- Llinas P., Isabet T., Song L., Ropars V., Zong B., Benisty H., Sirigu S., Morris C., Kikuti C., Safer D., Sweeney H.L., Houdusse A.* 2015. How actin initiates the motor activity of Myosin. *Dev. Cell.* V. 33. P. 401.
<https://doi.org/10.1085/jgp.202313387>

- Lorenz M., Poole K.J.V., Popp D., Rosenbaum G., Holmes K.C. 1995. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. *J. Mol. Biol.* V. 246. P. 108.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0070>
- Malfatti E., Lehtokari V.L., Böhm J., De Winter J.M., Schäffer U., Estournet B., Quijano-Roy S., Monges S., Lubieniecki F., Bellance R., Viou M.T., Madelaine A., Wu B., Taratuto A.L., Eymard B. et al. 2014. Muscle histopathology in nebulin-related nemaline myopathy: ultrastructural findings correlated to disease severity and genotype. *Acta Neuropathol. Commun.* V. 2. P. 44.
<https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-44>
- Margossian S., Lowey S. 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* V. 85. P. 55.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85009-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85009-X)
- Matyushenko A.M., Nefedova V.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Berg V.Y., Pivovarova A.V., Kleymentov S.Y., Bershtitsky S.Y., Levitsky D.I. 2020. Mechanisms of disturbance of the contractile function of slow skeletal muscles induced by myopathic mutations in the tropomyosin TPM3 gene. *FASEB J.* V. 34. Art. ID 13507.
<https://doi.org/10.1096/fj.202001318R>
- Marston S., Memo M., Messer A., Papadaki M., Nowak K., McNamara E., Ong R., El-Mezgueldi M., Li X., Lehman W. 2013. Mutations in repeating structural motifs of tropomyosin cause gain of function in skeletal muscle myopathy patients. *Hum. Mol. Genet.* V. 22. P. 4978.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt345>
- Marttila M., Lemola E., Wallefeld W., Memo M., Donner K., Laing N.G., Marston S., Grönholm M., Wallgren-Pettersson C. 2012. Abnormal actin binding of aberrant β -tropomyosins is a molecular cause of muscle weakness in TPM2-related nemaline and cap myopathy. *Biochem J.* V. 442. P. 231.
<https://doi.org/10.1042/BJ20111030>
- Moore J.R., Campbell S.G., Lehman W. 2016. Structural determinants of muscle thin filament cooperativity. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 594. P. 8.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.016>
- Moraczewska J. 2020. Thin filament dysfunctions caused by mutations in tropomyosin Tpm3. 12 and Tpm1. *J. Muscle Res. Cell Motil.* V. 41. P. 39.
<https://doi.org/10.1007/s10974-019-09532-y>
- North K.N., Wang C.H., Clarke N., Jungbluth H., Vainzof M., Dowling J.J., Amburgey K., Quijano-Roy S., Beggs A.H., Sewry C., Laing N.G., Bönnemann C.G. 2014. Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscul. Disord.* V. 24. P. 97.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.11.003>
- Okamoto Y., Sekine T. 1985. A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. *J. Biochem.* V. 98. P. 1143.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135365>
- Oosawa F., Fujime S., Ishiwata S. I., Mihashi K. 1973. Dynamic property of F-actin and thin filament. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* V. 37. P. 277.
<https://doi.org/10.1101/SQB.1973.037.01.038>
- Popp D., Maeda Y., Stewart A. A., Holmes K. C. 1991. X-ray diffraction studies on muscle regulation. *Adv. Biophys.* V. 27. P. 89.
[https://doi.org/10.1016/0065-227x\(91\)90010-b](https://doi.org/10.1016/0065-227x(91)90010-b)
- Potter J.D. 1982. Preparation of troponin and its subunits. *Methods Enzymol.* V. 85. P. 241.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85024-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85024-6)
- Roopnarine O., Thomas D.D. 1996. Orientation of intermediate nucleotide states of indane dione spin-labeled myosin heads in muscle fibers. *Biophys. J.* V. 70. P. 2795.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79849-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79849-1)
- Sakuma A., Kimura-Sakiyama C., Onoue A., Shitaka Y., Kusakabe T., Miki M. 2006. The second half of the fourth period of tropomyosin is a key region for Ca(2+)-dependent regulation of striated muscle thin filaments. *Biochemistry.* V. 45. P. 9550.
<https://doi.org/10.1021/bi060963w>
- Sewry C.A., Wallgren-Pettersson C. 2017. Myopathology in congenital myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* V. 43. P. 5.
<https://doi.org/10.1111/nan.12369>
- Spudich J.A., Watt S. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* V. 246. P. 4866.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62016-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62016-2)
- Tadano N., Du C.K., Yumoto F., Morimoto S., Ohta M., Xie M.F., Nagata K., Zhan D.Y., Lu Q.W., Miwa Y., Takahashi-Yanaga F., Tanokura M., Ohtsuki I., Sasaguri T. 2010. Biological actions of green tea catechins on cardiac troponin C. *Br. J. Pharmacol.* V. 161. P. 1034.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00942.x>
- Vibert P., Craig R., Lehman W. 1997. Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.* V. 266. P. 8.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0800>
- Yanagida T., Oosawa F. 1978. Polarized fluorescence from epsilon-ADP incorporated into F-actin in a myosin-free single fiber: Conformation of F-actin and changes induced in it by heavy meromyosin. *J. Mol. Biol.* V. 126. P. 507.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90056-6)

GREEN TEA CATECHIN EGCG IS ABLE TO PARTIALLY RESTORE THE REGULATION OF MUSCLE CONTRACTION BY THE TROPONIN-TROPOMYOSIN COMPLEX, IMPAIRED BY THE GLU150ALA SUBSTITUTION IN γ -TROPOMYOSIN

M. V. Tishkova^{a, *}, O. E. Karpicheva^{a, b}, Y. S. Borovikov^a, S. V. Avrova^a

^a *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 194064, Russia*

^b *Department of Pharmacology, Physiology, and Biophysics, Boston University, Boston, 02118, MA, USA*

* *E-mail: mariiatiskova@gmail.com*

A number of point mutations has been identified in the genes of contractile and regulatory proteins of skeletal muscle that can lead to dysfunction of muscle tissue. The molecular mechanisms of muscle contraction in the presence of mutant muscle proteins in the sarcomere remain poorly understood. In the current study, we examined the impact of the glutamate-to-alanine substitution at position 150 (Glu150Ala) of γ -tropomyosin associated with cap disease and fiber-type disproportion in humans on the molecular mechanisms of troponin-tropomyosin-related regulation of muscle contraction in a single muscle fiber. It is believed that tropomyosin residue Glu150 is not directly involved in the interaction of tropomyosin with actin and myosin interactions; however, according to structural models of thin filaments under low Ca^{2+} conditions, this residue is located close to site of binding with the C-terminal domain of troponin I. To assess the performance of myosin heads in the presence of Glu150Ala mutant tropomyosin, we measured the polarized fluorescence of 1,5-IAEDANS probe bound to the SH1-helix of myosin. The obtained results indicate an abnormal increase in the number of myosin heads strongly bound to actin during relaxation of muscle fibres containing Glu150Ala mutant tropomyosin. It has been shown that the green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG), known as a modulator of troponin function, inhibits the premature transition of myosin heads into a state of strong actin binding, and thus weakens the damaging effect of the mutation. However, EGCG does not completely restore the effective behavior of myosin cross-bridges during the ATPase cycle.

Keywords: regulation, muscle contraction, ATPase cycle, tropomyosin mutations, congenital myopathies, conformational changes, Ca^{2+} -sensitivity, epigallocatechin gallate

УДК 57.086.16:572.783:576.53

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ МИОКАРДА ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩИЕ ХИМАЗУ, И ИХ ВЫЯВЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ АНТИТЕЛ

© 2024 г. А. А. Бекетова^{1, *}, О. В. Кирик¹, Д. Э. Коржевский¹

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197022, Россия

* E-mail: beketova.anastasiya@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.07.2024

После доработки 30.08.2024

Принята к публикации 02.09.2024

В последние десятилетия уделяется особое внимание роли тучных клеток в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе внезапной сердечной смерти. Одним из компонентов гранул тучных клеток является химаза. Для ее иммуногистохимического выявления используют реагенты, обладающие различной специфичностью. Данное обстоятельство не позволяет точно оценить субпопуляции тучных клеток миокарда. Цель данного исследования состояла в оценке пригодности различных реагентов для селективного выявления тучных клеток миокарда и проверке гипотезы о существовании популяции тучных клеток, способных к окраске альциановым синим при негативной реакции на химазу. Анализ результатов использования различных протоколов для выявления тучных клеток показал, что, в сравнении с козьими поликлональными антителами к химазе, мышинные моноклональные антитела обладают большей специфичностью, а предварительное окрашивание срезов альциановым синим позволяет нивелировать неспецифическое мечение антителами липофусцина кардиомиоцитов. Кроме этого, все предложенные протоколы позволяют обнаружить морфологическую гетерогенность тучных клеток и их гранул в миокарде человека.

Ключевые слова: тучные клетки, химаза, миокард человека, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0041377124050066, **EDN:** DUOQAR

Тучные клетки с момента их открытия привлекают внимание исследователей в области как фундаментальной, так и клинической медицины. Данные клетки являются мультифункциональными, играя роль не только в регуляции соединительной ткани, но в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета (Цибулькина, Цибулькин, 2017), а также в модуляции работы центральной (Григорьев, Коржевский, 2021a) и периферической нервной системы (Theoharides et al., 2023). Однако кроме физиологической функции тучные клетки принимают участие в патологическом воспалении, в том числе нейровоспалении (Григорьев, Коржевский, 2021b), реакции гиперчувствительности первого типа, постинфарктном ремоделировании миокарда (Levick, Widiapradja, 2018; Juliano et al., 2020).

Значение тучных клеток в патологии сердечно-сосудистой системы не ограничивается фиброзированием миокарда: взаимное расположение тучных клеток и симпатических нервных

окончаний в сердце указывает на участие первых в формировании аритмий, исходом которых может стать внезапная сердечная смерть (Reid et al., 2011). Активация симпатических волокон происходит вследствие нескольких событий. Во-первых, выделение тучными клетками ренина запускает каскад локальной ренин-ангиотензиновой системы, итогом которого является активация рецепторов ангиотензина первого типа на мембране симпатических нервных волокон, что приводит к усилению экзотоза норадреналина (Maskins et al., 2006). Во-вторых, аналогичный эффект оказывает химаза тучных клеток, обладающая свойствами ангиотензинпревращающего фермента (Urata et al., 1993). В-третьих, высвобождение гистамина из гранул тучных клеток, с одной стороны, приводит к активации аритмогенных гистаминовых H₁- и H₂-рецепторов, а с другой, антиаритмогенных гистаминовых H₃-рецепторов (Reid et al., 2011). Показано, что активация H₃-рецепторов происходит при наномолярных

концентрациях гистамина, тогда как активация H_1 - и H_2 -рецепторов требует микромолярных концентраций (Reid et al., 2011). Данный факт говорит в пользу модулирующей роли тучных клеток в развитии патологического процесса, то есть имеют место не только повреждающие эффекты, но и кардиопротективные. Однако популяция кардиальных тучных клеток и изменения в ней в ходе различных патологических процессов остается изученной не до конца.

Исследования прошлого века показали морфологическую и функциональную гетерогенность популяции тучных клеток. С момента определения содержимого гранул тучных клеток и развития иммуногистохимического метода ведущим признаком, позволяющим разделить тучные клетки на субпопуляции, стал спектр нейтральных протеаз гранул, а именно наличие в них исключительно триптазы или комбинации триптазы, химазы, карбоксипептидазы АЗ и некоторых других протеаз. Согласно этому принципу, выделяют две субпопуляции тучных клеток — MC_T и MC_{TC} соответственно (Irani et al., 1986; Grigorev, Korzhenskii, 2021).

Несмотря на высокую селективность иммуногистохимического метода существует проблема взаимодействия реагентов, используемых для его исполнения, а также зависимость чувствительности антител от фиксирующего раствора (KleinJan et al., 1996). Более того, различные первичные антитела к протеазам гранул тучных клеток имеют разную селективность (Irani et al., 1989; Weidner, Austen, 1993). Данные обстоятельства приводят к различиям в оценке процентного соотношения субпопуляций тучных клеток в отдельных органах и тканях (Weidner, Austen, 1993; KleinJan et al., 1996).

Работы, описывающие субпопуляции тучных клеток миокарда человека, немногочисленны, однако в медицинском сообществе в последние 20 лет все больше возрастает интерес к роли тучных клеток в процессе ремоделирования миокарда (Kologrivova et al., 2021; Jin et al., 2022). Исследователи отдают ведущую роль в развитии патологии миокарда протеазам тучных клеток, в первую очередь химазе. С другой стороны, была открыта ферментативная активность химазы в отношении ангиотензина I, что раскрывает один из механизмов регуляции кровоснабжения тучными клетками, а также открывает новые мишени для терапии.

Из сказанного выше становится очевидной актуальность определения особенностей различных антител для иммунохимического выявления химазы тучных клеток. Цель данного исследования состояла в оценке пригодности различных реагентов для селективного выявления тучных клеток миокарда и проверке гипотезы о существовании популяции тучных клеток, способных к окраске альциановым синим при негативной реакции на химазу.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования были взяты срезы миокарда человека, полученные из Архива отдела общей и частной морфологии ФБГНУ Института экспериментальной медицины. Срезы были получены с парафиновых блоков образцов миокарда человека, фиксированных в формалине. Отдельно был выбран образец, фиксированный в цинк-этанол-формалине.

Процедуру иммуногистохимического исследования проводили согласно пяти различным протоколам в соответствии с используемыми первичными антителами, наличием процедуры теплового демаскирования, вторичными реагентами, а также наличием предварительного окрашивания альциановым синим. Особенности каждого протокола указаны в табл. 1. Срезы освобождали от парафина в ксилолах и регидратировали в спиртах нисходящей концентрации. Процедуру термического демаскирования антигена проводили в микроволновой печи путем трехкратного нагревания до температуры кипения буфера S1700 (Agilent, США), после чего раствор и срезы остужали до комнатной температуры. Далее для всех срезов проводили блокировку эндогенной пероксидазы 3%-ным раствором перекиси водорода в течение 10 мин путем нанесения его непосредственно на срез. После промывки срезов от раствора перекиси водорода в дистиллированной воде срезы оставляли на 5 мин в PBS. Срезы, обрабатываемые по протоколу № 5, после регидратации подвергали процедуре термического демаскирования антигена, затем окрашивали альциановым синим (Sigma-Aldrich, США) (методика описана ниже), после чего проводили блокировку эндогенной пероксидазы, как было описано выше. Затем проводили обработку блокирующими реагентами: Horse serum (Jackson ImmunoRe-

Таблица 1. Перечень первичных антител и других реагентов, использованных в соответствующих протоколах

№ протокола	Первичные антитела	Разведение	Блокирование неспецифической реакции	Вторичные реагенты	Термическое демаскирование	Окраска альтаиновым синим
1	Поликлональные козы антигены против химазы тучных клеток человека (ab111239; AbCam, Великобритания)	1 : 200	Horse serum (Jackson Immuno Research, США)	Авидин-биотиновый набор VECTASTAIN Universal Quick HRP kit (PK-8800; Vector Laboratories, США)	Отсутствовало	После проявления ИГХ-реакции DAB
2		1 : 300		Блокирующие реагенты из набора Anti Rabbit, Mouse, Goat HRP-DAB Cell and Tissue Staining Kit (R&D System, США)	Реагенты из набора R&D и конъюгат стрептавидина и пероксидазы хрена	
3						
4	Моноклональные мышинные антитела против химазы тучных клеток человека, клон CC1 (ab2377; AbCam, Великобритания)	1 : 600	Не применяли	MACH 2 Mouse (BioCare Medical, США)		После термического демаскирования и до ИГХ реакции
5						

search, США) наносили на срезы и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, блокирующие реагенты из набора Anti Rabbit, Mouse, Goat HRP-DAB Cell and Tissue Staining Kit (R&D System, США) использовали согласно инструкции. Срезы, обработанные первичными антителами, инкубировали в течение 20 ч при 27.5 °C. После отмывки первичных антител в PBS срезы обрабатывали вторичными реагентами. В протоколах № 1 и 2 реагенты авидин-биотинового набора VECTASTAIN Universal Quick HRP kit (PK-8800, Vector Laboratories, США) наносили на 60 мин при 27.5 °C, после чего смывали PBS и наносили на срезы конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена на 30 мин при той же температуре. В протоколе № 3 вторичные реагенты из набора R&D наносили согласно инструкции, инкубацию с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена проводили аналогично указанному выше. Используемый в протоколах №№ 4 и 5 MACH 2 Mouse (BioCare Medical, США) инкубировали 60 мин

при 27.5 °C. Продукт реакции визуализировали с помощью DAB. Реакцию останавливали с помощью 3%-ного раствора перекиси водорода, после чего срезы погружали в воду.

После обработки DAB (или после термического демаскирования в протоколе № 5) производили подкраску срезов альциановым синим (Sigma-Aldrich, США) по следующей методике. На срезы наносили небольшое количество раствора красителя, помещали стекла во влажные камеры и инкубировали при 40 °C в течение 30 мин, после чего краситель удаляли со срезов путем стряхивания и последующего промывания в двух порциях дистиллированной воды.

Подкрашенные срезы заключали в среду Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, США). Анализ цифровых изображений, полученных с помощью микроскопа Leica DM750 и камеры ICC50, проводили с использованием программного обеспечения Leica LAS EZ (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все перечисленные протоколы позволили выявить тучные клетки миокарда человека, причем визуальная оценка количества выявленных тучных клеток на срезах, полученных с одних и тех же образцов, но при использовании разных протоколов не выявила очевидных различий.

При использовании протоколов № 1–3 наблюдали интенсивную неспецифическую реакцию в цитоплазме кардиомиоцитов (рис. 1а–в), гладкомышечных клеток сосудов и эндотелиоцитов. Проведение термического демаскирования антигена при использовании вторичных антител из набора VECTASTAIN существенно не влияло на результат: разность интенсивности тучных клеток и фона не менялась, однако начинали неспецифически выявляться гранулы липофусцина в цитоплазме кардиомиоцитов. Стоит отметить, что во всех случаях и при использовании любых реагентов,

проведение термического демаскирования антигена приводило к разной степени яркости окрашивания гранул липофусцина. Примечательно, что интенсивность окраски липофусцина при использовании мышинных моноклональных антител эквивалентна интенсивности окраски гранул тучных клеток, что затрудняет идентификацию последних при малом увеличении объектива микроскопа. Стоит также отметить, что материал, фиксированный в цинк-этанол-формалине, показал наиболее интенсивную окраску липофусцина в сравнении с материалом, фиксированным в формалине, что свидетельствует о влиянии способа фиксации на специфичность связывания антител.

Протокол № 3 (рис. 1в) показал наилучший результат среди протоколов, в которых используются козы поликлональные антитела к химазе, что характеризуется сравнительно низким уровнем фона, неярым выявлением гранул липофусцина и сохраненной яркостью гранул тучных клеток. Недостатком данного протокола является его трудоемкость в связи с большим числом реагентов и удлинением времени его исполнения.

Результаты протоколов № 4 и 5 (рис. 1г; рис. 2) положительно отличаются от протоколов № 1–3 наличием минимального фона или отсутствием такового. Однако, как уже было замечено ранее, протокол № 4 имеет недостаток — неспецифическое выявление гранул липофусцина кардиомиоцитов. Данный недостаток полностью нивелируется предварительным окрашиванием альциановым синим (рис. 1г); на интенсивность окрашивания гранул тучных клеток данная процедура не влияет. Из дополнительных плюсов протоколы № 4 и 5 требуют меньшего числа реагентов, что значительно ускоряет их выполнение и уменьшает вероятность ошибки со стороны исполнителя.

Все протоколы позволили получить примерно одинаковое окрашивание гранул тучных клеток. Было выявлено, что на одном и том же срезе тучные клетки окрашиваются неравномерно (рис. 2). Условно можно выделить три группы: 1 — интенсивно окрашенные тучные клетки (рис. 2а), 2 — тучные клетки средней интенсивности окраски (рис. 2б) и 3 — слабоокрашенные тучные клетки. Тучные клетки первой группы характеризуются

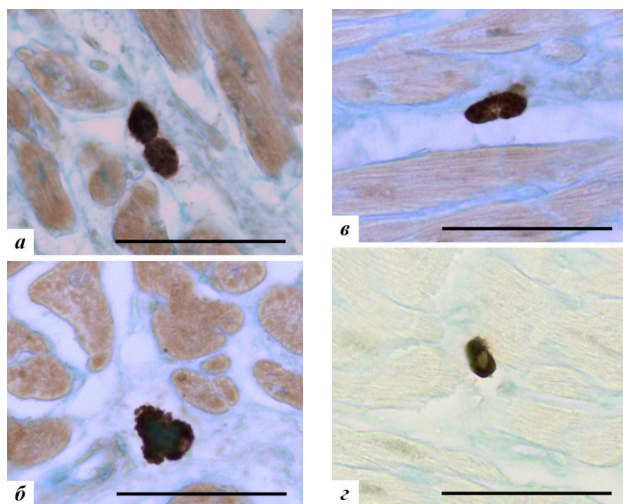


Рис. 1. Результаты иммуногистохимического выявления химазы тучных клеток миокарда при использовании различных протоколов.

а — Использование козьих поликлональных антител, авидин-биотинового набора VECTASTAIN без термического демаскирования (протокол № 1); б — использование козьих поликлональных антител, авидин-биотинового набора VECTASTAIN, термическое демаскирование (протокол № 2); в — использование козьих поликлональных антител, вторичных реагентов из набора R&D, термическое демаскирование антигена (протокол № 3); г — предварительное окрашивание альциановым синим, мышинные моноклональные антитела, термическое демаскирование (протокол № 5). Увел. объектива 40×. Масштабный отрезок: 50 мкм.

