

ISSN 0233-4755

Том 40, Номер 4

Июль - Август 2023



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 40, номер 4, 2023

ОБЗОРЫ

Система комплемента как общее звено в патогенезе гемолитико-уремического синдрома <i>М. С. Блинова, Г. А. Генералова, Х. М. Эмирова, Е. Г. Попов, Н. В. Цветаева, С. А. Васильев, П. П. Авдонин</i>	235
Мембраноактивные митохондриально направленные агенты и системы доставки препаратов противоопухолевого действия <i>А. П. Садигов, З. Г. Дениева, У. А. Буданова, Ю. Л. Себякин</i>	259

Электропорация липидных мембран не может быть описана моделью постоянного линейного натяжения кромки поры <i>П. К. Гифер, О. В. Батищев</i>	273
Производное бензимидазола NS1619 подавляет функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышей <i>М. В. Дубинин, А. Д. Игошкина, А. А. Семенова, Н. В. Микина, Е. И. Хорошавина, К. Н. Белослудцев</i>	279
Силовые характеристики взаимодействия липополисахарида <i>Yersinia pestis</i> с рецепторами TLR4 и CD14 макрофагов J774: атомно-силовая микроскопия <i>В. С. Белозёров, Б. А. Ананченко, И. В. Коньшев, Л. Г. Дудина, С. А. Коннова, Э. В. Рожина, Р. Ф. Фахруллин, А. А. Бывалов</i>	289
Правила для авторов	298

Contents

Vol. 40, No. 4, 2023

REVIEWS

Complement System As a Common Link in the Pathogenesis of Hemolytic Uremic Syndrome <i>M. S. Blinova, G. A. Generalova, Kh. M. Emirova, E. G. Popov, N. V. Tsvetaeva, S. A. Vasiliev, P. P. Avdonin</i>	235
Membrane-Active Mitochondria-Targeted Antitumor Agents and Drug Delivery Systems <i>A. P. Sadikov, Z. G. Denieva, U. A. Budanova, Yu. L. Sebyakin</i>	259

Lipid Membrane Electroporation Cannot Be Described by the Constant Line Tension Model of the Pore Edge <i>P. K. Gifer, O. V. Batishchev</i>	273
Benzimidazole Derivative NS1619 Inhibits Functioning of Mitochondria Isolated from Mouse Skeletal Muscle <i>M. V. Dubinin, A. D. Igoshkina, A. A. Semenova, N. V. Mikina, E. I. Khoroshavina, K. N. Belosludtsev</i>	279
Force Characteristics of <i>Yersinia pestis</i> Lipopolysaccharide Interaction with TLR4 and CD14 Receptors on J774 Macrophages. Atomic Force Microscopy <i>V. S. Belozarov, B. A. Ananchenko, I. V. Konyshov, L. G. Dudina, S. A. Konnova, E. V. Rozhina, R. F. Fakhrullin, A. A. Byvalov</i>	289
Instructions for authors	298

УДК 571.27,616.63-008.6

СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА КАК ОБЩЕЕ ЗВЕНО В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА

© 2023 г. М. С. Блинова^а, Г. А. Генералова^{б, в}, Х. М. Эмирова^{б, в}, Е. Г. Попов^д, Н. В. Цветаева^е, С. А. Васильев^е, П. П. Авдонин^{а, *}

^аИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, 119334 Россия

^бДетская городская клиническая больница святого Владимира,
Москва, 107014 Россия

^вМосковский государственный медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова МЗ РФ, Москва, 127473 Россия

^дНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии
имени академика Е.И. Чазова МЗ РФ, Москва, 121552 Россия

^еГематологический научный центр МЗ РФ, Москва, 125167 Россия

*e-mail: ppavdonin@gmail.com

Поступила в редакцию 17.03.2023 г.

После доработки 31.03.2023 г.

Принята к публикации 03.04.2023 г.

Гемолитико-уремический синдром (ГУС) – заболевание, являющееся наиболее частой причиной развития острой почечной недостаточности у детей. Наиболее распространенной причиной развития ГУС являются инфекции, вызванные продуцирующими шига-токсин бактериями: геморрагической *Escherichia coli* и *Shigella dysenteriae* 1 типа. На их долю приходится до 90% всех случаев ГУС. Остальные 10% представляют из себя гетерогенную группу заболеваний, носящую общее название атипичный ГУС. В основе патогенеза большинства случаев атипичного ГУС лежат врожденные или приобретенные нарушения в работе системы комплемента. За последние десятилетия накопились данные о том, что кроме *E. coli* и *Sh. dysenteriae* 1 типа самые разные бактериальные и вирусные инфекции, включая возбудителей пневмонии *Streptococcus pneumoniae*, иммунодефицита, гриппа H1N1, новой коронавирусной инфекции, способны вызывать развитие ГУС. В частности, инфекционные заболевания выступают в качестве основной причины рецидива атипичного ГУС. В данном обзоре представлены обобщенные данные последних исследований, свидетельствующие о том, что при разных видах инфекционного ГУС ключевым патогенетическим фактором являются нарушения в работе системы комплемента. Рассмотрены звенья в системе комплемента, дисрегуляция которых при бактериальных и вирусных инфекциях может приводить к гиперактивации комплемента с последующим повреждением эндотелия микрососудов и развитием острой почечной недостаточности.

Ключевые слова: гемолитико-уремический синдром, система комплемента, тромботическая микроангиопатия, экулизумаб, *Escherichia coli*, шига-токсин, STEC-ГУС, гемолитическая анемия, тромбоцитопения, острая почечная недостаточность, патогенез, эндотелий

DOI: 10.31857/S0233475523040047, **EDN:** OJTBPO

ВВЕДЕНИЕ

Гемолитико-уремический синдром (ГУС) является одной из форм тромботических микроангиопатий (ТМА), которая характеризуется наличием трех выраженных симптомов: тромбоцитопенией, острой почечной недостаточности и микроангиопатической гемолитической анемии. Данный синдром является одной из самых частых причин развития почечной недостаточности у детей. В основе развития ГУС лежит целый спектр различных причин, которые определяют течение заболевания, подходы к лечению, исход. Это мо-

гут быть инфекционные заболевания, дефекты кобаламина С, мутации в гене, кодирующем диацилглицеролкиназу ϵ (DGKE), или генах факторов системы комплемента, антитела к фактору Н системы комплемента, трансплантация органов и тканей, опухолевые, аутоиммунные заболевания и др. Этиология ГУС легла в основу его классификации. Изначально было принято деление всех случаев ГУС на две основные группы: типичный и атипичный ГУС. К типичному ГУС принято относить все случаи, вызванные геморрагическими штаммами *Escherichia coli* и *Shigella dysenteriae*.

В этом случае ключевым патогенным фактором, вызывающим развитие ГУС, являются продуцируемые патогенными бактериями токсины. При этом к аГУС традиционно относили все случаи, не связанные с инфекцией штаммами *E. coli* и *Sh. dysenteriae*. По мере того как накапливались данные о причинах и механизмах развития ГУС, классификация ГУС менялась [1–3]. В 2016 году международная экспертная группой клиницистов и фундаментальных ученых, исследующих ГУС, была предложена классификация, разделяющая все случаи ГУС на 7 групп [4]:

- ГУС, вызванный продуцирующими шигатоксин геморрагической *E. coli* (СТЕС-ГУС) и *Sh. dysenteriae* 1 типа;
- вторичный ГУС (на фоне онкологических заболеваний, трансплантации органов и тканей, приема лекарственных средств, аутоиммунных нарушений, злокачественной гипертензии и ВИЧ-инфекции);
- ГУС, ассоциированный с инфекциями, вызванными вирусом гриппа H1N1 и *Streptococcus pneumoniae*;
- ГУС, ассоциированный с дефектом кобаламина С;
- ГУС, ассоциированный с мутациями в гене DGKE;
- ГУС, вызванный нарушениями в регуляции альтернативного пути системы комплемента (мутации в генах комплемента и антитела к фактору Н);
- ГУС неясной этиологии.