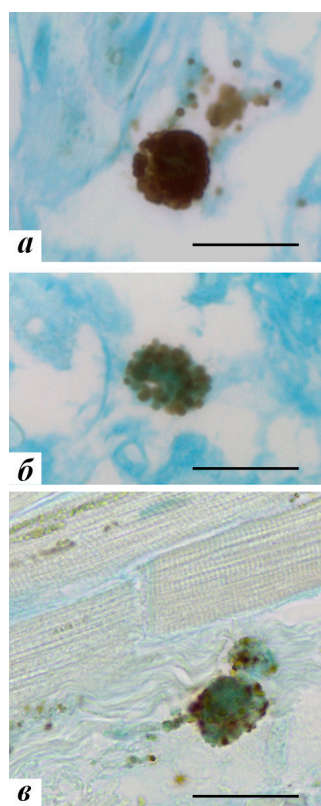


Рис. 2. Различная интенсивность иммуногистохимического мечения тучных клеток. Использован протокол № 4.

а — Дегранулирующая тучная клетка, наблюдаются гранулы, более интенсивно окрашенные по периферии; *б* — тучная клетка, в которой наблюдаются гранулы различного диаметра; *в* — тучная клетка, часть гранул которой не метится антителами к химазе. Увел. объектива: 100×. Масштабный отрезок: 20 мкм.

тем, что все их гранулы дают интенсивную положительную иммуногистохимическую реакцию. Для некоторых гранул характерна более интенсивная окраска по периферии (рис. 2*а, в*), для других — равномерная окраска. Часть клеток окрашивается настолько интенсивно, что дать оценку окрашенности отдельных гранул не представляется возможным. Большая часть гранул тучных клеток второй группы окрашена, при этом между гранулами наблюдаются участки цитоплазмы, окрашенные только альциановым синим. Для тучных клеток третьей группы характерно окрашивание гранул по периферии клетки и единичных гранул в центре клетки. Вне зависимости от группы тучные клетки содержали гранулы разного размера (рис. 2*б*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Как было отмечено ранее, особенностью окрашивания крупных гранул тучных клеток являлась более интенсивная окраска по периферии гранулы, а также в центре с образованием химаза-позитивного ядра. Данные наблюдения согласуются с работами других авторов (Гусельникова и др., 2015; Атякшин и др., 2018; Atiakshin et al., 2023) и могут быть объяснены следующим образом. Ранее было показано, что зрелые гранулы тучных клеток образуются путем слияния гранул малого объема (програнул), синтезируемых комплексом Гольджи, и их объем зависит от продолжительности их созревания, которая может исчисляться месяцами (Hammel et al., 2010). Другие исследования показали, что для зрелых гранул характерно наличие плотного ядра, образованного комплексом ферментов и гликозаминогликанов (Arvan, Castle, 1998; Braga et al., 2007; Wernersson, Pejler, 2014). Концентрирование ферментов по периферии гранулы, как уже было сказано, отмечается исследователями, однако объяснение этого феномена предложено не было. Предположительно, внутригранулярная архитектура формируется согласно биофизическим свойствам молекул, образующих ее, и связана с наличием других молекул, участвующих в сборке гранул (Arvan, Castle, 1998). По мере созревания гранулы в ней накапливаются отрицательно заряженные молекулы протеогликанов и положительно заряженные молекулы протеаз, которые вступают в электростатическое взаимодействие (Mulloy et al., 2017). Вероятно, при достижении критической концентрации данных молекул и снижения pH внутригранулярной среды, сопровождающего процесс созревания гранул (Wernersson, Pejler, 2014), происходит «уплотнение» комплекса в результате, с одной стороны, усиления электростатического взаимодействия (Mulloy et al., 2017), а с другой стороны, фазового перехода (Alberti, 2017). Поскольку параметры внутригранулярной среды динамичны вследствие продолжающегося слияния програнул со зрелой гранулой, возможен сдвиг концентрации ферментов или протеогликанов, приводящий к обратному фазовому переходу (Alberti, 2017), затрагивающему околемембранную часть гранулы. При этом

взаимодействие ферментов с протеогликанами ослабевает, и они переходят в растворенное состояние. Подобное объяснение является лишь предположением, требующим более детального изучения с точки зрения биофизики. Однако тот факт, что находящиеся вблизи мембраны ферменты активнее взаимодействуют с антителами, чем находящиеся в центральной области гранулы, свидетельствует в пользу большей доступности первых, что в свою очередь может быть обеспечено свободой от взаимодействия с другими молекулами.

Наличие как крупных, так и мелких гранул в тучных клетках можно объяснить стадией их созревания. Существование гранул малого размера можно рассмотреть и с позиции дегрануляции тучных клеток. Показано, что дегрануляция тучных клеток может осуществляться различными способами, и в том числе, путем так называемой *kiss and run* дегрануляции, подразумевающей приближение гранулы к плазматической мембране клетки и образование поры, через которую происходит выход содержимого гранулы, что сопровождается уменьшением объема ее содержимого. С другой стороны, существует явление постепенной дегрануляции — *piecemeal degranulation* (Crivellato et al., 2003) — для которого характерно образование везикул малого размера, диаметром 70–150 нм (Crivellato et al., 2003), путем отпочковывания от зрелых гранул (в среднем 1 мкм в диаметре). В связи с этим, наблюдаемые гранулы меньшего размера могут расцениваться как истощающиеся материнские гранулы. С другой стороны, есть мнение, что постепенная дегрануляция — это процесс, при котором отдельные гранулы сливаются с плазматической мембраной, образуя поры через которые происходит выделение компонентов гранул, но при этом не происходит слияние гранул между собой с образованием каналов дегрануляции (Blank, 2011). В этом случае объяснение остается тем же — выход содержимого гранул приводит к уменьшению объема гранул.

К вопросу о разнообразии размеров гранул можно подойти с другой стороны, взяв во внимание существование тучных клеток разной иммуногистохимической реактивности. В работах по двойному маркированию ферментов гранул тучных клеток было выявлено, что в одной клетке сосуществуют гранулы,

содержащие как сразу несколько ферментов, так и только один из выявляемых (Atiakshin et al., 2023). В связи с этим можно предположить, что для тучных клеток справедливо наличие сортировки компонентов гранул в процессе созревания. Для клеток, имеющих секреторные гранулы, описано два механизма избирательного наполнения гранул: сортировка по входу (*sorting for entry*) и сортировка по удержанию (*sorting for retention*) (von Zastrow et al., 1989; Arvan, Castle, 1998). Согласно первому механизму в состав гранулы компоненты включаются согласно спектру мембранных рецепторов, то есть созревание гранулы сопряжено с накоплением в ней специфических белков и небелковых компонентов. Второй механизм подразумевает изменение pH внутригранулярной среды, которое приводит к конденсации белков, что способствует их удержанию, или не приводит к таковой, что определяет выведение молекул из состава гранулы. Выведение в этом случае осуществляется посредством рецепторного взаимодействия молекул и образования везикулы, которая отделяется от созревающей гранулы и может быть использована для построения других гранул или утилизирована. Насколько справедливы эти механизмы в контексте тучных клеток человека, к сожалению, неясно, а потому данный вопрос требует дальнейшего изучения.

В ходе анализа срезов не были выявлены тучные клетки, окрашивающиеся альциановым синим и дающие негативную реакцию на химазу, что косвенно указывает на преобладание субпопуляции химаза-позитивных тучных клеток в миокарде. Эти данные согласуются с более ранними исследованиями распределения субпопуляций тучных клеток сердца человека (Spert et al., 1994). Стоит отметить, что высока вероятность положительной реакции указанных выше клеток в отношении триптазы, поскольку некоторые исследования показывают наличие в тучных клетках гранул, содержащих только один из выявляемых ферментов (Atiakshin et al., 2023). При этом, обнаруженные химаза-негативные гранулы могут расцениваться, как потенциально содержащие триптазу. Однако не стоит исключать возможность, что клетки, проявившие слабую химаза-позитивную реакцию в представленных в данной статье протоколах, могли не проявить

таковой в протоколах двойного маркирования специфических ферментов тучных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе результатов представленных в данной статье протоколов установлено, что использование козьих поликлональных антител к химазе тучных клеток человека сопряжено со значительной трудоемкостью протокола и неудовлетворительно высоким уровнем неспецифического фона, в то время как мышиные моноклональные антитела обеспечивают селективность выявления химазы без фона, простоту и скорость выполнения протокола, что создает преимущество для использования данного типа антител. Несмотря на различный уровень фона все протоколы позволяют выявить морфологическую гетерогенность популяции тучных клеток миокарда человека и их гранул. Тем не менее молекулярные механизмы образования, созревания и экзоцитоза гранул тучных клеток — процессы, лежащие в основе морфологической гетерогенности, — остаются неясными, а вопрос функциональной значимости различий в распределении субпопуляций тучных клеток миокарда — открытым.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экспериментальной медицины (проект FGWG-2024-0015).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Атякшин Д.А., Бухвалов И.Б., Тиманн М. 2018. Протеазы тучных клеток в формировании специфического тканевого микроокружения: патогенетические и диагностические аспекты. Терапия. Т. 24. № 6. С. 128. (Atiakshin D., Buchwalow I., Tiemann M. 2018. Mast cell proteases in formation of the specific tissue

microenvironment: pathogenic and diagnostic aspects. Therapy. V. 24. P. 128.)

<https://dx.doi.org/10.18565/therapy.2018.6.128-140>

Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. 2021. Тучные клетки в головном мозге позвоночных — локализация и функции. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. Т. 57. № 1. С. 17. (Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. 2021. Mast cells in the vertebrate brain: localization and functions. J. Evol. Biochem. Physiol. V. 57. P. 17.)

<https://doi.org/10.31857/S0044452921010046>

Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. 2021. Тучные клетки и нейровоспаление в патогенезе нервных и психических заболеваний. Медицинский академический журнал. Т. 21. № 2. С. 7. (Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. 2021. Mast cells and neuroinflammation in pathogenesis of neurologic and psychiatric diseases. Medical Academic Journal. V. 21. № 2. P. 7.) <https://doi.org/10.17816/MAJ63228>

Гусельникова В.В., Бекоева С.А., Коржевская В.Ф., Федорова Е.А., Коржевский Д.Э. 2015. Гистохимическая и иммуногистохимическая идентификация тучных клеток миокарда человека. Морфология. Т. 147. № 2. С. 80. (Gusel'nikova V.V., Bekoyeva S.A., Korzhevskaya V.F., Fyodorova Y.A., Korzhevskiy D.E. 2015. Histochemical and immunohistochemical identification of human myocardial mast cells. Morfologiya. V. 147. № 2. P. 80.)

Цибулькина В.Н., Цибулькин Н.А. 2017. Тучная клетка как полифункциональный элемент иммунной системы. Аллергология и иммунология в педиатрии. Т. 49. № 2. С. 4. (Tsybulkina V.N., Tsybulkin N.A. 2017. Mast cell as poly-functional element of immune system. Allergol. Immunol. Pediatr. V. 49. № 2. P. 4.)

Alberti S. 2017. Phase separation in biology. Cur Biol. V. 27. Art. ID R1097.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.069>

Arvan P., Castle D. 1998. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. Biochem J. V. 332. P. 593. <https://doi.org/10.1042/bj3320593>

Atiakshin D., Patsap O., Kostin A., Mikhalyova L., Buchwalow I., Tiemann M. 2023. Mast cell tryptase and carboxypeptidase A3 in the formation of ovarian endometrioid cysts. Int. J. Mol. Sci. V. 24: 6498. <https://doi.org/10.3390/ijms24076498>

Braga T., Grujic M., Lukinius A., Hellman L., Abrink M., Pejler G. 2007. Serglycin proteoglycan is required for secretory granule integrity in mucosal mast cells. Biochemical J. V. 403. P. 49. <https://doi.org/10.1042/BJ20061257>

Blank U. 2011. The mechanisms of exocytosis in mast cells. Adv. Exp. Med. Biol. V. 716. P. 107. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9533-9_7

- Crivellato E., Nico B., Mallardi F., Beltrami C. A., Ribatti D.* 2003. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat. Rec. Part A*. V. 274. P. 778.
<https://doi.org/10.1002/ar.a.10095>
- Grigorev I.P., Korzhhevskii D.E.* 2021. Modern imaging technologies of mast cells for diology and medicine (Review). *Sovrem. Tekhnologii Med.* V. 13. P. 93.
<https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.10>
- Hammel I., Lagunoff D., Galli S.J.* 2010. Regulation of secretory granule size by the precise generation and fusion of unit granules. *J. Cell. Mol. Med.* V. 14. P. 1904.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01071.x>
- Irani A.A., Schechter N.M., Craig S.S., DeBlois G., Schwartz L.B.* 1986. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* V. 83. P. 4464.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4464>
- Irani A.M., Bradford T.R., Kepley C.L., Schechter N.M., Schwartz L.B.* 1989. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* V. 37. P. 1509.
<https://doi.org/10.1177/37.10.2674273>
- Jin J., Jiang Y., Chakrabarti S., Su Z.* 2022. Cardiac mast cells: a two-head regulator in cardiac homeostasis and pathogenesis following injury. *Front. Immunol.* V. 13. Art. ID 963444.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.963444>
- Juliano G.R., Skaf M.F., Ramalho L.S., Juliano G.R., Torquato B.G.S., Oliveira M.S., Oliveira F.A., Espindula A.P., Cavellani C.L., Teixeira V.P.A., Ferraz M.L.D.F.* 2020. Analysis of mast cells and myocardial fibrosis in autopsied patients with hypertensive heart disease. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. V. 39. P. 89.
<https://doi.org/10.1016/j.repc.2019.11.003>
- KleinJan A., Godthelp T., Blom H.M., Fokkens W.J.* 1996. Fixation with Carnoy's fluid reduces the number of chymase-positive mast cells: not all chymase-positive mast cells are also positive for tryptase. *Allergy*. V. 51. P. 614.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1996.tb04681.x>
- Kologrivova I., Shtatolkina M., Suslova T., Ryabov V.* 2021. Cells of the immune system in cardiac remodeling: Main players in resolution of inflammation and repair after myocardial infarction. *Front. Immunol.* V. 12: 664457.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664457>
- Levick S.P., Widiapradja A.* 2018. Mast cells: Key contributors to cardiac fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19: 231.
<https://doi.org/10.3390/ijms19010231>
- Mackins C.J., Kano S., Seyedi N., Schäfer U., Reid A.C., Machida T., Silver R.B., Levi R.* 2006. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. *J. Clin. Inv.* V. 116. P. 1063.
<https://doi.org/10.1172/JCI25713>
- Mulloy B., Lever R., Page C.P.* 2017. Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconj J.* V. 34. P. 351.
<https://doi.org/10.1007/s10719-016-9749-0>
- Reid A.C., Brazin J.A., Morrey C., Silver R.B., Levi R.* 2011. Targeting cardiac mast cells: pharmacological modulation of the local renin-angiotensin system. *Curr. Pharm. Des.* V. 17. P. 3744.
<https://doi.org/10.2174/138161211798357908>
- Sperr W.R., Bankl H.C., Mundigler G., Klappacher G., Grossschmidt K., Agis H., Simon P., Laufer P., Imhof M., Radaszkiewicz T., Glogar D., Lechner K., Valent P.* 1994. The human cardiac mast cell: localization, isolation, phenotype, and functional characterization. *Blood*. V. 84. P. 3876.
- Theoharides T.C., Twahir A., Kempuraj D.* 2023. Mast cells in the autonomic nervous system and potential role in disorders with dysautonomia and neuroinflammation. *Ann. Allergy, Asthma, Immunol.* V. 132. P. 440.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2023.10.032>
- Urata H., Boehm K.D., Philip A., Kinoshita A., Gabrovsek J., Bumpus F.M., Husain A.* 1993. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J. Clin. Inv.* V. 91. P. 1269.
<https://doi.org/10.1172/JCI116325>
- Weidner N., Austen K.F.* 1993. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol. Res. Pract.* V. 189. P. 156.
[https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(11\)80086-5](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(11)80086-5)
- Wernersson S., Pejler G.* 2014. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* V. 14. P. 478.
<https://doi.org/10.1038/nri3690>
- Von Zastrow M., Castle A.M., Castle J.D.* 1989. Ammonium chloride alters secretory protein sorting within the maturing exocrine storage compartment. *J. Biol. Chem.* V. 264. P. 6566.

HUMAN MYOCARDIAL MAST CELLS CONTAINING CHYMASE AND THEIR DETECTION USING VARIOUS ANTIBODIES

A. A. Beketova^a, *, O. V. Kirik^a, D. E. Korzhevskii^a

^a *Institute of Experimental Medicine, 197022, St. Petersburg, Russia*

* *E-mail: beketova.anastasiya@yandex.ru*

In last decades, special attention has been paid to the role of mast cells in the pathogenesis of cardiovascular diseases, including sudden cardiac death. One of the components of mast cell granules is chymase. For its specific detection, various reagents for immunohistochemistry, which have different specificity, are used. This circumstance does not allow us to accurately assess the subpopulations of myocardial mast cells. The purpose of this study was to evaluate the suitability of various reagents to selective detection of myocardial mast cells and to test the hypothesis of the existence of a population of mast cells staining with alcian blue and having chymase negative reaction. Analysis of the results of the various protocols presented in this work showed that, in comparison with goat polyclonal antibodies to chymase, mouse monoclonal antibodies have greater specificity, and preliminary staining of sections with alcian blue makes it possible to neutralize the nonspecific detection of cardiomyocyte lipofuscin. In addition, all the proposed protocols make it possible to detect the morphological heterogeneity of mast cells and their granules in the human myocardium.

Keywords: mast cells, chymase, human myocardium, immunohistochemistry

УДК 577.334

ХЛОРНОВАТИСТАЯ КИСЛОТА – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ВТОРИЧНЫЙ МЕССЕНДЖЕР В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛОВ

© 2024 г. Г. Н. Семенкова¹, И. И. Жолнеревич², М. А. Мурина³,
Н. В. Амаэгбери^{2,*}, Д. И. Рощупкин⁴

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, 220083, Белоруссия

²Белорусский государственный университет, Минск, 220030, Белоруссия

³Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435, Россия

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
Москва, 117513, Россия

*E-mail: n.amaegberi@gmail.com

Поступила в редакцию 17.09.2024

После доработки 24.09.2024

Принята к публикации 25.09.2024

Хлорноватистая кислота и гипохлорит-ионы (HOCl/OCl^-) образуются в галогенирующем цикле миелопероксидазы, локализованной преимущественно в нейтрофилах, и играют первостепенную роль в антимикробной защите. В работе представлены результаты исследования влияния экзогенных HOCl/OCl^- в микромолярных концентрациях на механизмы формирования респираторного взрыва стимулированными к фагоцитозу нейтрофилами. Показано, что этот окислитель способен оказывать стимулирующее действие на функциональную активность нейтрофилов, что выражается в увеличении выхода активных форм кислорода и хлора (АФКХ) и секреторной дегрануляции клеток. Усиление респираторного взрыва связано с активацией НАДФН-оксидазы, ФИ-3К, MAP-киназ ERK1/2 и уменьшением вклада внутриклеточной миелопероксидазы в продукцию АФКХ нейтрофилами. Установлено, что HOCl/OCl^- в исследуемых концентрациях способны ингибировать активность миелопероксидазы. Сделано предположение, что хлорноватистую кислоту следует рассматривать в качестве нового потенциального вторичного мессенджера, регулирующего функции нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, хлорноватистая кислота, NaOCl , активные формы кислорода и хлора, миелопероксидаза, секреторная дегрануляция

Принятые сокращения: АФКХ – активные формы кислорода и хлора; МПО – миелопероксидаза; СБСРЭ – сбалансированный буферный солевой раствор Эрла; ФИ-3К – фосфатидилинозитол-3-киназа; ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат; ХЛ и Люм-ХЛ – хемилюминесценция и люминолзависимая ХЛ соответственно; АВАН – гидразид 4-аминобензойной кислоты; DPI – хлорид дифенилениодония; PI – йодистый пропидий.

DOI: 10.31857/S0041377124050071, EDN: DUNSPQ

Хлорноватистая кислота и ионы гипохлорита (HOCl/OCl^-) образуются в галогенирующем цикле гемсодержащих пероксидаз млекопитающих, важнейшей из которых является миелопероксидаза (МПО) (донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза, ЕС 1.11.1.7), локализованная преимущественно в нейтрофилах (Arnhold, Malle, 2022). Стимуляция нейтрофилов к фагоцитозу сопровождается усилением генерации супероксидных анион-радикалов (O_2^-) НАДФН-оксидазой

этих клеток (Zeng et al., 2019). Под действием супероксиддисмутазы O_2^- спонтанно трансформируется в пероксид водорода, который в реакции, катализируемой МПО, взаимодействует с хлорид-ионами с образованием HOCl/OCl^- . Хлорноватистая кислота является высокореакционным интермедиатом и участвует в реакциях хлорирования и окисления, модифицируя или фрагментируя белки, ДНК, липиды и другие соединения (Prütz, 1996; Panasenکو et

al., 2007; Winter et al., 2008; Andrés et al., 2022). Благодаря этим свойствам, HOCl уничтожает патогены. Однако, гиперпродукция HOCl может приводить к цитотоксическим эффектам в отношении клеток хозяина и провоцировать воспаление, которое является причиной развития ряда патологий, таких как сердечно-сосудистые (Teng et al., 2017; Ndrepera, 2019), ревматоидные (Fernandes et al., 2012; Leopold, Schiller, 2024), нейродегенеративные и др. (Ray, Katyal, 2016; Pravalika et al., 2018). Выявлено, что в очаге воспаления количество МПО, секретируемой накопленными нейтрофилами, достигает 1–2 мМ (Weiss, 1989; Kettle, Winterbourn, 1994; Hampton et al., 1998), а в интерстициальной жидкости воспаленных тканей фагоциты продуцируют до 25–50 мМ/ч HOCl (Ulfig, Leichert, 2021). В результате МПО и ее основной продукт HOCl в высоких концентрациях регулируют ряд событий в очаге воспаления посредством структурной модификации биологически важных молекул или их деструкции.