Опираясь на данную классификацию, авторы формируют алгоритмы диагностики и лечения различных форм ГУС. На наш взгляд, данная классификация может быть не совсем корректна. Она относит ГУС, спровоцированный инфекциями *E. coli* и *Sh. dysenteriae*, ВИЧ, вирусом гриппа H1N1 и *S. pneumoniae*, к разным классам ГУС. Между тем результаты исследований говорят о том, что патогенез ГУС при всех перечисленных инфекциях опосредован системой комплемента (см. ниже). При этом данная классификация не учитывает целый спектр других инфекций, способных вызывать развитие ГУС. Также авторы выделяют в отдельный класс случаи ГУС, ассоциированные с нарушениями в регуляции альтернативного пути комплемента, оставляя открытым вопрос о том, какие же в таком случае события служат триггером для развития атипичного ГУС. Наличие мутаций в генах факторов системы комплемента само по себе не запускает патологический процесс. Поскольку система комплемента является частью иммунной системы человека, логично предполагать, что в качестве триггера, приводящего к нарушению в работе системы комплемента, могут выступать инфекционные заболевания. Подтверждением этому служат ста-

тистические данные, согласно которым в 79% случаев рецидив аГУС развивается на фоне инфекционных заболеваний, преимущественно вирусных [5]. Важно отметить, что спектр инфекционных заболеваний, способных провоцировать развитие ГУС, расширяется. В данном обзоре мы постарались собрать информацию о всех известных на сегодняшний день возбудителях инфекций, способных вызывать ГУС, и роли системы комплемента в патогенезе ГУС при инфекционных заболеваниях.

СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА

Впервые роль дисрегуляции альтернативного пути активации комплемента в повреждении эндотелиальных клеток и развития ТМА была рассмотрена в 1998 году, когда у пациентов с ГУС были обнаружены нарушения в гене CFH, кодирующем фактор комплемента Н [6]. В норме комплемент играет важную роль в обеспечении гуморальной защиты организма, обеспечивая обнаружение и элиминацию патогена [7]. Система комплемента состоит из более чем 40 белков, включая регуляторные белки и рецепторы комплемента [8]. Факторы системы комплемента преимущественно синтезируются гепатоцитами и присутствуют в плазме крови в неактивной форме. Синтез компонентов системы комплемента также может происходить в нейтрофилах (С7) [9] и жировой ткани (фактор D), в меньшей степени в макрофагах/моноцитах, эндотелиальных клетках, кератиноцитах и клетках почечного эпителия [10]. Также появились данные о существовании локальной системы комплемента и наличии белков и рецепторов комплемента внутри иммунных и неиммунных клеток. Данная система была названа комплосомой [11]. Функции системы комплемента обширны и не ограничиваются защитой организма от патогенов, как представлялось изначально.

Факторы системы комплемента задействованы в опсонизации и лизисе патогенов [12, 13], привлечении фагоцитов для их уничтожения [14], модулировании сокращения гладких мышц и проницаемости сосудов, удалении иммунных комплексов и клеточного дебриса [15], ангиогенезе, регенерации тканей и заживлении ран, обеспечении пролиферативных сигналов для клеток адаптивного иммунитета [16], инициации и усилении адаптивного иммунного ответа [17], нейропротекции [18, 19].

Активация комплемента происходит одним или сразу несколькими путями, которые получили название классического, лектинового и альтернативного пути (рис. 1). Конечным результатом активации комплемента является формирование мембраноатакующего комплекса, который

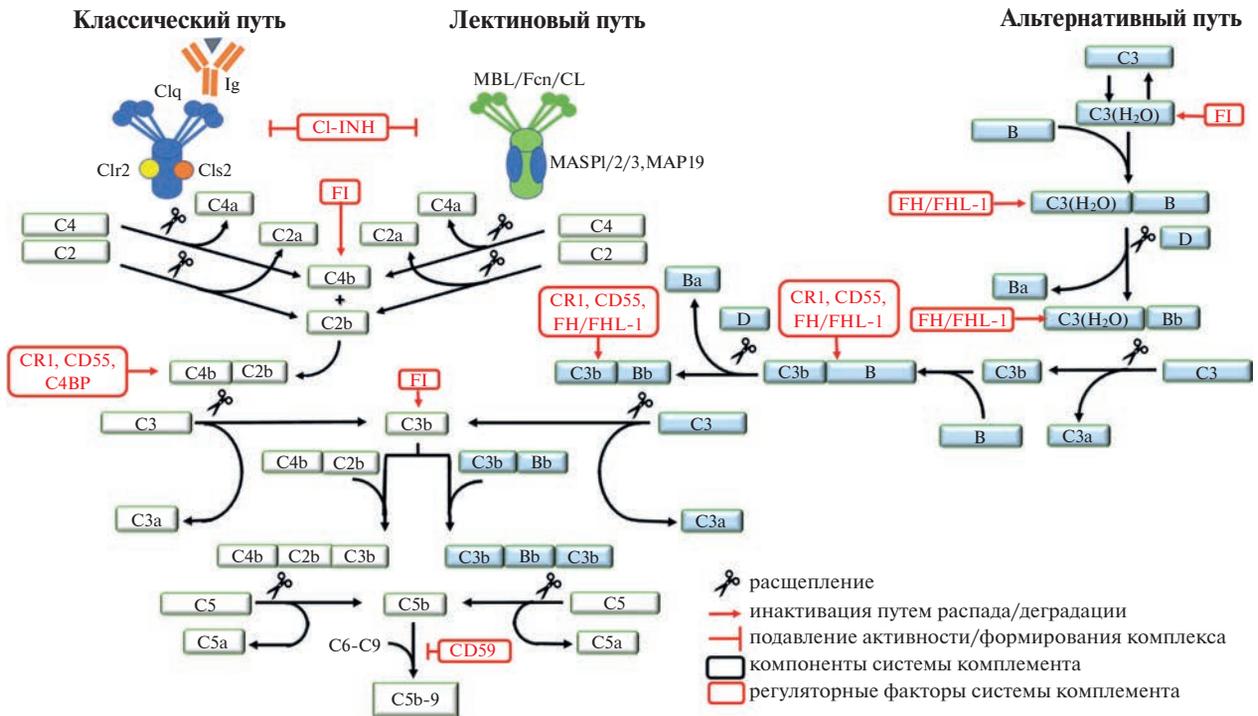


Рис. 1. Схема путей активации системы комплемента. Каскад комплемента инициируется при распознавании комплексов антиген–антитело фрагментом комплемента C1q, связанным с двумя молекулами C1r и C1s (классический путь), либо при распознавании микробных гликанов – лектинами, такими как MBL (mannose binding lectin – маннозсвязывающий лектин) и другие коллектины (CL), а также фиколины (Fcn), в комплексе с MASP-1, MASP-2, MASP-3 (mannose-associated serine protease 1/2/3 – MBL-ассоциированные сериновые протеазы) или MAP19 (MBL-associated protein 19 – MBL-ассоциированный белок 19) (лектиновый путь), а также при спонтанном образовании C3(H₂O) в жидкой фазе (альтернативный путь). CD55 (complement decay-accelerating factor, DAF) – фактор ускорения распада комплемента. CD59 – ингибитор мембраноатакующего комплекса, или протектин. CR1 – рецептор комплемента 1 типа. C4BP (C4b-binding protein) – C4b-связывающий белок. FH/FHL-1 (factor H/factor H-like-1) – фактор H/фактор H-подобный белок 1. FI – фактор I. FD – фактор D. C1-INH (C1 esterase inhibitor) – ингибитор C1-эстеразы. Ig – иммуноглобулин.

создает поры в липидных оболочках патогенных микроорганизмов и мембранах инфицированных клеток, что может привести к их гибели.

Прежде чем обсуждать каскады молекулярных взаимодействий, приводящих к активации системы комплемента, необходимо ознакомиться с номенклатурой белков системы комплемента. Все компоненты классического пути комплемента и мембраноатакующего комплекса обозначаются буквой C, за которой следует число. Нативные компоненты имеют простое числовое обозначение, например, C1 и C2. Нумерация отражает не их место в цепи молекулярных взаимодействий при активации комплемента, а порядок открытия фактора комплемента. В связи с этим последовательность реакций C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9 выглядит нелогично и вызывает трудности в понимании. Активация системы комплемента сопровождается расщеплением нативных факторов с формированием комплексов, обладающих специфическими активностями. Продукты реакций расщепления обозначаются добавлением строч-