Молекулярные механизмы цитодеструктивного и регуляторного действия хлорноватистой кислоты в высоких концентрациях при воспалении активно изучаются, но остается до конца невыясненной роль этого соединения в низких концентрациях в процессах метаболизма. В настоящее время доказано участие пероксида водорода в процессах сигнализации (Gamaley et al., 1994; Kulahava et al., 2007; Ткачук и др., 2012; Sies, 2017; Fichman et al., 2024). Следует отметить, что уже существуют данные о способности HOCl выполнять функцию сигнальной молекулы. Показано, что экзогенная хлорноватистая кислота усиливает образование супероксидных анион-радикалов и индуцирует апоптоз в опухолевых клетках (Bauer, 2018; Семенкова и др., 2024), вызывает транслокацию транскрипционных факторов в ядро Т-лимфоцитов (Schoonbroodt et al., 1997), активирует белки-супрессоры опухолей и тем самым регулирует рост клеток (Vile et al., 1998), контролирует активность металлопротеиназ (Fu et al., 2004; Wang et al., 2022).

Ранее нами установлено, что для стимулированных адгезией нейтрофилов, подвергшихся воздействию нетоксичных концентраций NaOCl, характерно нарушение клеточной подвижности, изменение формы и размеров клеток, происходит реорганизация цитоскелета, обусловлен-

ная перераспределением F-актина (Kuznetsova et al., 2017). Это позволяет предположить, что хлорноватистая кислота в микромолярных концентрациях может влиять на функциональную активность нейтрофилов.

Цель настоящей работы заключалась в изучении механизмов влияния экзогенной хлорноватистой кислоты в микромолярных концентрациях на формирование респираторного взрыва нейтрофилами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали: декстран-500, гистопак-1077, люминол, среду RPMI-1640, пептид fMLP (N-формилметионил-лейцил-фенилаланин), пероксид водорода, гипохлорит натрия, PD-98059 (2-(2-амино-3-метоксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он), DPI (хлорид дифенилениодония), АВАН (гидразид 4-аминобензойной кислоты), LY294002 (2-(морфолин-4-ил)-8-фенил-4Н-1-бензопиран-4-он), LPS (липополисахарид В), ФМА (форбол-12-миристан-13-ацетат), ФГА (фитогемагглютинин), GSH (восстановленный глутатион), бактерии *Micrococcus lysodeikticus*, МПО, Triton X-100, Hepes (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), PI (йодистый пропиций) (все реактивы фирмы Sigma, США); ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин; Carl Roth, Германия); суспензию латекса для фагоцитоза (1.5 мкм; “ПанЭко”, Россия). Компоненты для приготовления фосфатного (PBS), фосфат-цитратного буферных растворов, а также сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) получены от фирм “Анализ Х” (Белоруссия) и “Реахим” (Россия).

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной крови кроликов и здоровых людей в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике (Böyum, 1976). Клетки суспендировали в среде RPMI-1640 (pH 7.4). Полученные суспензии хранили при температуре тающего льда. Жизнеспособность клеток, оцениваемая с помощью трипанового синего, составляла 95–97%. Перед изучением функциональной активности клетки переводили в раствор СБСРЭ, pH 7.4.

Рабочие растворы гипохлорита натрия (NaOCl) готовили из его коммерческого 5%-го раствора путем разбавления раствором 0.15 М NaCl пе-

ред началом эксперимента. Концентрацию гипохлорит-ионов определяли спектрофотометрически по поглощению OCl^- при 290 нм и pH 12 (молярный коэффициент экстинкции $\varepsilon_{290} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Morris, 1966). Конечное значение pH в экспериментах было примерно таким же, как pKa для HOCl (7.5), поэтому предполагается, что в растворе присутствуют примерно равные количества HOCl и OCl^- . К контрольным образцам добавляли соответствующее количество 0.15 M NaCl .

Регистрация активных форм кислорода и хлора (АФКХ). Генерацию АФКХ нейтрофилами человека изучали методом люминол-зависимой хемилюминесценции (Люм-ХЛ) на биохемилюминометре БХЛ-1 (БГУ, Белоруссия) с использованием системы сбора и обработки данных “Юнихром” (“Новые аналитические системы”, Белоруссия). Люм-ХЛ нейтрофилов кролика регистрировали на люмиагрегометре (P.I.C.A.) (Chrono-log Corporation, США). Концентрация люминола составляла 20 мкмоль/л, нейтрофилов в суспензии – 1 млн/мл. Нейтрофилы стимулировали к фагоцитозу добавлением к суспензии клеток в СБСРЭ 0.1 мкМ fMLP или 25 мкг/мл LPS, или 5 мкг/мл ФМА, или 20 мкл суспензии латекса, или адгезией к поверхности кварцевого стекла. NaOCl добавляли к суспензии клеток в СБСРЭ до внесения стимулятора и люминола. Пробоподготовку и регистрацию Люм-ХЛ проводили при температуре 37 °C. Интенсивность свечения выражали в усл. ед. На рисунках представлены усредненные зависимости интегральной интенсивности ХЛ по данным не менее 5 независимых экспериментов. Интегральную интенсивность определяли как площадь под кинетической кривой интенсивности ХЛ люминола в суспензии нейтрофилов, рассчитанной с момента начала стимуляции в течение 10 мин регистрации. Светосумму рассчитывали численным интегрированием кривой интенсивности с использованием метода прямоугольников (программа Excel 2000).

Использование ингибиторов. Влияние NaOCl на процессы внутриклеточной сигнализации в нейтрофилах определяли с помощью специфических ингибиторов компонентов сигнальных путей, вовлеченных в генерацию АФКХ: DPI для НАДФН-оксидазы; АВАН для МПО; вещество PD-98059 для MAP-киназы ERK1/2; вещество LY-294002 для фосфатиди-

линозитол-3-киназы (ФИ-3К). NaOCl вносили в суспензию клеток за 10 мин до введения ингибиторов, на 20 мин, затем нейтрофилы стимулировали адгезией и регистрировали Люм-ХЛ.

Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из клеток (Shugar, 1952). Активность лизоцима в супернатанте оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрически при длине волны 450 нм на спектрофлуориметре СМ 2203 (“Солар”, Минск, Белоруссия). Предварительно свежеизолированные нейтрофилы обрабатывали NaOCl в соответствующей концентрации и инкубировали в СБСРЭ pH 7.4 в течение 15 мин при температуре 37 °C.

Пероксидазную активность МПО определяли по скорости окисления ТМБ пероксидом водорода в присутствии МПО в окрашенный продукт – 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндиимин (Pulli et al., 2013). В фосфат-цитратный буферный раствор (pH 5.0) добавляли МПО (2 ед./мл), NaOCl в концентрации из диапазона 1–100 мкМ и инкубировали 10 мин при 37 °C. Затем вносили 1.6 мМ ТМБ. Реакцию инициировали добавлением 0.3 мМ H_2O_2 , через 5 мин реакцию останавливали добавлением 2 н раствора серной кислоты. Оптическую плотность регистрировали на спектрофлуориметре СМ2203 при длине волны 450 нм. Для расчета концентрации продукта ферментативной реакции использовали $\varepsilon = 5.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Жизнеспособность клеток оценивали флуоресцентным методом с использованием йодистого пропидия (PI; длина волны возбуждения и регистрации соответственно 530 и 640 нм) на спектрофлуориметре СМ 2203. Суспензию нейтрофилов (1 млн/мл в СБСРЭ) контрольную и содержащую NaOCl (5–100 мкМ) инкубировали в течение 15 мин при 37 °C. Затем к образцам добавляли 10 мкМ раствора PI. Клетки перемешивали, выдерживали в течение 5 мин и измеряли интенсивность флуоресценции F_{d1} . Затем клетки разрушали с помощью 10%-ного раствора тритон X-100 и регистрировали интенсивность флуоресценции F_{t1} . Жизнеспособность клеток определяли по формуле:

$$\frac{(F_{t1} - F_{t2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{t1} - F_{t2})} \cdot 100\%,$$

где F_{d1} , F_{t2} — параметры интенсивности флуоресценции PI в клеточной суспензии в отсутствие (F_{d1}) и в присутствии (F_{t1}) тритона X-100, F_{d2} и F_{t2} — параметры интенсивности флуоресценции PI в СБСРЭ в отсутствие (F_{d2}) и в присутствии (F_{t2}) тритона X-100 соответственно (Kato et al., 1999).

Статистическая обработка результатов. Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Различия между контрольной и экспериментальной группами анализировали с помощью теста Даннета. Результаты представлены в виде среднего значения из трех и более независимых экспериментов и его стандартного отклонения. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано действие гипохлорита натрия на усиленную люминолом ХЛ стимулированных ФМА нейтрофилов крови кролика (рис. 1). Установлено, что характер действия NaOCl зависит от его концентрации. В низкой концентрации (5–10 мкМ) наблюдается усиление ХЛ; как правило, введение 5–10 мкМ NaOCl сопровождается усилением интенсивности свечения в максимуме в 2.5–3 раза соответственно по сравнению с контролем. Следовательно, в низких концентрациях экзогенный гипохлорит оказывает синергический (стимулирующий) эффект: в сочетании с агонистом (ФМА) резко усиливает ХЛ в системе стимулированные нейтрофилы–люминол. При более высоких концентрациях NaOCl (20–40 мкМ) наблюдается практически полное снижение интенсивности свечения (рис. 1, кривые 4, 5). По-видимому, тушение Люм-ХЛ в суспензии нейтрофилов гипохлоритом натрия в концентрации свыше 20 мкМ свидетельствует о подавлении функциональной активности самих клеток.

Подобный эффект был зарегистрирован нами при изучении влияния NaOCl на способность нейтрофилов крови человека генерировать АФКХ. Как видно из рис. 2, преинкубирование нейтрофилов в течение 10 мин с NaOCl приводит к значительному повышению интенсивности Люм-ХЛ при стимуляции к фагоцитозу как специфическими (fMLP, LPS), так и неспецифическими (латекс и адгезия) стимуляторами (рис. 2а, б), что свидетельствует об усилении

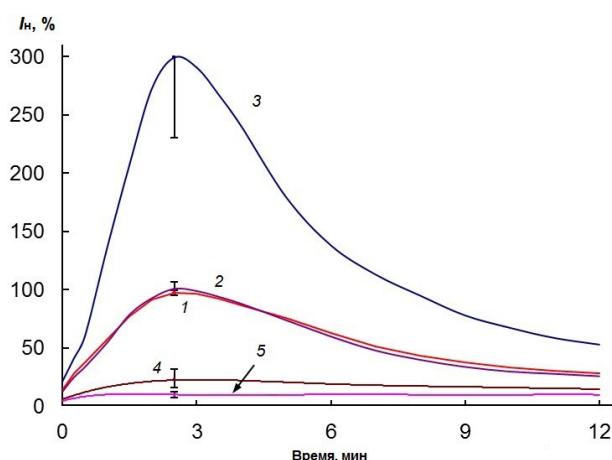


Рис. 1. Кинетические кривые интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов кролика, стимулированных ФМА в контроле (1) и при действии гипохлорита натрия (2–5) соответственно в конечных концентрациях 1, 10, 20 и 40 мкМ. ФМА (5 мкг/мл) вводили в суспензию нейтрофилов (10^6 клеток в 1 мл) сразу после люминола (20 мкМ). Время предварительного инкубирования клеток с гипохлоритом натрия 5 мин. I_n , (%) — нормированная интенсивность ХЛ: в контроле (1) в максимуме интенсивности свечения принята за 100%. Представлены усредненные зависимости интенсивности ХЛ по данным 10 независимых экспериментов; разброс данных представлен среднеквадратичной ошибкой средней величины.

генерации АФКХ. Увеличение интенсивности ХЛ клеток по сравнению с контролем наблюдается в диапазоне концентраций NaOCl от 7.5 до 75 мкМ (а в случае стимуляции адгезией — до 50 мкМ). Так, при добавлении 15 мкМ NaOCl к суспензии клеток за 30 мин до начала их адгезии к поверхности стекла интегральная интенсивность Люм-ХЛ повышается более чем в 3 раза по сравнению с контролем. При использовании других стимуляторов фагоцитоза выход Люм-ХЛ повышался в 1.5–2 раза.

Известно, что NaOCl сам индуцирует ХЛ люминола (Рощупкин и др., 2006). При этом NaOCl, вносимый в раствор этого индикатора, вызывает кратковременную вспышку ХЛ, длительность которой не превышает 3–5 с.

Чтобы исключить вклад в ХЛ нейтрофилов свободнорадикальных продуктов, образуемых при взаимодействии люминола с NaOCl, нами изучена зависимость максимальной интенсивности ХЛ, возникающей в реакции окисления люминола NaOCl в исследуемом диапазоне концентраций. Как показано на рис. 3, свечение практически не регистрируется при концентрации гипохлорита натрия от 1.5 до 45 мкМ.

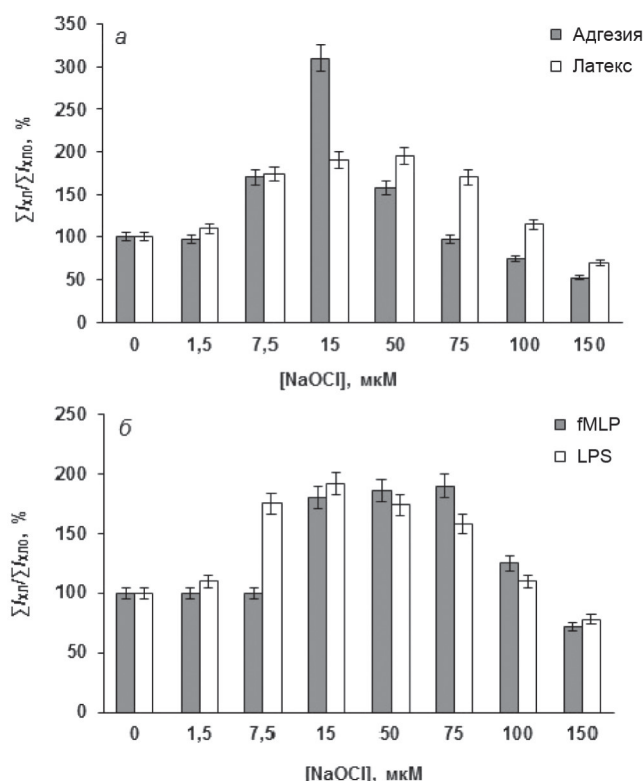


Рис. 2. Зависимость суммарной интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов человека, стимулированных латексом и адгезией (а), а также fMLP и LPS (б), от концентрации NaOCl. Интегральная интенсивность ХЛ клеток в присутствии (ΣI_{chl}) и в отсутствие (ΣI_{chl0}) NaOCl измерена в течение 10 мин с момента добавления люминола. Концентрация fMLP – 0,1 мкМ, LPS – 25 мкг/мл. Время предварительного инкубирования нейтрофилов с NaOCl 10 мин. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

Дальнейшее повышение концентрации NaOCl до 150 мкМ приводило к увеличению выхода радикальных продуктов. Причем, зарегистрированная в первые 3–5 с максимальная интенсивность ХЛ была в десятки раз выше, чем в системе NaOCl–люминол–нейтрофилы. Следовательно, представленные на рис. 1 и 2 данные не связаны с прямым взаимодействием люминола с NaOCl, а обусловлены изменением функциональной активности нейтрофилов.

Образование АФКХ в нейтрофилах при их стимуляции к фагоцитозу сопряжено с активацией мембранных рецепторов, что в дальнейшем приводит к запуску процессов внутриклеточной сигнализации, включающих сборку НАДФН-оксидазного комплекса и усиление транслокации МПО к плазматической мембране (Zeng et al., 2019). Как уже отмечалось, некото-

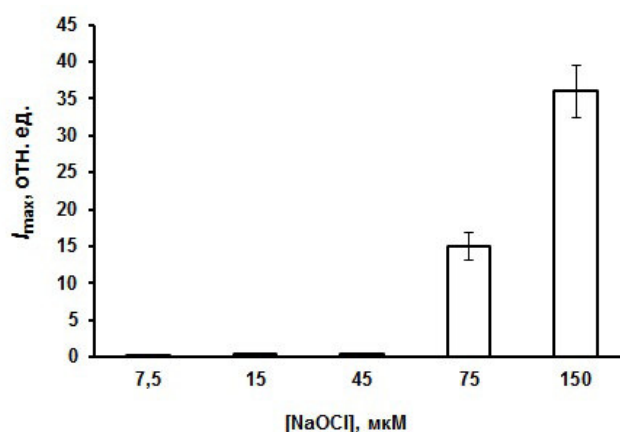


Рис. 3. Зависимость максимальной интенсивности хемилюминесценции (I_{max}) от концентрации гипохлорита натрия (NaOCl) в реакции окисления им люминола. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

рые типы активных форм кислорода, в частности H_2O_2 , играют роль вторичных мессенджеров в формировании функционального отклика клеток (Kulahava et al., 2007; Ткачук и др., 2012). Нами изучено влияние на генерацию АФКХ специфических ингибиторов ферментов, участвующих в процессах трансдукции активационного сигнала в нейтрофилах, до и после их предварительного инкубирования с 15 мкМ NaOCl (рис. 4).

После обработки клеточной суспензии гипохлоритом натрия степень ингибирования продукции АФКХ нейтрофилами возрастает при подавлении активности НАДФН-оксидазы с помощью DPI, ФИ-3К – веществом LY-294002 и ERK1/2 – веществом PD-98059. При этом степень ингибирования АФКХ значительно снижается при блокировании активности МПО с помощью АВАН. Из этих данных следует, что преинкубирование нейтрофилов с 15 мкМ NaOCl приводит к перераспределению вклада ферментов, продуцирующих активные метаболиты: уменьшается продукция хлорноватистой кислоты ферментом МПО и увеличивается образование супероксидных анион-радикалов НАДФН-оксидазой, что приводит к увеличению выхода пероксида водорода в результате дисмутации O_2^- .

Обработка клеток, предварительно инкубированных со специфическими ингибиторами ФИ-3К и ERK1/2, а также NaOCl, приводит к значительному повышению степени инги-

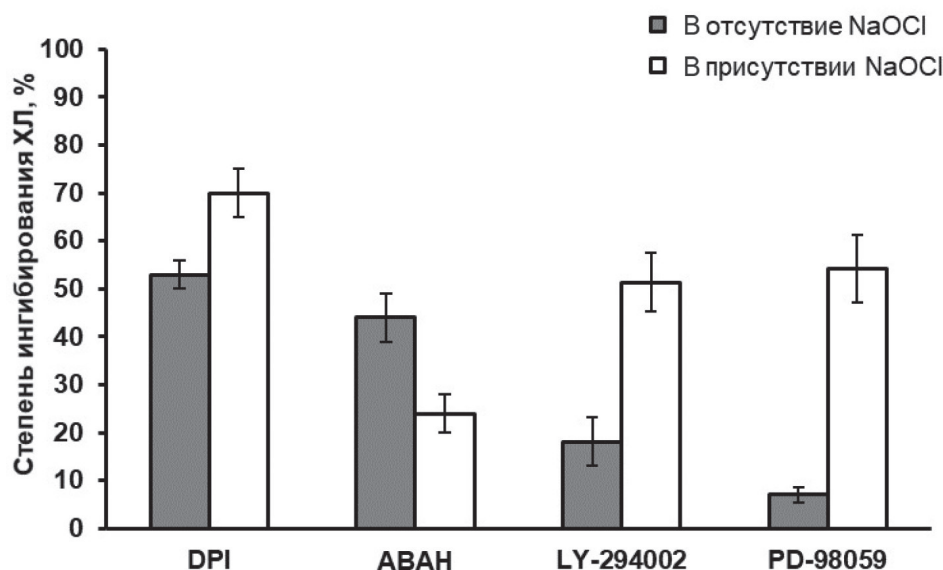


Рис. 4. Влияние ингибиторов ферментов на степень ингибирования люминол-зависимой ХЛ нейтрофилов крови человека в присутствии (светлые столбики) и в отсутствие (темные столбики) NaOCl (15 мкМ). Клетки стимулировали адгезией к поверхности стекла. Время предварительного инкубирования нейтрофилов с NaOCl – 30 мин, время регистрации ХЛ – 10 мин; температура – 37 °С, pH 7.4. Показаны ингибиторы: НАДФН-оксидазы (DPI, 1 мкМ); миелопероксидазы (ABAN, 50 мкМ); фосфатидилинозитол-3-киназы (LY-294002, 3.5 мкМ) и MAP-киназы ERK1/2 (PD-98059, 25 мкМ). По вертикали указана степень ингибирования ХЛ ($(\Sigma I_0 - \Sigma I_i) / \Sigma I_0 \cdot 100\%$), где ΣI_0 и ΣI_i – суммарная интенсивность свечения клеток в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

бирования ХЛ, что свидетельствует об увеличении вклада этих белков в генерацию АФКХ нейтрофилами по сравнению с контролем. Увеличение вклада ФИ-3К и ERK1/2 в усиленное под действием NaOCl образование АФКХ свидетельствует о модификации сигнальных путей с вовлечением этих ферментов в формирование респираторного взрыва. Известно, что ФИ-3К участвует в активации НАДФН-оксидазы, способствует перераспределению F-актина и секреторной дегрануляции (Hirsch et al., 2000; Paclet et al., 2022). ERK1/2 также усиливает секреторную дегрануляцию нейтрофилов (Hu et al., 2015). Как показано нами ранее, в первые минуты действия на нейтрофилы 15 мкМ NaOCl происходит опосредованная перераспределением F-актина реорганизация цитоскелета, изменяется форма и размеры клеток, повышается их адгезивность (Kuznetsova et al., 2017).

Важным свойством стимулированных к фагоцитозу нейтрофилов является секреторная дегрануляция. В результате этого процесса из клеток во внеклеточное пространство выделяется содержимое азурофильных гранул, включающих лизоцим, МПО, кислые гидролазы, эластазу и другие ферменты, которые обеспечивают уничтожение чужеродного материала (Lacy,

2006). На рис. 5 показано влияние NaOCl на секрецию лизоцима из нейтрофилов. Видно, что инкубирование клеток с 1.5–5 мкМ NaOCl в течение 15 мин не влияет на выход лизоцима во внеклеточную среду, тогда как в диапазоне концентраций этого окислителя от 7.5 до 50 мкМ секреция лизоцима дозозависимо усиливается,

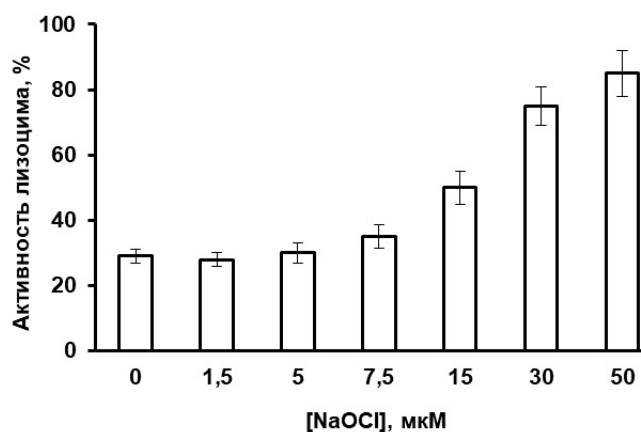


Рис. 5. Влияние гипохлорита натрия на секрецию лизоцима из нейтрофилов крови человека. Время инкубирования клеток с NaOCl – 15 мин. Секрецию лизоцима оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus*. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

что также подтверждает стимулирующее действие гипохлорита натрия на нейтрофилы.

Усиление секреторной дегрануляции нейтрофилов под действием NaOCl приводит к повышению выхода МПО во внеклеточную среду. При этом оценка вклада этого фермента в продукцию АФКХ внутри клеток (см. рис. 4) указывает на его снижение. Увеличение выхода ферментов из клеток может быть связано с цитодеструкцией. Чтобы исключить цитодеструктивное действие NaOCl, мы изучили его влияние на жизнеспособность клеток с использованием PI. Как видно из табл. 1, через 15 мин после добавления NaOCl в концентрации от 5 до 100 мкМ жизнеспособность нейтрофилов по сравнению с контролем уменьшается не более, чем на $12.8 \pm 3.2\%$. Из этого следует, что зарегистрированное нами усиление генерации АФКХ нейтрофилами после добавления NaOCl (рис. 2) в диапазоне концентраций 7.5–75 мкМ обусловлено стимулирующим действием гипохлорита на функциональную активность клеток и не связано с его цитотоксичностью.

Учитывая способность хлорноватистой кислоты эффективно взаимодействовать с молекулами белков (Prütz, 1996; Panasenکو et al., 2007), мы исследовали влияние NaOCl на пероксидазную активность МПО (рис. 6). Видно, что гипохлорит натрия в концентрациях от 5 до 100 мкМ дозозависимо снижает активность анализируемого фермента. Следовательно, экзогенный гипохлорит натрия в низких концентрациях способен значительно уменьшать активность секретированной из клеток МПО.

Таблица 1. Влияние гипохлорита натрия на жизнеспособность нейтрофилов

Концентрация NaOCl, мкМ	Жизнеспособность, %
0	100
5	97.7 ± 1.8
15	95.8 ± 2.2
30	94.3 ± 2.6
50	90.4 ± 2.5
75	89.5 ± 2.9
100	87.2 ± 3.2

Примечание. Клетки инкубировали с NaOCl в течение 15 мин.

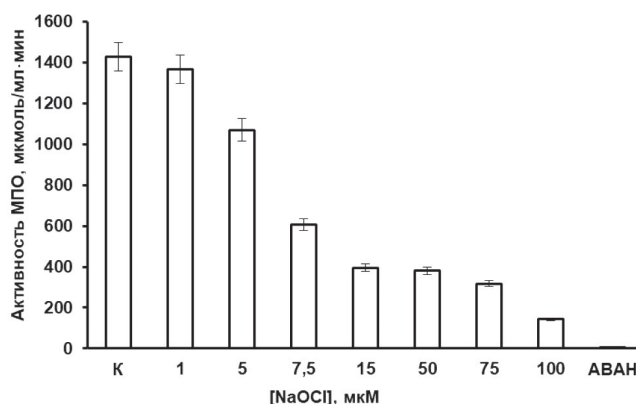


Рис. 6. Активность МПО под действием гипохлорита натрия. Время предварительного инкубирования NaOCl/АВАН с МПО – 10 мин. Концентрация АВАН – 1 мкМ. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

Ранее установлено, что гипохлорит натрия с наибольшей константой скорости реагирует с сульфгидрильными группами молекул, затем инактивируются тиоэфирные и только после этого аминокислотные группы (Мурина и др., 1989; Folkes et al., 1995). На основании этих данных можно предположить, что в нашем случае гипохлорит натрия, взаимодействуя в первую очередь с сульфгидрильными и, возможно, с другими функциональными группами мембранных белков нейтрофилов, преактивирует (праймирует) клетки, что приводит к усилению респираторного взрыва в ответ на различные стимулы. Известно, что для избирательной нейтрализации экстраклеточных оксидантов можно применять непроникающий в клетки восстановленный глутатион, действие которого обусловлено исключительно наличием сульфгидрильной группы.

Использование восстановленного глутатиона позволяет отделить АФКХ, образуемые внутри клеточных структур и генерируемые в окружающей среде (Мурина и др., 2005). Восстановленный глутатион добавляли к суспензии нейтрофилов кроликов после их инкубации в течение 3 мин с 5 мкМ NaOCl до добавления ФМА (рис. 7). Введение восстановленного глутатиона в суспензию нейтрофилов вызывает уменьшение интенсивности Люм-ХЛ в максимуме примерно на 30–35% (рис. 7, кривая 2). После добавления гипохлорита натрия (рис. 7, кривая 3), тушение ХЛ в этой системе восстановленным глутатионом было больше и составляло примерно 55% (рис. 7, кривая 4). Свечение, которое остается после действия восстановленного глутатио-

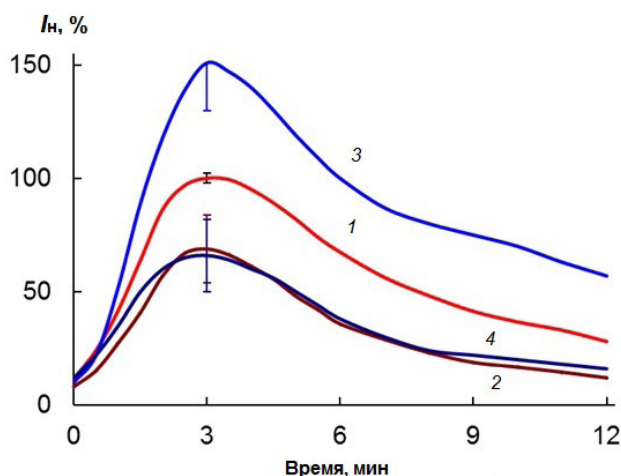


Рис. 7. Действие восстановленного глутатиона (GSH) на усиленную гипохлоритом хемилюминесценцию люминола в суспензии нейтрофилов крови кролика. Кривая 1 — контроль (к нейтрофилам добавлен люминол и ФМА); 2 — GSH (0.2 mM) введен в суспензию нейтрофилов до ФМА; 3 — NaOCl (5 мкМ) введен в суспензию нейтрофилов за 3 мин до ФМА; 4 — NaOCl (5 мкМ) введен в суспензию нейтрофилов за 3 мин до GSH (0.2 mM) и ФМА. I_n — нормированная к контролю (100% в максимуме) интенсивность ХЛ. Представлены усредненные зависимости интенсивности ХЛ по данным пяти независимых опытов; разброс данных представлен среднеквадратичной ошибкой средней величины.

на как в присутствии (рис. 7, кривая 4), так и в отсутствие (рис. 7, кривая 2) экзогенного NaOCl, составляет примерно 65% по сравнению с контролем (рис. 7, кривая 1). Следовательно, восстановленный глутатион полностью подавляет усиленную гипохлоритом Люм-ХЛ нейтрофилов, обусловленную окислением люминола экстраклеточными оксидантами. Причем среди таких оксидантов основным является хлорноватистая кислота, генерируемая МПО, секреция которой во внеклеточную среду, как это следует из рис. 5, усиливается под действием экзогенного NaOCl.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных данных следует, что хлорноватистая кислота и ионы гипохлорита в микромолярных концентрациях способны оказывать стимулирующее воздействие на функциональную активность нейтрофилов, что выражается в увеличении выхода АФКХ и усилении секреторной дегрануляции клеток, обработанных индукторами фагоцитоза. Наблюдаемые эффекты связаны с перераспределением вклада компонен-

тов трансдукции активационного сигнала в формирование респираторного взрыва, а именно: с активацией ФИ-3К и MAP-киназы ERK1/2. Индуцируемое HOCl/OCl⁻ повышение выхода АФКХ обусловлено усиленной продукцией под действием НАДФН-оксидазы супероксидных анион-радикалов, дисмутация которых приводит к избыточному образованию субстрата МПО пероксида водорода. Из этого следует, что под действием хлорноватистой кислоты во внеклеточной среде, где уровень МПО повышен в результате секреции содержимого азурофильных гранул, продуцируется дополнительное количество HOCl/OCl⁻. Однако образование этого окислителя не настолько велико, чтобы оказывать цитодеструктивный эффект, поскольку он дозозависимо ингибирует активность МПО. Мы полагаем, что образуемую под действием МПО хлорноватистую кислоту следует рассматривать в качестве нового потенциального вторичного мессенджера, который способен регулировать функции нейтрофилов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований “Фундаментальные основы биотехнологий” (№ 20115801), Республика Беларусь.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Забор крови у здоровых добровольцев осуществляли после информированного согласия. Исследование с использованием нейтрофилов кроликов проведено с соблюдением стандартов работы с животными и было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол заседания № 2022/10/05 от 05 октября 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.Г.Н.: оригинальная идея и схема экспериментов, анализ и интерпретация полученных данных, написание рукописи; Ж.И.И.: проведение исследований, обсуждение результатов, подготовка статьи; М.М.А.: изучение хемилю-

минесценции нейтрофилов крови кроликов, обсуждение результатов, подготовка статьи; А.Н.В.: измерение хемилюминесценции нейтрофилов, обработка результатов, подготовка статьи; Р.Д.И.: обсуждение результатов исследований, подготовка статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мурина М.А., Сергиенко В.И., Рошчупкин Д.И. 1989. Прямое и косвенное противоагрегационное действие гипохлорита натрия на обогащенную тромбоцитами плазму крови. Бюл. exper. биол. мед. Т. 107. № 12. С. 702. (Murina M.A., Sergienko V.I., Roshchupkin D.I. 1989. Direct and indirect antiaggregatory effect of sodium hypochlorite on platelet-rich blood plasma. Bull. Exp. Biol. Med. V. 107. No. 12. 2008. P. 702.)
- Мурина М.А., Рошчупкин Д.И., Белакина Н.С., Филиппов С.В., Халилов Э.М. 2005. Усиленная люминолом хемилюминесценция стимулированных полиморфноядерных лейкоцитов: тушение тиолами. Биофизика. Т. 50. № 6. 1100. (Murina M.A., Roshchupkin D.I., Belakina N.S., Filippov S.V., Khalilov E.M. 2005. Luminol-enhanced chemiluminescence of stimulated polymorphonuclear leukocytes: quenching by thiols. Biophysics. V. 50. No. 6. P. 1100.)
- Рошчупкин Д.И., Белакина Н.С., Мурина М.А. 2006. Усиленная люминолом хемилюминесценция полиморфноядерных лейкоцитов кролика: природа оксидантов, непосредственно вызывающих окисление люминола. Биофизика. Т. 51. № 1. С. 99. (Roshchupkin D.I., Belakina N.S., Murina M.A. 2006. Luminol-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: the nature of oxidants directly responsible for luminol oxidation, Biofizika. V. 51. No. 1. P. 99.)
- Семенкова Г.Н., Квачева З.Б., Жолнеревич И.И., Амазгери Н.В., Пинчук С.В. 2024. Гипохлорит-индуцированная модификация свойств астроцитов. Новости медико-биологических наук. Т. 24. № 1. С. 74. (Semenkova G.N., Kvacheva Z.B., Zholnerevich I.I., Amaegberi N.V., Pinchuk S.V. 2024. Hypochlorite-induced modification of astrocyte properties. News of medical and biological sciences. V. 24. No. 1. P. 74.)
- Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воротников А.В. 2012. Пероксид водорода как новый вторичный посредник. Биологические мембраны. Т. 29. № 1–2. С. 21. (Tkachuk V.A., Tyurin-Kuzmin P.A., Belousov V.V., Vorotnikov A.V. 2012. Hydrogen peroxide as a new secondary messenger. Biological membranes. V. 29. No. 1–2. P. 21.)
- Andrés C.M.C., Pérez de la Lastra J.M., Juan C.A., Plou F.J., Pérez-Lebeña E. 2022. Hypochlorous acid chemistry in mammalian cells-influence on infection and role in various pathologies. Int. J. Mol. V. 23. Art. ID 10735.
- Arnhold J., Malle E. 2022. Halogenation activity of mammalian heme peroxidases. Antioxidants. V. 11. P. 890.
- Bauer G. 2018. HOCl and the control of oncogenesis. J. Inorg. Biochem. V. 179. P. 10.
- Bøyum A. 1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. V. 5. P. 9.
- Fernandes R.M. da Silva N.P., Sato E.I. 2012. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. Rheumatol. Int. V. 32. P. 1605.
- Fichman Y., Rowland L., Nguyen T.T., Chen S.-J., Mittler R. 2024. Propagation of a rapid cell-to-cell H₂O₂ signal over long distances in a monolayer of cardiomyocyte cells. Redox Biol. V. 70. Art. ID 103069.
- Folkes L.K., Candeias L.P., Wardman P. 1995. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. Arch. Biochem. Biophys. V. 323. P. 120.
- Fu X., Kao J.L., Bergt C., Kassim S.Y., Huq N.P., d'Avignon A., Parks W.C., Mecham R.P., Heinecke J.W. 2004. Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. J. Biol. Chem. V. 279. P. 6209.
- Gamaley I.A., Kirpichnikova K.M., Klyubin I.V. 1994. Activation of murine macrophages by hydrogen peroxide. Cell Signal. V. 6. P. 949.
- Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood. V. 92. P. 3007.
- Hirsch E., Katanaev V.L., Garlanda C., Azzolino O., Pirolla L., Silengo L., Sozzani S., Mantovani A., Altruda F., Wymann M.P. 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-Kinase γ in inflammation. Science. V. 287. P. 1049.
- Hu N., Qiu Y., Dong F. 2015. Role of Erk1/2 signaling in the regulation of neutrophil versus monocyte development in response to G-CSF and M-CSF. J. Biol. Chem. V. 290. P. 24561.
- Kato F., Tanaka M., Nakamura K. 1999. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents. Toxicol. in Vitro. V. 13. P. 923.
- Kettle A.J., Winterbourn C.C. 1994. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. Methods Enzymol. V. 233. P. 502.
- Kulahava T.A., Semenkova G.N., Kvacheva Z.B., Cherenkevich S.N. 2007. Regulation of morphological and

- functional properties of astrocytes by hydrogen peroxide. *Cell Tissue Biol.* V. 1. P. 8.
- Kuznetsova T., Kulahava T., Zholnerevich I., Amaegberi N., Semenkov G., Shadyro O., Arnhold J. 2017. Morphometric characteristics of neutrophils stimulated by adhesion and hypochlorite. *Mol. Immunol.* V. 87. P. 317.
- Lacy P. 2006. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* V. 2. P. 98.
- Leopold J., Schiller J. 2024. (Chemical) Roles of HOCl in rheumatic diseases. *Antioxidants (Basel).* V. 13. P. 921.
- Morris J.C. 1966. The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. *J. Phys. Chem.* V. 70. № 12. P. 3798.
- Ndrepepa G. 2019. Myeloperoxidase — A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta.* V. 493. P. 36.
- Paclet M.-H., Laurans S., Dupré-Crochet S. 2022. Regulation of neutrophil NADPH oxidase, NOX2: a crucial effector in neutrophil phenotype and function. *Cell Dev. Biol.* V. 10. Art. ID 945749.
- Panasenko, O.M. Vakhrusheva T., Tretyakov V., Spalteholz H., Arnhold J. 2007. Influence of chloride on modification of unsaturated phosphatidylcholines by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/bromide system. *Chem. Phys. Lipids.* V. 149. P. 40.
- Pravalika K., Sarmah D., Kaur H., Wanve M., Saraf J., Kalia K., Borah A., Yavagal D.R., Dave K.R., Bhattacharya P. 2018. Myeloperoxidase and neurological disorder: a crosstalk. *ACS Chem. Neurosci.* V. 9. P. 421.
- Prütz W.A. 1996. Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 332. P. 110.
- Pulli B., Ali M., Forghani R., Schob S., Hsieh K.L.C., Wojtkiewicz G., Linnoila J.J., Chen J.W. 2013. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS ONE.* V. 8. Art. ID e67976.
- Ray R.S., Katyal A. 2016. Myeloperoxidase: bridging the gap in neurodegeneration. *Neurosci. Biobehav. Rev.* V. 68. P. 611.
- Schoonbroodt S., Legrand-Poels S., Best-Belpomme M., Piette J. 1997. Activation of the NF- κ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem. J.* V. 321. P. 777.
- Shugar D. 1952. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 8. P. 302.
- Sies H. 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biol.* V. 11. P. 613.
- Teng N., Maghazal G.J., Talib J., Rashid I., Lau A.K., Stocker R. 2017. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep.* V. 22. P. 51.
- Ulfing A., Leichert L.I. 2021. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 78. P. 385.
- Vile G.F., Rothwell L.A., Kettle A.J. 1998. Hypochlorous acid activates the tumor suppressor protein p53 in cultured human skin fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 359. P. 51.
- Wang Y., Chuan C.Y., Hawkins C.L., Davies M.J. 2022. Activation and inhibition of human matrix metalloproteinase-9 (MMP9) by HOCl, myeloperoxidase and chloramines. *Antioxidants.* V. 11. P. 1616.
- Weiss S.J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* V. 320. P. 365.
- Winter J., Ilbert M., Graf P.C.F., Özcelik D., Jakob U. 2008. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell.* V. 135. P. 691.
- Zeng M.Y., Miralda I., Armstrong C.L., Uriarte S.M., Bagaitkar J. 2019. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol. Oral. Microbiol.* V. 34. P. 27.

HYPOCHLOROUS ACID – A POTENTIAL SECONDARY MESSENGER IN THE PROCESS OF NEUTROPHILS' RESPIRATORY BURST DEVELOPMENT

G. N. Semenkova¹, I. I. Zholnerevich², M. A. Murina³, N. V. Amaegberi², D. I. Roshchupkin⁴

¹ *Belarusian State Medical University, Minsk, 220083, Belarus*

² *Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus*

³ *Lopukhin Federal Scientific and Clinical Center for Physical-Chemical Medicine
of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, 119435, Russia*

⁴ *Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Moscow, 117513, Russia*

* *E-mail: n.amaegberi@gmail.com*

Hypochlorous acid and hypochlorite ions are formed in the halogenating cycle of myeloperoxidase, localized mainly in neutrophils, and play a primary role in antimicrobial protection. The paper presents the results of a study of the effect of exogenous HOCl/OCl⁻ in micromolar concentrations on the mechanisms of the “respiratory burst” formation by neutrophils stimulated to phagocytosis. It is shown that this oxidizer is capable of stimulating the functional activity of neutrophils, which is expressed in an increase in the yield of reactive oxygen and chlorine species (ROCS) and secretory degranulation of cells. Enhancement of the “respiratory burst” is associated with activation of NADPH oxidase, PI-3K, MAP kinase ERK1/2 and a decrease in the contribution of intracellular myeloperoxidase to ROCS production by neutrophils. It was found that HOCl/OCl⁻ in the studied concentrations is capable of inhibiting myeloperoxidase activity. It is suggested that hypochlorous acid should be considered as a new potential secondary messenger regulating neutrophil functions.

Keywords: hypochlorous acid, NaOCl, neutrophils, reactive oxygen and chlorine species, myeloperoxidase, secretory degranulation

УДК 577.29

УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ *Serratia proteamaculans* РЕГУЛИРУЮТ ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОЕЙ ИНВАЗИИ, УВЕЛИЧИВАЯ ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

© 2024 г. О. А. Цаплина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

E-mail: olga566@mail.ru

Поступила в редакцию 27.06.2024

После доработки 30.07.2024

Принята к публикации 05.08.2024

Бактерии *Serratia proteamaculans* способны проникать в клетки эукариот. Одним из факторов вирулентности этих бактерий является поверхностный белок бактерий OmpX, увеличивающий адгезию бактерий к поверхности клеток. Кроме того, при заражении бактериями этот поверхностный белок увеличивает в клетках-хозяина экспрессию рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина, вовлеченных в инвазию *S. proteamaculans*. С другой стороны, *S. proteamaculans* увеличивают экспрессию и гена Е-кадгерина. Задача настоящей работы заключалась в том, чтобы определить, может ли OmpX регулировать экспрессию гена Е-кадгерина, и сравнить влияние бактерий на разных стадиях их роста на экспрессию рецепторов клеток карцином, содержащих разное количество рецепторов, участвующих в инвазии. На первом этапе работы мы показали, что OmpX увеличивает экспрессию генов не только рецептора ЭФР и интегрин $\beta 1$, но и Е-кадгерина, опосредующего инвазию *S. proteamaculans*. Поэтому в этой работе бактерии использовали после 24-часового роста, когда они еще не синтезируют расщепляющую OmpX протеазу протеализин, и через 48 ч роста, когда в экстрактах бактерий детектируется активный протеализин. Бактерии через 24 и 48 ч роста вызывают увеличение экспрессии рецептора ЭФР, Е-кадгерина, $\beta 1$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегрин в клетках карцином М-HeLa, A549 и Сасо-2, а также в фибробластах кожи DF-2. Степень увеличения экспрессии рецепторов зависит от свойств клеточной линии и стадии роста бактерий, а динамика увеличения экспрессии схожа только для генов рецептора ЭФР и интегрин $\beta 1$. При этом чем больше экспрессия генов рецептора ЭФР и интегрин $\beta 1$ (в зависимости от стадии роста бактерий), тем сильнее инвазия. Анализ количества рецепторов привел к заключению, что увеличение экспрессии генов рецептора ЭФР и интегрин $\beta 1$ в клетках может быть необходимо для восполнения пула рецепторов, которые перемещаются от мембраны в цитоплазму клетки хозяина при заражении. Таким образом, в результате контакта белка OmpX с клеткой-хозяином происходит накопление рецепторов, вовлеченных в инвазию бактерий *S. proteamaculans*. При этом именно увеличение экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрин определяет чувствительность зараженных клеток к *S. proteamaculans*.