ных букв. Большой фрагмент обозначается буквой b, а меньший – a. В случае с C2 большой активный фрагмент расщепления долго было принято обозначать C2a, что является распространенной и по сей день ошибкой. Компоненты альтернативного пути вместо нумерации обозначаются разными заглавными буквами, например, фактор В и фактор D. Как и в случае классического пути, продукты их расщепления обозначаются добавлением строчных букв a и b: таким образом, большой фрагмент В называется Bb, а маленький фрагмент Ba. Наконец, в лектиновом пути при связывании маннозы первыми активируются ферменты, известные как MBL-ассоциированные сериновые протеазы MASP-1 и MASP-2.

Классический путь. Классический путь играет роль как во врожденном, так и в адаптивном иммунитете. Он инициируется при распознавании комплексов антиген-антитело или поверхностно-связанных пентраксинов фрагментом комплемента C1q. C1q является частью компонента C1, который состоит из одной молекулы C1q, свя-

занной с двумя молекулами каждого из зимогенов C1g и C1s. Связывание C1q с мишенью вызывает конформационное изменение в комплексе C1qrs, что приводит к активации автокаталитической ферментативной активности в C1r; затем активная форма C1r расщепляет связанные с ней C1s с образованием активной сериновой протеазы. После активации C1s расщепляет C4 и C2 с образованием двух больших фрагментов, C4b и C2b, которые вместе образуют C3-конвертазу классического пути (C4b2b), и двух малых фрагментов C4a и C2a, функции которых до конца не ясны. В свою очередь C3-конвертаза, оставаясь на поверхности патогена, расщепляет большое количество C3 с образованием фрагментов C3a и C3b [20]. Фрагмент C3a является анафилатоксином, обладающим провоспалительной активностью. Фрагмент C3b либо ковалентно связывается с соседними молекулами на поверхности патогена, обеспечивая распознавание и фагоцитоз фагоцитами, либо связывается с C3-конвертазой с образованием C5-конвертазы C4b2b3b. Несвязавшийся C3b инактивируется гидролизом.

Лектиновый путь запускается при распознавании микробных гликанов рецепторами распознавания образов (PRR – Pattern Recognition Receptors). К таким PRR относятся: 1) маннозосвязывающий лектин (MBL) семейства коллектинов и 2) фиколины. MBL-ассоциированные сериновые протеазы MASP-1 и MASP-2 эволюционно связаны с C1g и C1s и функционируют сходным образом [21]. После связывания MBL с гликанами на поверхности клеточной мембраны патогенов он приобретает сродство к белкам MASP-1, MASP-2, MASP-3 и MAP19 (MBL-associated protein 19), результате чего образуются комплексы нескольких типов, в зависимости от входящих в него компонентов. При взаимодействии с MBL молекулы проферментов MASP активируются и приобретают способность расщеплять компоненты комплемента C4 и C2, проявляя полную функциональную аналогию с комплексом C1qrs классического пути. Дальнейшие реакции лектинового и классического путей совпадают.

Альтернативный путь связывают со спонтанным гидролизом тиоэфирной связи в молекуле C3. Образовавшаяся при этом молекула C3(H₂O) взаимодействует с фактором В. Связывание фактора В с C3(H₂O) позволяет протеазе плазмы, называемой фактором D, расщеплять фактор В до Va и Vb. Фрагмент Vb остается связанным с C3(H₂O) с образованием комплекса C3(H₂O)Vb. Этот комплекс представляет собой C3-конвертазу жидкой фазы, и, хотя он образуется только в небольших количествах, он может расщеплять многие молекулы C3 до C3a и C3b. Запускается фаза амплификации, в результате которой усили-

вается расщепление факторов В и C3. Накапливающийся фрагмент C3b, связавшись с поверхностью клетки-хозяина или патогеном, способен связывать фактор В, обеспечивая его расщепление фактором D с образованием C3-конвертазы альтернативного пути, C3bVb. Активность C3bVb стабилизируется фактором Р, или пропердином, который обнаружен на клеточных поверхностях с пониженным содержанием сиаловой кислоты (например, чужеродных клеточных мембран). В свою очередь, в результате связывания C3b с C3bVb происходит формирование C5-конвертазы C3bVbC3b [20].