Ключевые слова: бактериальная инвазия, белок внешней мембраны OmpX, *Serratia proteamaculans*, рецептор ЭФР, $\alpha 5 \beta 1$ интегрин, Е-кадгерин

Принятые сокращения: КОЕ — колониеобразующая единица; ОТ — обратная транскрипция; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ЭФР — эпидермальный фактор роста; NEAA — заменимые аминокислоты.

DOI: 10.31857/S0041377124050088, **EDN:** DUJQAR

В случае резкой иммунодепрессии организма хозяина условно-патогенные бактерии при проникновении в организм в больших количествах могут вызывать заболевания. Выделяемые из дыхательных и мочевых путей грамотрицательные бактерии *Serratia* являются факультативными патогенами для хозяев с ослабленным иммунитетом (Mahlen, 2011).

Наиболее клинически значимым штаммом рода *Serratia* является *S. marcescens* (Hejazi, Falkiner, 1997; Mahlen, 2011). Однако в ряде сообщений описываются заболевания человека при инфекции другими видами *Serratia*, включая *S. rubidaea*, *S. liquefaciens* и *S. proteamaculans* (Bollet et al., 1993; Ursua et al., 1996; Hertle, 2005). Исследования, проведенные в нашей

лаборатории, впервые показали, что бактерии *S. proteamaculans*, синтезирующие актин-специфическую протеазу протеализин, способны к инвазии в клетки человека (Tsaplina et al., 2009). Трансформация плазмидой, несущей ген протеализина, придавала неинвазивным *Escherichia coli* способность проникать в клетки эукариот (Bozhokina et al., 2011). Однако инактивация гена протеализина привела не к уменьшению, как следовало ожидать, а к увеличению инвазивной активности бактерий *S. proteamaculans* (Tsaplina et al., 2020). Это указывает на наличие факторов вирулентности *Serratia* среди бактериальных субстратов протеализина.

Ранее мы показали, что бактериальным субстратом протеализина является поверхностный белок бактерий OmpX (Tsaplina et al., 2020). Трансформация бактерий *E. coli* плазмидой, несущей ген *ompX*, увеличивает интенсивность их адгезии на поверхности зараженных клеток, но не способствует проникновению в клетки эукариот (Цаплина, 2018). Для белков семейства OmpX показана способность связываться с рецептором эпидермального фактора роста (ЭФР) (Wiedemann et al., 2016) и белком внеклеточного матрикса фибронектином (Tsang et al., 2010). Фибронектин на поверхности клеток эукариот связывается с гетеродимером $\alpha 5$ и $\beta 1$ субъединиц интегринов. Ранее мы показали, что контакт с бактериями *S. proteamaculans* приводит к перераспределению рецептора ЭФР в клетке-хозяине, схожим с перераспределением в ответ на добавление ЭФР (Tsaplina, 2020) и, по-видимому, в ответ на контакт запускаются сигнальные механизмы в клетке-хозяине. Кроме того, в ответ на заражение клеток линии М-HeLa карциномы шейки матки человека бактериями *S. proteamaculans* происходит увеличение экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина в 2–2.5 раза. Такой же эффект вызывает связывание поверхностного белка бактерий OmpX с поверхностью клетки хозяина (Tsaplina, Bozhokina, 2021). С другой стороны, в инвазии *Serratia* может участвовать Е-кадгерин, и его экспрессия увеличивается в ответ на заражение клеток человека (Tsaplina et al., 2023). В этих экспериментах моделью для оценки чувствительности клеток эукариот к бактериальной инвазии служили культивируемые клетки М-HeLa. Однако для

клеток М-HeLa не характерна сверхэкспрессия генов рецептора ЭФР и Е-кадгерина.

Увеличение экспрессии гена рецептора при заражении бактериями зависит от уровня экспрессии гена рецептора в незараженных клетках (Цаплина, 2018). Поэтому задачей настоящей работы было оценить эффект заражения бактериями *S. proteamaculans* на экспрессию рецепторов в клетках различных карцином. Для работы были выбраны клеточные линии А549 (от карциномы легкого) и Сасо-2 (от аденокарциномы ободочной кишки), для которых показано участие ЭФР в канцерогенезе. Контрольной линией служили нормальные фибробласты кожи DF-2.

В ходе работы мы выяснили, может ли OmpX вызывать увеличение экспрессии гена Е-кадгерина. Было показано, что контакт с бактериями, синтезирующими OmpX, вызывает увеличение экспрессии не только рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина, но и Е-кадгерина. В ходе оценки экспрессии генов рецепторов ЭФР, Е-кадгерина, $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -субъединиц интегрина при заражении бактериями *S. proteamaculans* мы показали, что увеличение экспрессии генов этих рецепторов происходит во всех протестированных клеточных линиях в ответ на заражение бактериями, но интенсивность увеличения зависит от клеточной линии и стадии роста бактериальной культуры. При этом степень увеличения экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина определяет чувствительность клеток к бактериям.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки карциномы шейки матки человека М-HeLa, карциномы легкого человека А549, аденокарциномы ободочной кишки человека Сасо-2 и дермальные фибробласты человека DF-2 получены из «Коллекции культур клеток позвоночных» (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). М-HeLa выращивали на среде Игла MEM с 1% набором заменимых аминокислот, А549 и Сасо-2 – на среде DMEM, DF-2 на среде DMEM/F12 (“Биолот”, Россия). Все среды содержали 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma, США). Клетки культивировали на 12-луночном планшете при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ до образования 70–80% монослоя.

Бактерии *S. proteamaculans* 94 выращивали 24 или 48 ч в среде LB (Sigma, США) при

30 °С с аэрацией. Для оценки эффекта OmpX на экспрессию рецепторов зараженной клетки использовали бактерии *Escherichia coli* BL-21, трансформированные плазмидой pET-21a, несущей ген белка OmpX *S. proteamaculans* (Цаплина, 2018). Бактерии *E. coli* (OmpX) без индукции синтезируют белок OmpX, который детектируется как в экстрактах (Цаплина, 2018), так и в мембранной фракции бактерий (Tsaplina et al., 2020). Для контроля использовали *E. coli* BL-21, трансформированные плазмидой pET-21a без гена OmpX.

Оценка бактериальной инвазии. Бактерии *S. proteamaculans* 94 через 24 или 48 ч роста осаждали 10 мин при 12 100 g (Tsaplina et al., 2009). Чтобы избежать перехода на логарифмическую стадию роста, бактерии переводили в среду DMEM без сыворотки, по объему равному первоначальной бактериальной суспензии, и осаждали на поверхность клеток эукариот центрифугированием 5 мин при 560 g для последующего 2-часового выдерживания при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Для количественной оценки инвазии неприкрепившиеся бактерии отмывали PBS, клетки снимали раствором трипсин–версен (“Биолот”, Россия). При определении интенсивности инвазии клетки инкубировали в среде DMEM, содержащей 40 мкг/мл гентамицина для инактивации внеклеточных бактерий. Инфицированные клетки разрушали дезоксихалатом натрия (1.5 %; Sigma, США). Суспензию разводили средой LB при 4 °С в необходимое число раз и производили высеив на 1.5%-ный агар (на

среде LB) (Sigma, США). Об эффективности инвазии судили по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ).

Оценка экспрессии рецепторов (Е-кадгерина, рецептора ЭФР, β1- и α5-субъединиц интегрина) клеток эукариот. Использовали метод количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ). Через 2 ч инкубации с бактериями клетки снимали смесью трипсин–версен, осаждали 8 мин центрифугированием при 12 100 g и экстрагировали тотальную РНК с помощью набора для экстракции РНК из культур клеток согласно инструкции производителя (“Диа-М”, Россия). Обратную транскрипцию и амплификацию проводили с помощью BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (“Биолабмикс”, Россия) с использованием аппарата для ПЦР в реальном времени CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

Этапы ПЦР включали первоначальный синтез кДНК при 45 °С в течение 30 мин, денатурацию при 95 °С 5 мин и 40 циклов амплификации (95 °С 30 с, отжиг при 60 и 72 °С по 30 с). Каждый образец анализировали трижды. Экспрессию целевого гена нормализовали по экспрессии генов домашнего хозяйства (β-актина и *GADPH*) и рассчитывали с использованием метода 2-ΔΔСТ. Пары генспецифических праймеров (“Евроген”, Москва, Россия), сконструированные с помощью программы BLAST-primer и используемые для ПЦР в реальном времени, приведены в табл. 1.

Оценка количества рецепторов (Е-кадгерина, рецептора ЭФР, β1- и α5-субъединиц интегрина)

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген мишень	Последовательность праймера
α5-Интегрин	Прямой: 5'-GGCTTCAACTTAGACGCGGA-3' Обратный: 5'-AAGCCTCCTTGGCAGTAACC-3'
β-Интегрин	Прямой: 5'-GACGCCGCGCGGAAAAG-3' Обратный: 5'-ATCTGGAGGGCAACCCTTCT-3'
Рецептора ЭФР	Прямой: 5'-GTGCAGCTTCAGGACCACAA-3' Обратный: 5'-AAATGCATGTGTCTGAATATCTTGAG-3'
Е-кадгерин	Прямой: 5'-ATGCTGATGCCCCCAATACC-3' Обратный: 5'-GGGGGCTTCATTACATCCA-3'
α-Актин	Прямой: 5'-AATCTGGCACCACACCTTCTACA-3' Обратный: 5'-GACGTAGCACAGCTTCTCGTTA-3'
<i>GADPH</i>	Прямой: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' Обратный: 5'-TGCAACCAACTGCTTAGC-3'

и фибронектина в зараженных клетках. Клетки после инкубации с *S. proteamaculans* инкубировали в буфере для электрофореза (4% SDS, 24% глицерина, 200 мМ ДТТ, 0.01% бромфенолового синего, 125 мМ трис-HCl, pH 6.8) в течение 5 мин при 56 °С. Клетки соскабливали с планшета с последующим кипячением в течение 5 мин. Образцы фракционировали с помощью SDS–PAGE и переносили на мембрану Hybond ECL в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare, Великобритания). Мембрану инкубировали с 5%-ным обезжиренным молоком в PBS в течение 40 мин для предотвращения неспецифического связывания антител, а затем инкубировали с антителами против Е-кадгерина (ab151484) в разведении 1:500; против рецептора ЭФР (E235), β 1-интегрина (EPR16895), α 5-интегрина (EPR7854), фибронектина (EP-5) и GADPH в разведении 1:1000 (все антитела от Abcam, Великобритания) при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем мембрану трижды промывали промывочным буфером (5% обезжиренного молока и 0.1% Твина 20 в PBS) в течение 10 мин, инкубировали в течение 2 ч с вторичными антителами (ab205718; Abcam, Великобритания; разведение 1:20 000) против IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена. Блоты трижды промывали промывочным буфером и проявляли с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West FEMTO (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Заражение клеток М-HeLa условно-патогенными бактериями *S. proteamaculans* увеличивает экспрессию генов не только рецептора ЭФР и интегрин β 1, но и Е-кадгерина (Tsaplina et al., 2023). Ранее мы показали, что экспрессия генов рецептора ЭФР и β 1-интегрин увеличивается в результате взаимодействия поверхностного белка бактерий OmpX с поверхностью клетки-хозяина (Tsaplina, Bozhokina, 2021). Для того, чтобы определить увеличивает ли экспрессию Е-кадгерина синтез бактериями белка OmpX *S. proteamaculans*, мы использовали генно-инженерные бактерии *E. coli* (OmpX). Было показано, что инкубация клеток М-HeLa с бактериями *E. coli* (OmpX) так же, как и инку-

бация с *S. proteamaculans*, увеличивает экспрессию Е-кадгерина в 2.5 раза, в отличие от инкубации этих же клеток с контрольными *E. coli* (pET21) (рис. 1a). Таким образом, заражение клеток М-HeLa бактериями, синтезирующими OmpX, увеличивает экспрессию генов не только рецептора ЭФР и β 1-интегрин, но и Е-кадгерина, опосредующего инвазию *S. proteamaculans*.

На поздней стационарной стадии роста бактерии *S. proteamaculans* начинают синтезировать активную протеазу протеализин, субстратом которой является OmpX (Tsaplina et al., 2009; Tsaplina et al., 2020). С другой стороны, согласно анализу последовательности OmpX, сайт расщепления протеализином не доступен для протеолиза после встраивания поверхностного белка в бактериальную мембрану (Tsaplina et al., 2020). Поэтому мы сравнили влияние заражения бактериями на ранней стационарной стадии роста (24 ч), когда протеализин еще неактивен, и на поздней (48 ч роста). Анализ проводили на клеточных линиях карцином — М-HeLa, Сасо-2 и А549. В качестве контроля использовали клеточную линию нормальных дермальных фибробластов DF-2. С помощью ОТ-ПЦР в реальном времени было показано, что заражение бактериями увеличивает экспрессию Е-кадгерина во всех тестируемых клеточных линиях. В фибробластах, которые в норме практически не синтезируют Е-кадгерин, заражение бактериями *S. proteamaculans* тоже вызывало усиление экспрессии Е-кадгерина. При этом экспрессия Е-кадгерина в Сасо-2 увеличивается значительно больше бактериями через 24 ч роста, а в клетках М-HeLa и А549 — бактериями через 48 ч роста. По-видимому, это объясняется тем, что бактерии на разных стадиях роста обладают различным набором поверхностных белков, а клетки-хозяина — различным набором поверхностных рецепторов. И именно соотношение поверхностных белков бактерий и клеточных рецепторов определяет ответ клетки на заражение бактериями.

Мы проанализировали эффект заражения бактериями *S. proteamaculans* (после 24- и 48-часового роста) на экспрессию генов рецептора ЭФР и β 1-интегрин клеток тех же линий. Оказалось, что заражение бактериями вызывает увеличение экспрессии β 1-интегрин во всех использованных клеточных линиях. При этом его экспрессия в клетках Сасо-2 и DF-2

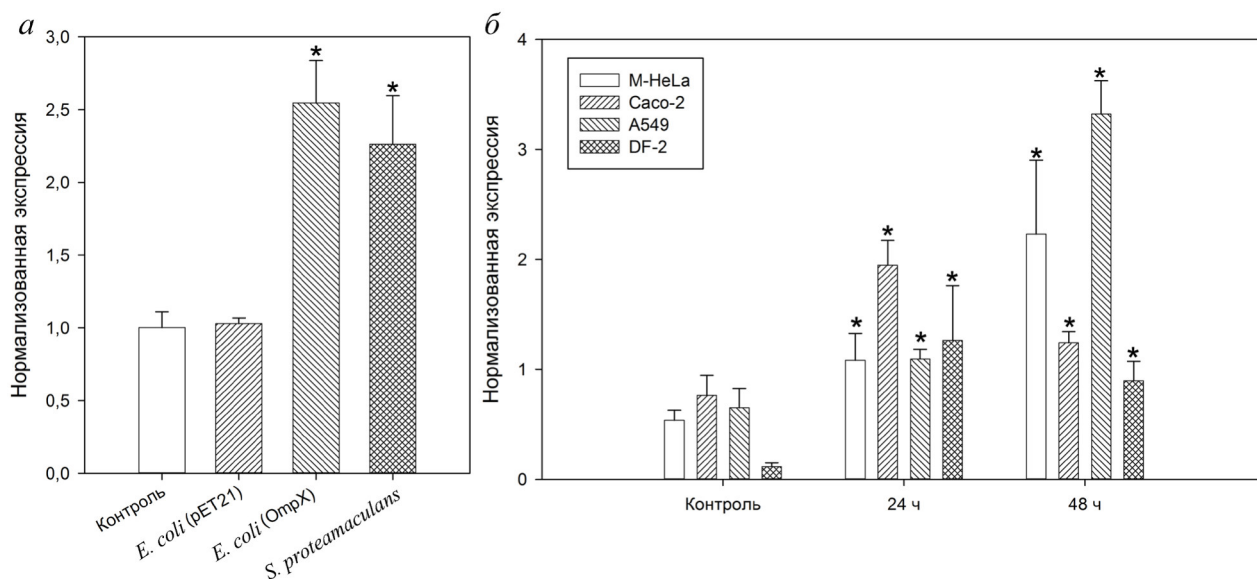


Рис. 1. Влияние контакта с бактериями, синтезирующими OmpX, на экспрессию гена E-кадгерина клеткой-хозяином.

а — в клетках М-HeLa после 2-часовой инкубации с бактериями *S. proteamaculans* и *Escherichia coli* (OmpX) на стадии роста 48 ч. *E. coli* (pET21) использовали в качестве контроля бактерий, не синтезирующих OmpX. **б** — то же, но бактерии *S. proteamaculans* на стадии роста 24 и 48 ч. Контроль — незараженные клетки. *GAPDH* и β -актин использовали в качестве внутреннего контроля. Различие с экспрессией E-кадгерина в незараженных клетках считали достоверным при $*P < 0.05$.

сильнее увеличивается в ответ на заражение бактериями на ранней стационарной стадии роста, а в клетках A549 — в ответ на заражение бактериями на поздней стадии роста; клетки М-HeLa одинаково отвечают на заражение бактериями этих двух стадий роста (рис. 2а). Экспрессия гена рецептора ЭФР имеет схожую тенденцию к увеличению (рис. 2б). Кроме того, мы обнаружили, что в клетках линии Сасо-2 экспрессия гена рецептора ЭФР в ответ на заражение бактериями на поздней стационарной стадии роста практически не увеличивается.

Для связывания с субстратом $\beta 1$ -субъединица интегрина на поверхности клетки хозяина образует гетеродимеры с α -интегрином. С фибронектином и поверхностными белками бактерий связывается $\alpha 5 \beta 1$ интегрин (Joh et al., 1999). Поэтому мы проанализировали эффект заражения бактериями *S. proteamaculans* после 24- и 48-часового роста на экспрессию гена $\alpha 5$ -интегрина в тех же клетках карцином (рис. 2в). Было показано, что в этом случае заражение бактериями *S. proteamaculans* увеличивает экспрессию $\alpha 5$ -интегрина во всех клеточных линиях, но характер увеличения экспрессии этой субъединицы интегрина отличается от характера увеличения

экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина. Экспрессия $\alpha 5$ -интегрина в клетках Сасо-2 после заражения бактериями обеих стадий роста не различается. В клетках М-HeLa более сильное увеличение экспрессии $\alpha 5$ -интегрина вызывают 24-часовые бактерии, а в клетках A549 и DF-2 — 48-часовые. Таким образом, бактерии ранней (24 ч) и поздней (48 ч) стадий роста увеличивают интенсивность экспрессии E-кадгерина, $\beta 1$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегрина, а также рецептора ЭФР в клетках всех тестируемых клеточных линий. При этом заражение бактериями разных стадий роста (24 и 48 ч) вызывает схожий эффект только в случае экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина.

Ранее мы показали, что увеличение экспрессии рецептора ЭФР определяет интенсивность инвазии бактерий *S. proteamaculans* (Berson et al., 2023). Поэтому динамику увеличения экспрессии гена рецепторов клеток при заражении бактериями этих же стадий роста мы сопоставили с динамикой интенсивности инвазии бактерий в клетки М-HeLa, A549, Сасо-2 и DF-2 с помощью количественного микробиологического метода (рис. 3). Интенсивность инвазии 48-часовых *S. proteamaculans* в клетки A549 в 3.5

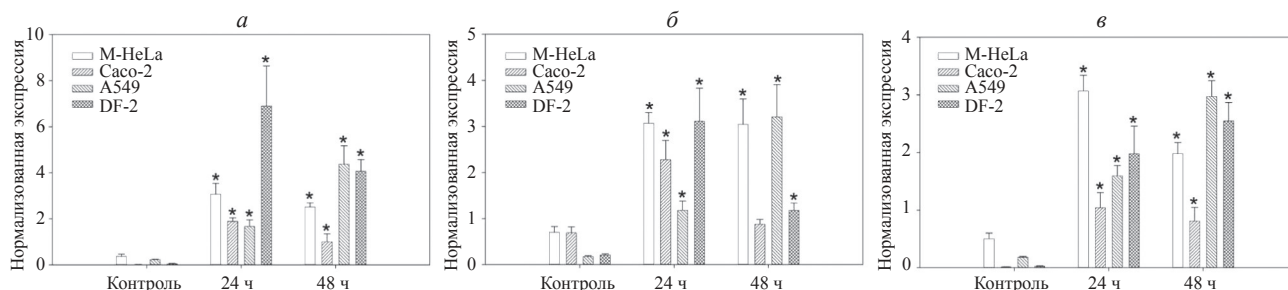


Рис. 2. Экспрессия $\beta 1$ -интегрина (а), рецептора ЭФР (б) и $\alpha 5$ -интегрина (в) в клетках эукариот при контакте с бактериями *S. proteamaculans*. Бактерии через 24 и 48 ч роста добавляли к клеткам на 2 ч. Контроль — незагрязненные клетки. *GAPDH* и β -актин использовали в качестве внутреннего контроля. Различия с экспрессией рецепторов в незагрязненных клетках считали достоверным при $*P < 0.05$.

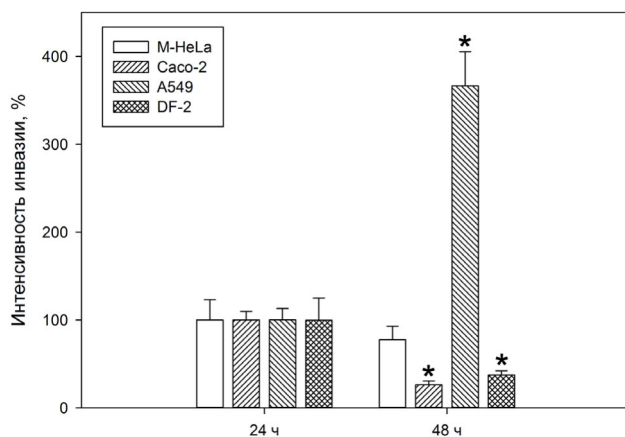


Рис. 3. Интенсивность инвазии бактерий *S. proteamaculans* в клетки эукариот. Бактерии на стадии роста 24 и 48 ч добавляли к клеткам эукариот на 2 ч. Интенсивность инвазии 24-часовых бактерий принимали за 100%. Различия интенсивности инвазии бактерий разных стадий роста считали достоверным при $*P < 0.05$.

раза выше, чем 24-часовых бактерий, в клетки Caco-2 и DF-2 — ниже в 4 и 3 раза соответственно, а в клетки M-HeLa бактерии разных стадий роста проникают одинаково. Таким образом, интенсивность инвазии бактерий на разных стадиях их роста определяется увеличением экспрессии рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина.

Бактерии *S. proteamaculans* на стадии 48 ч роста вызывают более интенсивное увеличение экспрессии белков интереса клеток A549 по сравнению с 24-часовой культурой бактерий. Мы сравнили между собой уровни генов экспрессии рецепторов (Е-кадгерина, рецептора ЭФР, $\beta 1$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегрина), нормированные на актин в клетках A549 до и после заражения 48-часовыми *S. proteamaculans*. Дополнительно мы оценили влияние заражения бактериями на экспрессию

фибронектина, с которым связывается $\alpha 5 \beta 1$ -интегрин. Мы показали, что независимо от уровня экспрессии генов Е-кадгерина, рецептора ЭФР, $\beta 1$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегрина и фибронектина в неинфицированных клетках, при заражении бактериями *S. proteamaculans* экспрессия тестируемых белков клетки-хозяина возрастает до одного и того же уровня, который в 3–4 раза выше экспрессии актина (рис. 4а). При этом, согласно данным Вестерн-блот-анализа, заражение бактериями приводит к накоплению только фибронектина и появлению фрагментов Е-кадгерина, а количество рецептора ЭФР и интегрина остается неизменным (рис. 4б). По-видимому, увеличение экспрессии рецепторов необходимо для восполнения пула рецепторов, попавших в цитоплазму клетки-хозяина в результате запуска сигнальных механизмов при контакте с *S. proteamaculans* (Tsaplina, 2020).

ОБСУЖДЕНИЕ

$\beta 1$ -интегрин и рецептор ЭФР вовлечены в миграцию и метастазирование раковых клеток и считаются перспективными мишенями для таргетной терапии распространения опухолевых клеток (Morello et al., 2011). Оверэкспрессия или постоянная активация рецептора ЭФР при раке легкого коррелирует с негативным прогнозом для пациента. Нарушение нормальной активности рецептора ЭФР способствует злокачественному развитию клеток, обеспечивая их пролиферативное преимущество и способствуя миграции и инвазивности клеток (Morello et al., 2011), что делает рецептор ЭФР мишенью для таргетной терапии. Использование ингибиторов киназы рецептора ЭФР имеет ограничения, потому что почти все пациенты

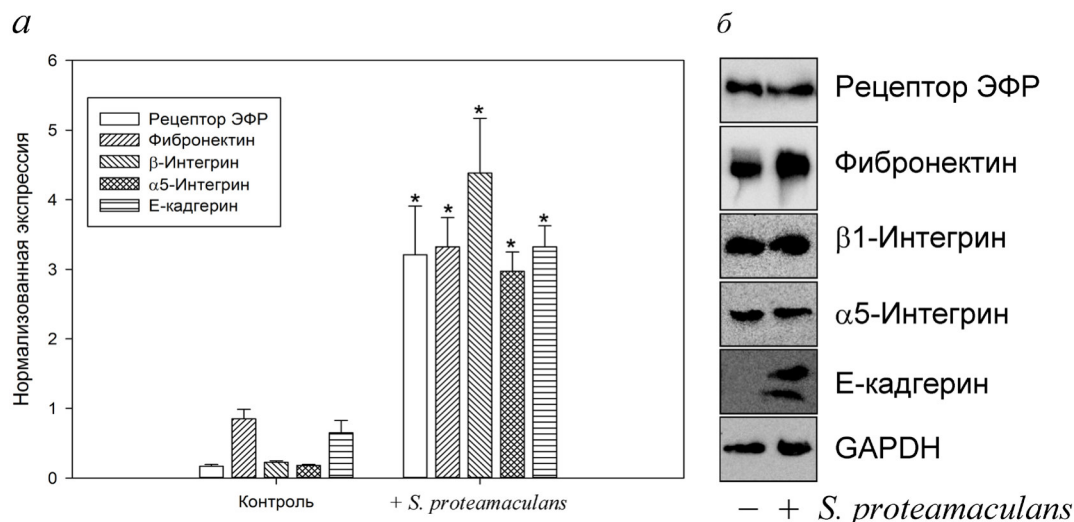


Рис. 4. Экспрессия (а, ОТ-ПЦР) и содержание (б, Вестерн-блоттинг) ряда белков (рецептора ЭФР, фибронектина, β1- и α5-субъединиц интегрин, Е-кадгерина) в клетках А549 при их контакте с бактериями *S. proteamaculans*. Бактерии на стадии роста 48 ч добавляли к клеткам эукариот на 2 ч. Контроль — незараженные клетки. β-Актин (ОТ-ПЦР) и GAPDH (Вестерн-блоттинг) использовали в качестве внутреннего контроля. Разницу экспрессии относительно незараженных клеток считали достоверной при $*P < 0.05$.

быстро привыкают к препарату и становятся устойчивыми к дальнейшему лечению (Nguyen et al., 2009; Yoshida et al., 2010).

Все больше данных указывает на то, что и интегрины играют важную роль в развитии опухоли. Повышенная экспрессия α5β1 интегрин также является плохим прогностическим фактором для выживаемости пациентов (Dingemans et al., 2010). Показано, что в клетках карциномы легкого А549 β1-интегрин контролирует передачу сигналов от рецептора ЭФР и рециклирование рецептора ЭФР на клеточной мембране (Morello et al., 2011). Мы показали, что заражение бактериями *S. proteamaculans* всех тестируемых клеток карцином увеличивает экспрессию рецептора ЭФР, а также экспрессию α5- и β1-субъединиц интегрин.

Е-кадгерин играет важную роль в качестве белка-супрессора миграции при раке, поскольку потеря его экспрессии и (или) нарушение функции приводит к повышенной способности клеток вторгаться в соседние ткани (Paredes et al., 2012). Е-кадгерин представляет собой молекулы на поверхности эпителиальных клеток, которые участвуют в межклеточной адгезии за счет установления кальций-зависимых взаимодействий в местах межклеточных контактов, и нарушение межклеточных контактов напрямую приводит к миграции раковых клеток по организму.

Кроме того, Е-кадгерин может образовывать комплексы с рецептором ЭФР (Qian et al., 2004). Множественные межклеточные адгезионные контакты при избытке Е-кадгерина препятствует активации рецептора ЭФР при связывании лиганда (Takahashi, Suzuki, 1996), но, как было обнаружено, Е-кадгерин может временно и активировать рецептор ЭФР при образовании межклеточных контактов (Ресе, Gutkind, 2000). Кроме того, при отщеплении бактериальными протеазами или мембраносвязанными ферментами клетки-хозяина (шеддазами) внеклеточный фрагмент Е-кадгерина может связываться с рецептором ЭФР и активировать фосфорилирование, способствуя метастазированию раковых клеток (Hu et al., 2016). Ранее мы показали, что при заражении бактериями *Serratia* в клетках карцином М-Не-Ла и А549 также появляются фрагменты Е-кадгерина, образованные в результате протеолиза (Tsaplina et al., 2023). В настоящей работе мы показали, что к увеличению экспрессии Е-кадгерина приводит контакт клетки-хозяина с поверхностным белком бактерий OmpX. Таким образом, заражение клеток эукариот бактериями *S. proteamaculans* увеличивает экспрессию и Е-кадгерина, фрагмент которого, образованный в результате протеолиза, может активировать рецептор ЭФР. С другой стороны, мы показали, что увеличение экспрессии про-

исходит не только в клетках карцином, но и в дермальных фибробластах кожи. Однако экспрессия этих рецепторов именно в клетках карцином может играть ключевую роль в их распространении по организму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате контакта внешнего мембранного белка бактерий OmpX с поверхностью клеток человека происходит увеличение экспрессии рецептора ЭФР, E-кадгерина, субъединиц $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -интегринов, которые вовлечены в инвазию бактерий *S. proteamaculans*. Степень увеличения экспрессии рецепторов зависит от свойств клеточной линии и стадии роста бактерий. Динамика увеличения интенсивности экспрессии протестированных рецепторов в зависимости от стадии роста бактериальной культуры сходна только для генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина. И именно она определяет интенсивность инвазии бактерий в клетки. Кроме того, в клетках A549 увеличение экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина может быть необходимо для восполнения пула рецепторов, которые перемещаются от мембраны в цитоплазму клетки хозяина при заражении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-20045) и Санкт-Петербургского научного фонда (проект № 24-25-20045).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Цаплина О. 2018. Участие поверхностного белка *Serratia proteamaculans* OmpX в адгезии бактерий к клеткам эукариот. Цитология. Т. 60. № 10. С. 817. (Tsaplina O. 2018. Participation of *Serratia proteamaculans* ompX in bacterial adhesion on eukaryotic cells. Tsitologiya. V. 60. No. 10. P. 817.)
- Berson Y., Khaitlina S., Tsaplina O. 2023. Involvement of lipid rafts in the invasion of opportunistic bacteria *Serratia* into Eukaryotic Cells. Int J. Mol. Sci. V. 24. P. 9029.
- Bollet C., Grimont P., Gainnier M., Geissler A., Sainty J. M., De Micco P. 1993. Fatal pneumonia due to *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora*. J. Clin. Microbiol. V. 31. P. 444.
- Bozhokina E. S., Tsaplina O. A., Efremova T. N., Kever L. V., Demidyuk I. V., Kostrov S. V., Adam T., Komissarchik Y. Y., Khaitlina S. Y. 2011. Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimeysin and protealysin. Cell Biology International. V. 35. P. 111–118.
- Dingemans A. M., van den Boogaart V., Vosse B.A., van Suylen R. J., Griffioen A. W., Thijssen V. L. 2010. Integrin expression profiling identifies integrin $\alpha 5$ and $\beta 1$ as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. Mol. Cancer. V. 9. P. 152.
- Hejazi A., Falkiner F. R. 1997. *Serratia marcescens*. J Med Microbiol. V. 46. P. 903–912.
- Hertle R. 2005. The family of *Serratia* type pore forming toxins. Curr Protein Pept Sci. V. 6. P. 313–325.
- Hu Q. P., Kuang J. Y., Yang Q. K., Bian X. W., Yu S. C. 2016. Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. Int. J. Cancer. V. 138. P. 2804–2812.
- Joh D., Wann E. R., Kreikemeyer B., Speziale P., Hook M. 1999. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. Matrix Biol. V. 18. P. 211.
- Mahlen S. D. 2011. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. Clin. Microbiol. Rev. V. 24. P. 755.
- Morello V., Cabodi S., Sigismund S., Camacho-Leal M. P., Repetto D., Volante M., Papotti M., Turco E., Defilippi P. 2011. Beta 1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. Oncogene. V. 30. P. 4087.
- Nguyen K. S., Kobayashi S., Costa D. B. 2009. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. Clin. Lung Cancer. V. 10. P. 281.
- Paredes J., Figueiredo J., Albergaria A., Oliveira P., Carvalho J., Ribeiro A. S., Caldeira J., Costa A. M., Simoes-Correia J., Oliveira M. J., Pinheiro H., Pinho S. S., Mateus R., Reis C. A., Leite M., Fernandes M. S., Schmitt F., Carneiro F., Figueiredo C., Oliveira C., Seruca R. 2012. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. Biochim. Biophys. Acta. V. 1826. P. 297.
- Pece S., Gutkind J. S. 2000. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. J. Biol. Chem. V. 275. P. 41227.
- Qian X., Karpova T., Sheppard A. M., McNally J., Lowy D. R. 2004. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. EMBO J. V. 23. P. 1739.
- Takahashi K., Suzuki K. 1996. Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadher-

- in-mediated cell-cell adhesion. Exp. Cell. Res. V. 226. P. 214.
- Tsang T. M., Felek S., Krukonis E. S. 2010. Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery. Infect. Immun. V. 78. P. 3358.
- Tsaplina O., Bozhokina E. 2021. Bacterial outer membrane protein OmpX regulates beta1 integrin and epidermal growth factor receptor (EGFR) involved in invasion of M-HeLa cells by *Serratia proteamaculans*. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 13246.
- Tsaplina O., Demidyuk I., Artamonova T., Khodorkovsky M., Khaitlina S. 2020. Cleavage of the outer membrane protein OmpX by protealysin regulates *Serratia proteamaculans* invasion. FEBS Lett. V. 594. P. 3095.
- Tsaplina O., Lomert E., Berson Y. 2023. Host-cell-dependent roles of e-cadherin in *Serratia* Invasion. Int. J. Mol. Sci. V. 24. P. 17075.
- Tsaplina O. A. 2020. Redistribution of EGF receptor and $\alpha 5$, $\beta 1$ integrins in response to infection of epithelial cells by *Serratia proteamaculans*. Cell and Tissue Biology. V. 14. P. 440.
- Tsaplina O. A., Efremova T. N., Kever L. V., Komissar-chik Y. Y., Demidyuk I. V., Kostrov S. V., Khaitlina S. Y. 2009. Probing for actinase activity of protealysin. Biochemistry (Moscow). V. 74. P. 648.
- Ursua P. R., Unzaga M. J., Melero P., Iturburu I., Ezpeleta C., Cisterna R. 1996. *Serratia rubidaea* as an invasive pathogen. J. Clin. Microbiol. V. 34. P. 216.
- Wiedemann A., Mijouin L., Ayoub M. A., Barilleau E., Canepa S., Teixeira-Gomes A. P., Le Vern Y., Rosselin M., Reiter E., Velge P. 2016. Identification of the epidermal growth factor receptor as the receptor for *Salmonella* Rck-dependent invasion. FASEB J. V. 30. P. 4180.
- Yoshida T., Zhang G., Haura E. B. 2010. Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer. Biochem. Pharmacol. V. 80. P. 613.

OPPORTUNISTIC BACTERIA SERRATIA PROTEAMACULANS REGULATE THE INTENSITY OF THEIR INVASION BY INCREASING THE EXPRESSION OF HOST CELL SURFACE RECEPTORS

O. A. Tsaplina

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

E-mail: olga566@mail.ru

The *Serratia proteamaculans* are able to penetrate eukaryotic cells. One of the virulence factors of these bacteria is the bacterial surface protein OmpX. The OmpX protein increases the adhesion of bacteria to the surface of eukaryotic cells. In addition, this protein increases the gene expression of the EGF receptor and $\beta 1$ integrin, which determine the intensity of *S. proteamaculans* invasion. We show that OmpX also increases the expression of E-cadherin, which is involved in *S. proteamaculans* invasion. The objective of this work was to compare the effect of bacteria at different growth stages on the gene expression of receptors in carcinoma cells, which normally synthesize different numbers of receptors involved in invasion. Bacteria were used after 24 hours of growth, when they had not yet synthesized the OmpX-cleaving protease protealysin, and after 48 hours of growth, when active protealysin was detected in bacterial extracts. After 24 and 48 hours of growth, the bacteria induce an increase in the gene expression of EGF receptor, E-cadherin, $\beta 1$ and $\alpha 5$ integrins in M-HeLa cervical carcinoma cells, A549 lung carcinoma cells, Caco-2 colon adenocarcinoma cells, and DF-2 skin fibroblasts. The intensity of the increase in receptor expression depends on the properties of the cell line and the growth stage of the bacteria. Moreover, infection with *S. proteamaculans* causes a similar increase in the expression of only the EGF receptor and $\beta 1$ integrin. Using quantitative invasion, it was shown that the intensity of bacterial invasion, depending on the growth stage of the bacterial culture, correlates with the dynamics of increased gene expression of the EGF receptor and $\beta 1$ integrin. When analyzing the number of receptors, it was shown that an increase in the gene expression of the EGF receptor and $\beta 1$ integrin in cells may be necessary to replenish the pool of receptors that move from the membrane into the cytoplasm of the host cell during infection. Thus, as a result of contact of the bacterial surface protein OmpX with the surface of a human cell, receptors involved in *S. proteamaculans* invasion accumulate. Moreover, it is the increase in the gene expression of the EGF receptor and $\beta 1$ -integrin that determines the sensitivity of infected cells to *S. proteamaculans*.

Keywords: bacterial invasion, protealysin, outer membrane protein OmpX, *Serratia proteamaculans*, EGFR, $\alpha 5\beta 1$ integrin, E-cadherin

УДК 611.018.8:612.65

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГАМК И $\alpha 1$ -СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРА В ПОЛЯХ СА1 И СА3 ГИППОКАМПА У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС ПОСЛЕ АСФИКСИИ В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

© 2024 г. Л. И. Хожай¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034, Россия

E-mail: astarta0505@mail.ru

Поступила в редакцию 15.07.2024

После доработки 21.08.2024

Принята к публикации 23.08.2024

Проведено исследование динамики изменения численности популяции ГАМКергических нейронов и распределения субъединицы $\alpha 1$, входящей в состав ГАМК_A-рецептора (ГАМК_A $\alpha 1$) в полях СА1 и СА3 гиппокампа во время неонатального периода в норме и после воздействия перинатальной гипоксии. В работе использована модель недоношенной беременности человека. Воздействие гипоксии осуществляли на 2-е сутки после рождения, в специальной камере с содержанием кислорода в дыхательной смеси 7.8%. Для выявления ГАМК и субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора применяли иммуногистохимические методы исследования. Изучение гиппокампа проводили на 5 и 10 сутки. Показано, что у животных в контроле в течение неонатального периода в полях СА1 и СА3 происходит постепенное увеличение численности популяции ГАМКергических нейронов, повышение содержания самой ГАМК и субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A рецептора. Асфиксия в перинатальный период приводит к сокращению числа ГАМКергических нейронов в обоих полях СА1 и СА3, снижению содержания самой ГАМК, субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора и задержке развития нейрона. Таким образом у животных, переживших асфикию, к концу неонатального периода в исследованных отделах гиппокампа уже выражено изменение организации ГАМКергической системы, которое может приводить к дисфункции тормозной системы уже на самых ранних этапах развития.

Ключевые слова: ГАМК, субъединица $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора, гиппокамп, неонатальный период, перинатальная гипоксия

DOI: 10.31857/S0041377124050091, EDN: DUEIYY

У человека и млекопитающих ГАМК является основным тормозным нейротрансмиттером, модулирующим процессы торможения в мозге (Ngo, Vo, 2019). Считают, что во время раннего развития активация и функции этого тормозного нейромедиатора и тормозных интернейронов имеют решающее значение при формировании нейральных цепей гиппокампа (Ben-Ari et al., 1989). В поздний пренатальный и неонатальный периоды происходит ряд сложных последовательных процессов, которые играют важную роль в созревании отделов ЦНС и установлении впоследствии баланса возбуждения/торможения. В настоящее время получены многочисленные доказательства того, что в этот период ГАМК оказывает возбуждающее действие на незрелые нейроны. В результате происходит генерация

мощных токов, названных гигантскими деполяризирующими потенциалами, которые характеризуются повторяющимися всплесками, вызывая синхронные электрические колебания нейральных сетей (Ben-Ari et al., 1989, 1994; Khalilov et al., 2015). Считают, что такие паттерны колебательной активности нейральных сетей в период раннего развития являются важным фактором для осуществления процессов пролиферации, миграции, созревания нейронов и синаптогенеза (Ben-Ari et al., 2006; Khalilov et al., 2015). Установлено, что у новорожденных животных в полях СА1 и СА3 гиппокампа ГАМК вызывает сильные деполяризирующие эффекты в незрелых пирамидных нейронах (Janigro, Schwartzkroin, 1988; Ben-Ari et al., 1989; Cherubini et al., 1991; Khalilov et al., 2015). Показано, что эти мощные деполяризирующие по-

тенциалы опосредованы активацией в основном ГАМК_A-рецептора, содержащего субъединицу $\alpha 1$ и являющегося основным при быстрой синаптической нейротрансмиссии во взрослом мозге (Farrant, Nusser, 2005; Mohler, 2006).

Обнаружено, что в период новорожденности происходит тоническое высвобождение ГАМК, при этом уникальность механизмов ее высвобождения заключается в том, что они не зависят от экспрессии и присутствия транспортных белков и факторов везикулярного высвобождения медиатора. Полагают, что в пренатальный и ранний неонатальный периоды имеет место паракринный механизм высвобождения и действия ГАМК, при котором медиатор проникает в молодые незрелые нейроны, не имеющие синапсов (Demarque et al., 2002).

Наблюдения показали, что фармакологическая активация или блокада ГАМК_A-рецепторов в период раннего развития вызывает структурные нарушения в отделах мозга и может быть причиной изменения поведенческих и когнитивных функций во взрослом возрасте (Rudolph, Möhler, 2006; Naderipoor et al., 2021). Более того, было выявлено, что одной из причин развития целого ряда нейropsychических заболеваний является дефицит субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора в полях гиппокампа (Pirker et al., 2003; Laurén et al., 2003). При этом мало известно о динамике изменения уровня ГАМК в неонатальный период в условиях острой гипоксии.