Общая терминальная стадия активации комплемента

Терминальная стадия каскада активации комплемента запускается формированием C5-конвертазы. C5-конвертазы альтернативного, лектинового и классического путей действуют сходным образом. Они расщепляют C5 на C5b и C5a. При этом C5a выполняет роль хемотаксической и анафилактогенной молекулы, тогда как C5b, связавшись с другими компонентами комплемента, фиксированными на клеточной мембране, участвует в формировании литического мембраноатакующего комплекса (МАК) [22]. Помимо образования поры и лизиса клеток (в особенности, грамотрицательных бактерий) среди функций МАК упоминаются также стимулирующая активность в поляризации Т-хелперов и роль растворимых МАК в активации тромбоцитов [23, 24].

Регуляторные механизмы комплемента

Чрезмерная активация, например, в результате сепсиса и дисрегуляция комплемента, ошибочное распознавание клеточного дегриса или трансплантатов могут приводить к различным патологическим состояниям [22]. Именно поэтому необходимы сдерживающие регуляторные механизмы, действующие на разных этапах каскадной реакции. Регуляторные факторы могут присутствовать как в жидкой фазе, так и на поверхности клеток. К основным регуляторам комплемента жидкой фазы относятся сывороточный C1INH, C4BP, протеин S, фактор H, фактор I и ингибитор анафилатоксинов AI. Среди клеточно-связанных регуляторов выделяют CD55 (DAF), CD59 (MAC-IP или протектин), MCP (или CD46), CR1 (или CD35) и CR1g [20]. Регуляторы комплемента действуют по-разному. Например, C1INH инактивирует протеазы C1g и C1s в комплексе C1 классического пути системы комплемента; CD55(DAF) вызывает распад C4b2b и, таким образом, прерывает образование C3-конвертазы классического и лектинового пути, а CD59 предотвращает оконча-

тельную сборку мембраноатакующего комплекса [7, 20].

Главную роль в инактивации C3bBb играет фактор комплемента Н (CFH), гликопротеин плазмы, состоящий из 20 коротких консенсусных повторов (SCRs). Фактор Н способен связывать C3b, препятствуя тем самым расщеплению C5 и фактора В на клеточных поверхностях и ингибируя образование C3- и C5-конвертаз. Помимо этого, фактор Н является кофактором для фактора I, регулятора, опосредующего протеолитическое расщепление C3b [20]. Фактор Н действует как в жидкой фазе, так и на поверхностях клеток, путем распознавания клеток-хозяина непосредственно через специфические гликозаминогликаны и сиаловую кислоту или косвенно, например, через С-реактивный белок (СРБ) [25].

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ГУС

Геморрагическая *E. coli*, продуцирующая шига-токсин

Среди инфекционных агентов, провоцирующих развитие гемолитико-уремического синдрома, особое место занимает геморрагическая продуцирующая шига-токсин *E. coli* (STEC). Анализ общедоступных клинических данных показал, что ежегодно инфекции STEC вызывают более 2,8 миллионов острых заболеваний, сопровождаемых различными осложнениями. Среди них в среднем отмечается 3890 случаев ГУС, 270 случаев необратимой терминальной стадии почечной недостаточности и 230 смертей ежегодно во всем мире [26]. STEC-ГУС в основном подвержены дети, пик заболеваемости приходится на возраст от 3 до 5 лет [26]. Уровень заболеваемости в данной возрастной группе достигает 10–17 случаев на 100 000 детей [27]. Современные методы диагностики и лечения позволили существенно снизить смертность, однако STEC по-прежнему остается причиной развития тяжелых осложнений [26].