Гипоксия/ишемия в неонатальный период является ведущей причиной высокой смертности и инвалидизации, особенно это касается недоношенных детей (Odd et al., 2009; Douglas-Escobar, Weiss, 2015; Back, 2017), испытывающих, как правило, острую гипоксию во время родов. Поля пирамидных нейронов CA1 и CA3 считаются основными структурами гиппокампа, нарушение организации которых в ранний неонатальный период приводит к развитию у детей разных форм эпилепсии. Проведенные клинические исследования свидетельствуют о том, что перинатальная асфиксия может приводить к снижению способности к обучению, нарушению памяти в детском и подростковом возрасте, эпилептическим припадкам, которые могут сохраняться во взрослом возрасте и влиять на

качество жизни (Odd et al., 2009; Douglas-Escobar, Weiss, 2015). Развитие таких неврологических патологий, в значительной степени, связано с нарушениями структурной организации отделов гиппокампа на ранних этапах развития. Существующие данные, в свою очередь, свидетельствуют о том, что нарушения функции тормозной ГАМКергической системы вызывают изменение поведенческих реакций (Cullinan et al., 2008; Crowley, Girdler, 2014), особенно, когнитивных и памяти, то есть функций, зависящих от состояния гиппокампальной формации, в частности, полей CA1 и CA3 (Poo, 2001; Tyler et al., 2002; Leal et al., 2014; Majd et al., 2018; Naderipoor et al., 2021). В неонатальный период в гиппокампе продолжают процессы пролиферации и миграции нейронов (Altman, Bayer, 1990), в зависимости от интенсивности активации ГАМК_A-рецепторов происходят сложные процессы изменения концентрации и транспорта ионов Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и, наконец, осуществляется смена функции ГАМК с возбуждающей на тормозную (Demarque et al., 2002; Ben-Ari, 2006). Все это свидетельствует о том, что неонатальный период является критическим при формировании и становлении тормозной ГАМКергической системы.

Несмотря на значимость роли ГАМК и ГАМК_A $\alpha 1$ -рецептора в формировании и функционировании отделов гиппокампа в этот ранний период развития, динамика распределения ГАМК и ГАМК_A $\alpha 1$ -рецептора в структурах гиппокампа у новорожденных детей, как в норме, так и после воздействия повреждающих факторов, изучена недостаточно. В настоящее время клиническая статистика свидетельствует о ежегодном увеличении числа случаев перинатальной асфиксии у новорожденных во время родов и это, несомненно, определяет необходимость детального исследования ее последствий. В связи с этим задачей работы было (на модели общей гипоксии при недоношенной беременности человека) исследовать влияние острой гипоксии на распределение ГАМК и ГАМК_A-рецептора, включающего субъединицу $\alpha 1$, в полях CA1 и CA3 пирамидного слоя гиппокампа в неонатальный период у крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Работа выполнена на крысах линии Wistar, полученных из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН» (Санкт-Петербург). Беременные самки крыс содержались на базе вивария ИФ РАН, при температуре 22–24 °С, цикле освещения 12 ч день/ночь и свободном доступе к воде и еде. В работе была использована модель недоношенной беременности человека, включающая общую гипоксию новорожденных крыс. Считается, что развитие мозга крыс на 1–2 постнатальные сутки соответствует степени развития мозга преждевременно родившихся детей у человека (примерно 29–30 неделя беременности) (Otellin et al., 2021). Модельные условия позволяют получить повреждения мозга, которые наблюдаются у недоношенных новорожденных детей при преждевременных родах. Как правило, у таких детей респираторная система к моменту рождения не достигает достаточной степени зрелости, что приводит к респираторной дисфункции и общей гипоксии новорожденного. Модель, с одной стороны, исключает смертность животных, а с другой — воспроизводит широкий спектр нарушений развития разных отделов головного мозга, возникающих при асфиксии у недоношенных детей человека (Otellin et al., 2021).

Исследование проводили на новорожденных крысах в неонатальный период развития (до 10 постнатальных суток). Воздействие гипоксии осуществляли на 2-е неонатальные сутки. Новорожденных крыс помещали на 1 ч в камеру с проточной газовой смесью, содержащей 7.8% кислорода, 0.4% углекислого газа и 91.8% азота, при температуре 21.5–23.0 °С и нормальном давлении (760 мм рт. ст.). Исследование CA1 и CA3 полей гиппокампа проводили в неонатальный период (период новорожденности) на 5 (П5) и 10 (П10) постнатальные сутки. Использовали 2 группы животных: 1) экспериментальную группу, включающую крыс на П5 и П10 ($n = 6$ в каждом случае), подвергавшихся воздействию гипоксии, и 2) контрольную группу, включающую интактных крыс того же возраста на П5 и П10 ($n = 6$ в каждом случае).

Иммуногистохимическое исследование. У новорожденных крыс мозг извлекали и обрабатывали по общепринятой методике: фик-

сировали в цинк-этанолформальдегиде на фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), обезживали, заливали в парафин и готовили фронтальные серийные срезы гиппокампа толщиной 5–6 мкм на уровне брегмы — 1.40–1.60 мм на П5 и на уровне брегмы — 1.80–2.00 мм на П10 (по стереотаксическим атласам координатных таблиц мозга крыс в возрасте П5 и П10) (Khazipov et al., 2015). Срезы помещали на предметные стекла Super frost plus gold (Menzel-Glasser, Германия). Иммуногистохимическую реакцию на выявление ГАМК проводили с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA antibody, ab8891; Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000. После процедуры теплового демаскирования антигенов в цитратном буфере (pH 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин, срезы инкубировали с первичными антителами при 4 °С в течение 24 ч. В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L(HRP), (ab 6721; Abcam, Великобритания). Срезы помещали во вторичные антитела на 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB substrate kit, ab64238 (Abcam, Великобритания). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

Иммуногистохимическое выявление субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора осуществляли при помощи первичных кроличьих поликлональных антител (anti-GABA_A $\alpha 1$ receptor antibody, ab102704; Abcam, Великобритания) в разведении 1:300. После процедуры теплового демаскирования антигенов в цитратном буфере (pH 6.1) (Dako, Дания) в течение 20 мин, срезы инкубировали с первичными антителами при 4 °С в течение 26 ч. В качестве вторичных реагентов для антител к GABA_A $\alpha 1$ использовали реактивы из набора EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Инкубацию срезов во вторичных антителах осуществляли в течение 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB substrate kit, ab64238 (Abcam, Великобритания). Специфичность иммунной реакции проверяли с помощью негативного контроля (без первичных антител).

После проведения иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали гемато-

ксилином Джилла и заключали в синтетическую заливочную среду Permaunt (Thermo Scientific, США).

Статистическая обработка результатов. При проведении иммуногистохимических реакций все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов мозга, полученных от контрольных и подопытных животных обеих возрастных групп. Количественный анализ данных проводили на цифровых изображениях фронтальных серийных срезов полей CA1 и CA3, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME со встроенной цифровой камерой Leica EC3 (Leica, Германия) в формате JPG. Цифровые изображения срезов мозга контрольных и экспериментальных животных были получены при одинаковых параметрах освещения, насыщенности цвета и контраста, как при выявлении ГАМК, так и $\alpha 1$ -субъединицы ГАМК_A-рецептора. Количество иммуноположительных клеток оценивали на стандартной площади 0.1 мм² (условной единицы площади) при увеличении объектива 100×. Подсчет иммуноположительных клеток осуществляли на изображениях, полученных с 12–15 гистологических срезов мозга, взятого от 6 животных каждой исследуемой возрастной группы при помощи пакетов компьютерных программ ImageJ (NIH, США), Origin 5.0.

Следует отметить, что при подсчетах иммуноположительных клеток учитывались только нейроны, так как в период развития активный рост астроцитарной глии начинается в конце первой и середине второй недели (P7–10), в это время астроглия представляет собой незрелые клетки. Созревание астроцитов начинается в конце второй (P12–14) и в течение третьей недели (P21), совпадая с процессами активного синаптогенеза (Farhy-Tselnicker, Allen, 2018). В это время астроциты синтезируют ряд белков, связанных с транспортом и высвобождением пресинаптических пузырьков, с формированием постсинаптического уплотнения, секретируют синапс-регулирующие белки и рецепторы к нейротрансмиттерам. При этом образование тормозных синапсов происходит позже возбуждающих, учитывая, что на ранних сроках неонатального периода происходит смена возбуждающей функции ГАМК на тормозную (Fa-

rhy-Tselnicker, Allen, 2018). Поэтому выявление астроцитов, экспрессирующих ГАМК или ГАМК_A $\alpha 1$, в неонатальный период на сроках P5–10 мало вероятно, и в работе учитывались только нейроны.

Анализ оптической плотности окрашивания продукта иммунной реакции проводили при увеличении объектива микроскопа 100×. Для определения оптической плотности окрашивания продукта реакции выделяли участки окрашенной цитоплазмы нейронов, участки окрашенных проксимальных отделов отростков. Оценка оптической плотности продукта иммунного окрашивания была выполнена с помощью программного обеспечения Photo-M (Черниговский, http://t_lambda.chat.ru), интенсивность реакции (окрашивания) в изучаемых структурах оценивали в сравнении с интенсивностью фона. У каждого животного анализировали по 8–10 изображений каждого поля гиппокампа, на которых исследовали по 30–35 нейронов. Все количественные данные представлены в виде среднего значения и соответствующей стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Результаты представлены как значения оптической плотности окрашенного продукта иммунной реакции, выраженные в условных единицах (усл. ед.). Для сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и oneway ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc. США), различия считали статистически достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество ГАМКергических нейронов и распределение ГАМК в поле CA1 в неонатальный период в контроле и после воздействия гипоксии. У контрольных животных на P5 в поле CA1 выявляется популяция клеток, цитоплазма и основной отросток которых содержат ГАМК. Эти клетки рассеяны в слое пирамидных нейронов, как в верхних, так и нижних рядах клеток слоя. Форма их клеточных тел различается, она веретеновидная или овальная, клетки имеют несколько отростков. Апикальные дендриты уходят в слой *str. radiatum*. Число таких нейронов на условную единицу площади составляет 14.6 ± 0.3 . Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на

ГАМК равно 0.127 ± 0.006 (табл. 1). На П10 существенно увеличивается (в 1.5 раза), у контрольных животных в слое пирамидных клеток значение оптической плотности продукта нейронами поля СА1 клетки, содержащие ГАМК, иммунной реакции на ГАМК постепенно распределяются диффузно (рис. 1а). Между тем возрастает (в 1.3 раза). После воздействия лами пирамидных нейронов выявляются тонкие перинатальной гипоксии в продолжение иммуноположительные отростки. По сравнению неонатального периода увеличения числа с П5 количество иммуноположительных клеток, содержащих ГАМК, не происходит. При этом на этом сроке развития существенно уменьшается значение оптической плотности продукта увеличивается и составляет 21.7 ± 0.2 . Значение оптической плотности окрашивания продукта иммунной реакции на ГАМК повышается до 0.162 ± 0.002 (табл. 1).

После воздействия гипоксии на П5 в поле СА1 молодые пирамидные нейроны имеют малый объем цитоплазмы. Среди них также присутствует популяция клеток, содержащих ГАМК и распределяющихся в слое диффузно. Их основные (апикальные) отростки направлены в *str. radiatum*. Эти клетки отличаются по размеру и форме клеточных тел. Число иммуноположительных нейронов в слое составляет 13.4 ± 0.2 . Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на ГАМК на этом сроке составляет 0.093 ± 0.008 , что примерно в 1.4 раза ниже, чем в контроле (табл. 1). На П10 после воздействия гипоксии в поле СА1 также выявляются клетки иммуноположительные на ГАМК, диффузно распределяющиеся в верхних рядах пирамидных нейронов (рис. 1б), их число не изменяется по сравнению с таковым на П5 и составляет 15.2 ± 0.4 . Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на ГАМК на этом сроке составляет 0.113 ± 0.005 , что примерно в 1.4 раза ниже, чем в контроле (табл. 1).

Таким образом, у контрольных животных на П5 в поле СА1 присутствует популяция нейронов, содержащих ГАМК, численность которой к концу неонатального периода

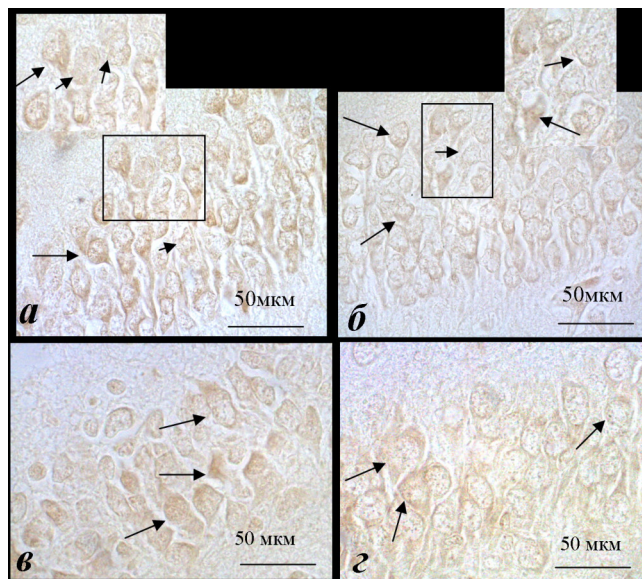


Рис. 1. Гиппокамп крысы на 10 неонатальные сутки, поля СА1 (а, б) и СА3 (в, г) в контроле (а, в) и после воздействия гипоксии (б, г). Иммуногистохимическая реакция на выявление ГАМК. Увел. 100×.

а — диффузное распределение иммуноположительных нейронов в СА1 (длинная стрелка), иммуноотрицательные нейроны (короткая стрелка, увел. фрагмент); б — сокращение числа иммуноположительных нейронов (длинная стрелка) в СА1 после воздействия гипоксии, иммуноотрицательные нейроны (короткая стрелка, увел. фрагмент); в — иммуноположительные нейроны (длинная стрелка) в поле СА3 в контроле; г — сокращение числа иммуноположительных нейронов (длинная стрелка) в СА3 после воздействия гипоксии, нейроны имеют меньший объем цитоплазмы по сравнению с контролем.

Таблица 1. Показатели оптической плотности продукта иммунной реакции при выявлении ГАМК в полях СА1 и СА3 гиппокампа крыс на 5 и 10 неонатальные сутки в контроле и после воздействия гипоксии

Поля гиппокампа	Оптическая плотность, усл. ед.			
	Контроль		После воздействия гипоксии	
	П5	П10	П5	П10
СА1	0.127 ± 0.006	0.162 ± 0.002	$0.093 \pm 0.008^*$	$0.113 \pm 0.005^*$
СА3	0.10 ± 0.005	0.157 ± 0.004	0.104 ± 0.007	$0.114 \pm 0.007^*$

Примечание. * Различия между экспериментальной и контрольной группами достоверны при $P < 0.05$.

иммунной реакции на ГАМК снижается уже к П5, а к концу неонатального периода оно становится еще ниже (в 1.4 раза) по сравнению с контролем.

Количество ГАМКергических нейронов и распределение ГАМК в поле СА3 в неонатальный период в контроле и после воздействия гипоксии. У контрольных животных на П5 в поле СА3 в слое пирамидных нейронов также выявляются клетки, содержащие ГАМК, располагающиеся диффузно по одной клетке, или группами по 2–3. Они различаются по размерам и форме клеточного тела (присутствуют клетки крупного и среднего размера), их число составляет 13.6 ± 0.5 на условную единицу площади. Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на ГАМК на этом сроке составляет 0.101 ± 0.005 (табл. 1). На П10 в поле СА3 численность популяции нейронов, содержащих ГАМК, достоверно не отличается от таковой на предыдущем сроке развития — 15.01 ± 0.3 . При этом значение оптической плотности окрашивания продукта иммунной реакции на ГАМК увеличивается в 1.6 раза и составляет 0.157 ± 0.004 (табл. 1).

После воздействия гипоксии на П5 в поле СА3 клеток, содержащих ГАМК, меньше, чем в контроле (9.6 ± 0.4), они диффузно рассеяны в слое пирамидных нейронов. Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на ГАМК не изменяется и соответствует контрольному показателю (0.104 ± 0.007) (табл. 1). На П10 после воздействия гипоксии в поле СА3 число клеток, иммуноположительных на ГАМК, остается прежним, как и на П5 (8.7 ± 0.3), то есть меньше, чем в контроле (рис. 1в, г). Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на ГАМК на этом сроке существенно ниже (в 1.4 раза) по сравнению с контрольным значением (0.114 ± 0.008) (табл. 1).

Таким образом, у контрольных животных в поле СА3, начиная с П5 и до конца неонатального периода, сохраняется постоянное число нейронов, содержащих ГАМК. Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на ГАМК к концу неонатального периода значительно (в 1.6 раза) увеличивается. Воздействие перинатальной гипоксии приводит к сокращению числа нейронов, содержащих ГАМК, в 2 раза уже к концу не-

натального периода. Значение оптической плотности продукта реакции на ГАМК к концу неонатального периода также снижается в 1.4 раза по сравнению с контролем.

Распределение субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора в поле СА1 в неонатальный период у контрольных животных и после воздействия гипоксии. У контрольных животных на П5 в поле СА1 большинство клеток, входящих в состав пирамидного слоя, иммуноположительны на $\alpha 1$ ГАМК_A. Между нейронами выявляется тонкая сеть иммуноположительных терминальных отростков. На отростках и иногда на телах нейронов присутствуют единичные мелкие гранулы (синаптические структуры). Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на белок $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора составляет 0.175 ± 0.005 (табл. 2). На П10 в поле СА1 также подавляющее большинство клеток слоя иммуноположительны на $\alpha 1$ ГАМК_A, их апикальные дендриты уходят в *str. radiatum*. Между клетками выявляется тонкая сеть терминальных отростков с малочисленными гранулами (рис. 2а, увел. фрагмент). Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на $\alpha 1$ субъединицу ГАМК_A-рецептора достоверно не отличается от значения на П5 (0.158 ± 0.007) (табл. 2). После воздействия гипоксии на П5 в поле СА1 большинство клеток иммуноположительны на $\alpha 1$ ГАМК_A, однако есть мелкие единичные иммуноотрицательные клетки, которые локализуются в нижних рядах пирамидного слоя и напоминают малодифференцированные молодые нейроны. На телах пирамидных нейронов практически нет гранул (в отличие от контроля) и отсутствует сеть терминальных отростков. Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на $\alpha 1$ ГАМК_A в 1.2 раза ниже, чем на этом сроке в контроле (0.142 ± 0.004) (табл. 2). На П10 после воздействия гипоксии в поле СА1 подавляющее большинство нейронов иммуноположительны на $\alpha 1$ ГАМК (рис. 2б). В слое между нейронами отростки и гранулы единичны (рис. 2б, увел. фрагмент). Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на белок $\alpha 1$ ГАМК_A ниже (в 1.3 раза), чем в контроле и составляет 0.124 ± 0.006 (табл. 2).

Таким образом, у контрольных животных в течение неонатального периода в поле СА1 большинство клеток иммуноположительны

Таблица 2. Показатели оптической плотности продукта иммунной реакции при выявлении белка субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора в полях СА1 и СА3 гиппокампа крыс на 5-е и 10-е неонатальные сутки в контроле и после воздействия гипоксии

Поля гиппокампа	Оптическая плотность, усл. ед.			
	Контроль		После воздействия гипоксии	
	П5	П10	П5	П10
СА1	0.175 ± 0.005	0.158 ± 0.007	$0.142 \pm 0.004^*$	$0.124 \pm 0.006^*$
СА3	0.132 ± 0.008	0.133 ± 0.004	$0.097 \pm 0.006^*$	$0.107 \pm 0.005^*$

Примечание. * Различия между экспериментальной и контрольной группами достоверны при $P < 0.05$.

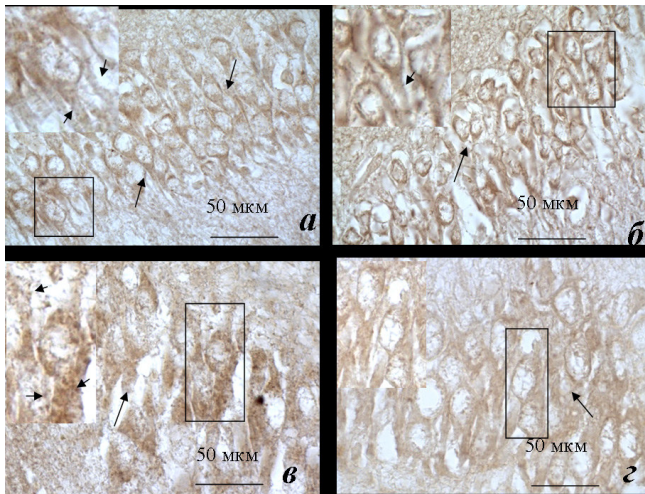


Рис. 2. Гиппокамп крысы на 10 неонатальные сутки, поля СА1 (а, б) и СА3 (в, з) в контроле (а, в) и после воздействия гипоксии (б, з). Иммуногистохимическая реакция на выявление субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора. Увел. 100 $\times$.

а — иммуноположительные нейроны в поле СА1 (длинные стрелки); на отростках и телах нейронов гранулы, предполагаемые синаптические структуры (короткие стрелки, увел. фрагмент); б — иммуноположительные нейроны (длинные стрелки) в СА1, единичные гранулы на отростках после воздействия гипоксии (короткие стрелки, увел. фрагмент); в — иммуноположительные нейроны (длинные стрелки), отростки с гранулами (короткие стрелки, увел. фрагмент); з — иммуноположительные нейроны (длинные стрелки) располагаются близко друг к другу, объем цитоплазмы небольшой, на отростках и телах клеток гранул почти нет (увел. фрагмент).

на $\alpha 1$ ГАМК_A. Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на $\alpha 1$ ГАМК_A высокое и к концу неонатального периода не изменяется. Воздействие перинатальной гипоксии вызывает задержку формирования поля СА1, которая выявляется уже на П5. Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на $\alpha 1$ ГАМК_A ниже, чем

в контроле. К концу неонатального периода оно продолжает снижаться.

Распределение субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A рецептора в нейронах поля СА3 в неонатальный период у контрольных животных и после воздействия гипоксии. У контрольных животных на П5 в поле СА3 большинство пирамидных нейронов иммуноположительны на $\alpha 1$ ГАМК_A. Между нейронами выявляется сеть тонких отростков с варикозным расширением и гранулами, предполагаемыми синаптическими структурами. Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на $\alpha 1$ ГАМК_A составляет 0.132 ± 0.008 (табл. 2). На П10 в поле СА3 большинство нейронов также иммуноположительны на $\alpha 1$ ГАМК_A. На отростках присутствуют гранулы (рис. 2в, увел. фрагмент). В общем, морфологическая картина идентична таковой на предыдущем сроке развития (П5). Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на $\alpha 1$ ГАМК_A на этом сроке не изменяется и составляет 0.133 ± 0.004 (табл. 2). После воздействия гипоксии на П5 в поле СА3 нейроны располагаются близко друг к другу и имеют меньший объем цитоплазмы, которая в различных клетках имеет разную интенсивность иммуноокрашивания. Между нейронами иммуноположительные терминали единичны, на телах нейронов и отростках гранул почти нет. Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на $\alpha 1$ ГАМК_A составляет 0.097 ± 0.006 , что ниже, чем в контроле примерно в 1.4 раза (табл. 2). На П10 после воздействия гипоксии в поле СА3 близость расположения нейронов друг к другу, редкие отростки в слое, единичные гранулы и небольшая плотность нейротиля в *str. moleculare*, вероятно, свидетельствуют о задержке развития поля СА3 по сравнению с контролем. Значение оптической

ской плотности продукта иммунной реакции на $\alpha 1$ ГАМК_A составляет 0.107 ± 0.005 (табл. 2), что ниже, чем в контроле примерно в 1.2 раза.

Таким образом, у контрольных животных в поле СА3 подавляющее большинство клеток и отростков иммуноположительны на $\alpha 1$ ГАМК_A и значение оптической плотности продукта иммунной реакции не изменяется, оставаясь постоянным в течение неонатального периода. Воздействие перинатальной гипоксии приводит к задержке нейрогенеза и формирования нейропиля. Значение оптической плотности продукта иммунной реакции на $\alpha 1$ ГАМК_A к концу неонатального периода существенно снижается (в 1.4 раза) по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе изучали динамику изменения численности популяции ГАМКергических интернейронов, содержания ГАМК и субъединицы $\alpha 1$, входящей в состав ГАМК_A-рецептора (ГАМК_A $\alpha 1$) в полях СА1 и СА3 гиппокампа во время неонатального периода в норме и после воздействия перинатальной гипоксии. Результаты работы свидетельствуют о том, что у контрольных животных в неонатальный период в полях СА1 и СА3 пирамидного слоя гиппокампа статус элементов ГАМКергической системы отличается. Показано, что уже в течение первой недели после рождения как в поле СА1, так и СА3 присутствуют одинаковые по численности популяции нейронов, содержащих ГАМК. Однако к концу неонатального периода в поле СА1 число таких нейронов существенно увеличивается (в 1.5 раза), также в них возрастает содержание и самой ГАМК (в 1.3 раза). В поле СА3 к П10 достоверного увеличения числа ГАМК-содержащих нейронов отмечено не было, вероятно, цитоархитектоника в поле СА3 устанавливается к концу первой неонатальной недели. К П10 содержание самой ГАМК в ГАМК-содержащих клетках поля СА3, также как и в СА1, существенно увеличивается (в 1.6 раза). Выявленное постепенное повышение присутствия ГАМК в обоих полях пирамидного слоя в течение неонатального периода у контрольных животных, вероятно, связано с двумя процессами, происходящими одновременно в период с П5 по П14: во-первых, со сменой функции ГАМК с возбуждающей

на тормозную и, во-вторых, с активацией процессов синаптогенеза (Ben-Ari et al., 1994; Ben-Ari, 2006). Вероятно, в поле СА3 цитоархитектоника пирамидного слоя и ГАМКергическая сеть формируются уже к концу первой неонатальной недели в отличие от поля СА1. Это предположение согласуется с результатами исследования, проведенного на развивающемся мозге. Установлено, что в нейроэпителии медиальной стенки переднего мозгового пузыря, где формируются пирамидные нейроны гиппокампа, первыми появляются нейроны поля СА3, а затем СА1 (это 15–19-е эмбриональные сутки). Процесс миграции молодых пирамидных нейронов к месту их definitivoй локализации длительный и занимает несколько суток, при этом показано, что миграция нейронов в поле СА3 заканчивается, в основном, к моменту рождения, а в поле СА1 продолжается до конца неонатального периода, т.е. формирование пирамидного слоя в поле СА1 происходит позже, чем в СА3. Дифференцировка пирамидных нейронов поля СА3 осуществляется тоже раньше, чем нейронов поля СА1 (Altman, Bayer, 1990).

Полученные данные свидетельствуют о том, что воздействие гипоксии в первые неонатальные сутки оказывает существенное повреждающее воздействие на становление ГАМКергической системы гиппокампа. Так, после воздействия гипоксии в поле СА1 достоверного увеличения количества нейронов, содержащих ГАМК, к концу неонатального периода не происходит, и оно соответствует его значению на П5 в контроле, при этом содержание самой ГАМК в нейронах существенно снижается (примерно в 1.4 раза). В поле СА3 воздействие гипоксии приводит к существенному сокращению (в 2 раза) численности популяции ГАМКергических нейронов, а содержание самой ГАМК также значительно снижается, как и в поле СА1 (примерно в 1.4 раза). С большой долей вероятности можно предположить, что существенное снижение численности популяции ГАМКергических нейронов в полях гиппокампа к концу неонатального периода вызвано воздействием гипоксии на процесс миграции.

У млекопитающих ГАМКергические интернейроны образуются пренатально, как и пирамидные нейроны, при этом пик их нейрогенеза наступает раньше, чем пик ней-

рогенеза пирамидных нейронов (Soriano, Cobas, 1986). Практически все ГАМКергические интернейроны гиппокампа происходят из ганглиозных возвышений базальных ганглиев вентральной части переднего мозга. Эти клетки имеют типичный вид мигрирующих незрелых нейронов с двумя короткими отростками. Установлено, что миграция интернейронов в гиппокамп происходит тангенциально через развивающуюся кору. При этом миграционный путь представляет собой достаточно большое расстояние (от базальных ганглиев до гиппокампа) и продолжается около четырех суток (Pleasure et al., 2000). Вероятно, в условиях данной работы время воздействия гипоксии совпадает с активной миграцией популяций интернейронов, при этом клеток, мигрирующих в поле СА3, повреждается больше. В свою очередь, длительность периода миграции ГАМКергических нейронов может быть серьезным фактором, обеспечивающим продолжительный период уязвимости незрелых нейронов во время развития, когда воздействие неблагоприятных факторов будет приводить к повреждению и утрате части популяции незрелых клеток, о чем и могут свидетельствовать полученные результаты.

На уязвимость развивающегося гиппокампа в неонатальный период указывают данные, полученные в ряде недавних работ, в которых было показано, что у недоношенных детей, переживших асфиксию были повреждены глубокие подкорковые структуры, снижен объем таламуса, бледного шара и гиппокампа. У детей 2-х летнего возраста при уменьшенном размере гиппокампа наблюдалось ухудшение двигательных и когнитивных показателей (Strahle et al., 2019). Считают, что повреждение гиппокампа, полученное в результате перинатальной асфиксии, сохраняется на протяжении всего развития, приводя к нарушениям памяти и снижению IQ, как у детей, так и у взрослых (Strahle et al., 2019). В работе других авторов показано, что у животных, перенесших асфиксию, имеет место утрата части нейронов и замедленный рост гиппокампа в сочетании с устойчивым производством микроглии (Galinsky et al., 2018; Davidson et al., 2021; Lear et al., 2023).

Воздействие перинатальной гипоксии вызывает активацию не только микроглии, но и гипертрофию астроцитов, которые на-

чинают высвобождать провоспалительные цитокины, оксид азота, индуцируя воспалительную реакцию, приводящую к разрушению гематоэнцефалического барьера, гибели нейральных клеток и сокращению численности их популяций. Полагают, что эти изменения, наряду с другими, являются факторами провоцирующими эпилептогенез (Vezzani et al., 2013; Galinsky et al., 2018; Volpe et al., 2019; Ophelders et al., 2020; Davidson et al., 2021; Martino et al., 2024).

Наблюдения показали, что большинство клеток и нейропилы в полях СА1 и СА3 иммуноположительны на ГАМК_A $\alpha 1$. Анализ распределения субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора выявил достаточно высокое ее содержание как в нейронах поля СА1, так и в СА3 уже во время первой неонатальной недели и этот уровень сохранялся до конца неонатального периода. При этом в поле СА1 содержание субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора было выше в 1.3 раза, чем в поле СА3. Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее на новорожденных свиньях, о том, что в полях СА1 и СА3 значительное количество клеток и отростков иммуноположительны на $\alpha 1$ ГАМК_A и обнаружена высокая экспрессия $\alpha 1$ субъединицы на П7 (Kalanjati et al., 2011), т.е. к концу первой и началу второй постнатальной недели.

Сейчас доказано, что процессы, происходящие в течение второй неонатальной недели: смена функции ГАМК с возбуждающей на тормозную, формирование нейропиля и активный синаптогенез, играют важную роль в развитии и становлении многих систем гиппокампа (Cherubini et al., 1991; Ben-Ari et al., 1994; Ben-Ari, 2006; Kalanjati et al., 2011; Leal et al., 2015). Осуществление каждого из них может вызывать в этот период значительное повышение содержания как самой ГАМК, так и ГАМК_A $\alpha 1$, основного рецептора при синаптической тормозной нейротрансмиссии. Несомненно, воздействие повреждающих факторов будет приводить к изменению протекания этих процессов и играть определяющую роль в патогенезе заболеваний.

Результаты настоящей работы показали, что у животных, переживших перинатальную асфиксию, в обоих полях СА1 и СА3 уже в течение первой неонатальной недели имеет

место достоверное уменьшение содержания субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора, а к концу неонатального периода тенденция к снижению ее содержания остается и этот уровень оказывается существенно ниже, чем в контроле.

Субъединица $\alpha 1$ достаточно широко распространена в разных структурах мозга, при этом было показано, что дефицит $\alpha 1$ выявляется при некоторых нейропсихических расстройствах. Так, у пациентов с височной эпилепсией в полях СА1, СА2 и СА3 гиппокампа, наряду с изменением состава субъединиц ГАМК_A-рецепторов, было обнаружено значительное снижение уровня экспрессии генов некоторых субъединиц и, в том числе, $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора (Pirker et al., 2003). Мутация A1a322Asp в локусе 5q34 гена, кодирующего субъединицу $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора, приводящая к снижению содержания субъединицы $\alpha 1$ и, в результате, к уменьшению амплитуды тока ионов хлора, была выявлена у пациентов с ювенильной миоклонической эпилепсией (Laurén et al., 2003). При эпилепсии в пирамидных нейронах полей СА1 и СА3 была выявлена различная интенсивность экспрессии разных субъединиц рецептора ГАМК_A, что предполагает неодинаковый тормозной эффект на нейроны разных полей гиппокампа (Hales et al., 2006). Изменение экспрессии генов, кодирующих белки синтеза, захвата, деградации и связывания самой ГАМК, некоторых субъединиц, в том числе и $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора, значительное снижение GAD в СА1, СА2 и СА3 гиппокампа было выявлено при височной эпилепсии и биполярной депрессии (Brooks-Kayal et al., 1998).

Таким образом, результаты проведенной работы показали, что у животных, перенесших асфиксию, уже в первые недели неонатального периода происходит изменение организации тормозной ГАМКергической системы. В обоих полях СА1 и СА3 сокращается число интернейронов, снижается содержание ГАМК и белка субъединицы $\alpha 1$ ГАМК_A-рецептора, происходит задержка развития нейропиля, все это может приводить к дисфункции тормозной системы уже на самом раннем этапе онтогенеза. В заключение следует отметить, что в настоящее время не угасает интерес к изучению ГАМК и ГАМК_A-рецепторов. В значительной степени это объясняется тем, что существующие средства, применяемые для купирования последствий

перинатальной асфиксии у новорожденных, не обладают высокой эффективностью. Знание строения, функций и участия субъединичного состава ГАМК_A-рецепторов и самой ГАМК в развитии энцефалопатий у новорожденных может способствовать разработке новых высокоэффективных препаратов, действующих на определенные рецепторные мишени.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета в рамках государственного задания (№ 1021062411653-4-3.1.8) Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных при соблюдении требований директив Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных, а также требованиям комиссии по биоэтике ИФ РАН (протокол этического комитета Института физиологии им. И.П. Павлова РАН № 10/14 от 14.10.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Altman J., Bayer A. 1990. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurology*. V. 301. P. 325.
- Back S.A. 2017. White matter injury in the preterm infant: Pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*. V. 134. P. 331.
- Ben-Ari Y. 2006. Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain. *Epileptic Disord*. V. 8. P. 91.
- Ben-Ari Y., Cherubini E., Corradetti R., Gaiarsa J.L. 1989. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol*. 1989. V. 416. P. 303.
- Ben-Ari Y., Tseeb V., Ragozzino D., Khazipov R., Gaiarsa J.L. 1994. γ -Aminobutyric acid (GABA): A fast excitatory transmitter which may regulate the develop-

- ment of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog. Brain Res.* V. 102. P. 261.
- Brooks-Kayal A.R., Shumate M.D., Jin H., Rikhter T.Y., Coulter D.A. 1998. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat. Med.* V. 4. P. 1166.
- Cherubini E., Gaiarsa J.L., Ben-Ari Y. 1991. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* V. 14. P. 515.
- Crowley S.K., Girdler S.S. 2014. Neurosteroid, GABAergic and hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis regulation: what is the current state of knowledge in humans? *Psychopharm. (Berl).* V. 231. P. 3619.
- Cullinan W.E., Ziegler D.R., Herman J.P. 2008. Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct. Funct.* V. 213. P. 63.
- Davidson J.O., Heui L.G., Fraser M., Wassink G., Miller S.L., Lim R., Wallace E.M., Jenkin G., Gunn A.J., Bennet L. 2021. Window of opportunity for human amnion epithelial stem cells to attenuate astrogliosis after umbilical cord occlusion in preterm fetal sheep. *Stem Cells Transl. Med.* V. 10. P. 427.
- Demarque M., Represa A., Becq H., Khalilov I., Ben-Ari Y., Aniksztejn L. 2002. Paracrine intercellular communication by a Ca^{2+} - and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron.* V. 36. P. 1051.
- Douglas-Escobar M., Weiss M.D. 2015. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatr.* V. 169. P. 397.
- Farhy-Tselnick I., Allen N.J. 2018. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev.* V. 13. P. 7.
- Farrant M., Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature Rev. Neurosci.* V. 6. P. 215.
- Galinsky R., Lear C.A., Dean J.M., Wassink G., Dhillon S.K., Fraser M., Davidson J.O., Bennet L., Gunn A.J. 2018. Complex interactions between hypoxia-ischemia and inflammation in preterm brain injury. *Dev. Med. Child Neurol.* V. 60. P. 126.
- Hales T.G., Deeb T.Z., Tang H., Bollan K.A., King D.P., Johnson S.J., Connolly C.N. 2006. An asymmetric contribution to gamma-aminobutyric type A receptor function of a conserved lysine within TM2-3 of $\alpha 1$, $\beta 2$, and $\gamma 2$ subunits. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 17034.
- Janigro D., Schwartzkroin P.A. 2011. Effects of GABA on CA3 pyramidal cell dendrites in rabbit hippocampal slices. *Brain Res.* V. 453. P. 265.
- Kalanjati V.P., Miller S.M., Ireland Z., Colditz P.B., Bjorkman S.T. 2011. Developmental expression and distribution of GABA(A) receptor $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ - and $\beta 2$ -subunits in pig brain. *Dev. Neurosci.* V. 33. P. 99.
- Khalilov I., Minlebaev M., Mukhtarov M., Khazipov R. 2015. Dynamic changes from depolarizing to hyperpolarizing GABAergic actions during giant depolarizing potentials in the neonatal rat hippocampus. *J. Neurosci.* V. 35. Art. ID 1263542.
- Khazipov R., Zaynutdinova D., Ogievetsky E., Valeeva G., Mitrukhina O., Manent J.-B., Represa A. 2015. Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Front. Neuroanat.* V. 9. P. 161.
- Laurén H.B., Pitkänen A., Nissinen J., Soini S.L., Korpi E.R., Holopainen I.E. 2003. Selective changes in gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits in the hippocampus in spontaneously seizing rats with chronic temporal lobe epilepsy. *Neurosci. Lett.* V. 349. P. 58.
- Leal G., Afonso P.M., Salazar I.L., Duarte C.B. 2015. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res.* V. 24. P. 1621.
- Lear B.A., Lear C.A., Dhillon S.K., Davidson J.O., Gunn A.J., Bennet L. 2023. Evolution of grey matter injury over 21 days after hypoxia-ischaemia in preterm-fetal sheep. *Exper. Neurol.* V. 363. Art. ID 114376.
- Majd A.M., Tabar F.E., Afghani A., Ashrafpour S., Dehghan S., Gol M., Ashrafpour M., Pourabdolhossein F. 2018. Inhibition of GABA A receptor improved spatial memory impairment in the local model of demyelination in rat hippocampus. *Behav. Brain Res.* V. 15. P. 111.
- Martino E.D., Ambikan A., Ramsköld D., Umekawa T., Giatrellis S., Vacondio D., Romero A.L., Galán M.G., Sandberg R., Ådén U., Lauschke V., Neogi U., Blomgren K., Kele J. 2024. Inflammatory, metabolic, and sex-dependent gene-regulatory dynamics of microglia and macrophages in neonatal hippocampus after hypoxia-ischemia. *Science.* V. 27. P. 109346.
- Mohler H. 2006. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* V. 326. P. 505.
- Naderipour P., Amani M., Abedi A., Sakhaie N., Sadegzadeh F., Saadati H. 2021. Alterations in the behavior, cognitive function, and BDNF level in adult male rats following neonatal blockade of GABA-A receptors. *Brain Res. Bull.* V. 169. P. 35.
- Ngo D.-H., Vo T.S. 2019. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid. *Molecules.* V. 24. P. 2678.
- Odd D.E., Lewis G., Whitelaw A., Gunnell D. 2009. Resuscitation at birth and cognition at 8 years of age: A cohort study. *Lancet.* V. 373. P. 1615.
- Ophelders D.R., Gussenhoven R., Klein L., Jellema R.K., Westerlaken R.J., Hütten M.C., Vermeulen J., Wassink G., Gunn A.J., Wolfs T.G. 2020. Preterm brain injury, antenatal triggers, and therapeutics: Timing is key. *Cells (Basel, Switzerland).* V. 9. P. 1871.
- Otellin V.A., Khozhai L.I., Shishko T.T., Vershinina E.A. 2021. Nucleolar ultrastructure in neurons of the rat

- neocortical sensorimotor area during the neonatal period after perinatal hypoxia and its pharmacological correction. *J. Evol. Biochem. Physiol.* V. 57. P. 1251.
- Pirker S., Schwarzer C., Czech T., Baumgartner C., Pockberger H., Maier H., Hauer B., Sieghart W., Frittinger S., Sperk G. 2003. Increased expression of GABA(A) receptor beta-subunits in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* V. 62. P. 820.
- Pleasure S.J., Anderson S., Hevner R., Bagri A., Marin O., Lowenstein D.H., Rubenstein J.L. 2000. Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron.* V. 28. P. 727.
- Poo M.M. 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 2. P. 24.
- Rudolph U., Möhler H. 2006. GABA-based therapeutic approaches: GABA_A receptor subtype functions. *Curr. Opin. Pharmacol.* V. 6. P. 18.
- Soriano E., Cobas A. 1986. A fairén asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus. *Brain Res.* V. 395. P. 88.
- Strahle J.M., Triplet R.L., Alexopoulos D., Smyser T.A., Rogers C.E., Limbrick D.D., Smyser C.D. 2019. Impaired hippocampal development and outcomes in very preterm infants with perinatal brain injury. *NeuroImage Clin.* V. 22: 101787.
- Tyler W.J., Alonso M., Bramham C.R., Pozzo-Miller L.D. 2002. From acquisition to consolidation: On the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem.* V. 9. P. 224.
- Vezzani A., Aronica E., Mazarati A., Pittman Q.J. 2013. Epilepsy and brain inflammation. *Exp. Neurol.* V. 244. P. 11.
- Volpe J.J. 2019. Dysmaturation of premature brain: importance, cellular mechanisms, and potential interventions. *Pediatr. Neurol.* V. 95. P. 42.

FEATURES OF THE DISTRIBUTION OF GABA AND THE $\alpha 1$ SUBUNIT OF THE GABA_A RECEPTOR IN THE CA1 AND CA3 FIELDS OF THE HIPPOCAMPUS IN NEWBORN RATS AFTER ASPHIXIA IN THE NEONATAL PERIOD

L. I. Khozhai

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034, Russia
E-mail: astarta0505@mail.ru

A study was conducted of the dynamics of changes in the population of GABAergic neurons and the protein content of the $\alpha 1$ subunit, which is included in of the GABA_A receptor (GABA_A $\alpha 1$) in the CA1 and CA3 fields of the hippocampus during the neonatal period under normal conditions and after exposure to perinatal hypoxia. The study used a model of human premature pregnancy. Exposure to hypoxia was carried out on the 2nd day after birth, in a special chamber with oxygen content in the respiratory mixture of 7.8%. Immunohistochemical research methods were used to detect GABA and the $\alpha 1$ GABA_A receptor subunit protein. The hippocampus was studied on days 5 and 10. It was shown that in control animals during the neonatal period, in fields CA1 and CA3, there is a gradual increase in the population of GABAergic neurons, an increase in the content of GABA itself and the protein of the $\alpha 1$ GABA_A receptor subunit. Asphyxia during the perinatal period leads to a reduction in the number of GABAergic neurons in both fields CA1 and CA3, a decrease in the content of GABA itself, the protein of the $\alpha 1$ subunit of the GABA_A receptor and a delay in the development of the neuropil. Thus, in animals that have experienced asphyxia, by the end of the neonatal period, changes in the organization of the GABAergic system are already expressed in parts of the hippocampus, which can lead to dysfunction of the inhibitory system already at the earliest stages of development.

Keywords: GABA, $\alpha 1$ subunit of the GABA_A receptor, hippocampus, neonatal period, perinatal hypoxia