Источником STEC являются жвачные животные, преимущественно крупный рогатый скот. Заражение происходит при употреблении в пищу недоваренной говядины и непастеризованного молока, овощей, фруктов или воды, загрязненных навозом крупного рогатого скота, при прямом контакте с инфицированными животными, а также при передаче инфекции от человека к человеку [27, 28]. Симптомы проявляются на 2–12 сутки после заражения. Наблюдаются сильные боли в животе, бескровный понос, сопровождающийся рвотой и лихорадкой. В 70% случаев в течение 1–2 дней болезнь прогрессирует и развивается геморрагический колит. Через 6–10 дней после начала диареи наблюдаются первые признаки

развития острой почечной недостаточности. Благодаря раннему диализу смертность среди больных STEC-ГУС удалось сократить с 30 до 5% [29]. Однако у 25–30% выживших пациентов впоследствии отмечаются почечные и неврологические осложнения [30, 31].

Патогенетические механизмы STEC-ГУС

Патогенетические механизмы развития STEC-ГУС сложны и затрагивают целый спектр систем организма. После попадания в организм геморрагическая *E. coli*, продуцирующая шига-токсин (STEC) колонизируют слизистую оболочку кишечника, плотно прикрепляясь к энтероциту. При этом происходит разрушение микроворсинок, перестройка цитоскелета энтероцита и скопление актина вокруг бактерий, образующее пьедесталоподобную структуру над поверхностью плазматической мембраны [32]. Это способствует диарее и воспалению кишечника. Для успешной колонизации органов-мишеней STEC может продуцировать различные факторы вирулентности в виде протеаз, которые инактивируют систему комплемента. Примером может служить внеклеточная сериновая протеаза EspP, которая расщепляет C3/C3b и C5, инактивируя таким образом каскад комплемента и способствуя тем самым выживанию бактерий в организме хозяина [33]. Также протеаза EspP может оказывать цитотоксический эффект [34]. Выделяемый STEC шига-подобный токсин (Stx), называемый также веротоксином, проходит через эпителий желудочно-кишечного тракта и повреждает кровеносные сосуды толстой кишки, вызывая кровавый понос [35]. Попадая в кровоток, он мигрирует по кровеносному руслу к органам, клетки которых экспрессируют на своей поверхности гликофинголипидные глоботриаозилцерамидные [Gb3Cer] и глоботетраозилцерамидные [Gb4Cer] рецепторы веротоксинов. К таким органам, в первую очередь, относятся почки, головной мозг и легкие [36, 37]. Известно, что Stx имеет две изоформы, Stx1 и Stx2, которые, в свою очередь, разделяют на подтипы [38]. Отличительные особенности механизмов действия Stx1 и Stx2 еще предстоит выяснить, однако уже известно, что в клинических условиях Stx2 вызывает более тяжелые симптомы [39].

Цитотоксичность Stx может повышаться липолисахаридом (ЛПС) наружной мембраны грамотрицательных бактерий за счет активации рецепторов Stx и увеличения его ингибирующей активности, влияющей на синтез белка в клетке [40, 41]. Так, на модели мышей было продемонстрировано, что сочетание Stx и ЛПС вызывает ГУС-подобный ответ и изменения эндотелиальных клеток клубочков почек, отличные от наблю-

даемых при воздействии одиночным Stx или ЛПС [42–44]. Таким образом грамотрицательные бактерии могут усиливать вызванное Stx воспаление и повреждение внутренних органов.

Все Stx состоят из одной биологически активной субъединицы А (32 кДа), которая связана с пятью субъединицами В (7.7 кДа) [45]. Данная структура позволяет бактерии безопасно для себя секретировать токсин и обеспечивает связывание с клетками, экспрессирующими рецепторы Gb3Cer/CD77 или Gb4Cer [46]. После взаимодействия токсина с рецептором их комплекс подвергается эндоцитозу и ретроградному транспорту в аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум [47]. В эндоплазматическом ретикулуме субъединица А протеолитически расщепляется с образованием А1-фрагмента (27 кДа). Данный фрагмент перемещается в цитозоль и прерывает синтез белка, инактивируя рибосомы путем отщепления остатка аденина от 28S рибосомальной РНК [48]. Вызванный нарушением синтеза белка рибосомный стресс запускает множество сигнальных путей, которые могут инициировать провоспалительный ответ (цитокины и хемокины) и апоптоз [49–52].

В сыворотке больных ГУС обнаруживаются как Stx1, так и Stx2 [53, 54]. Stx циркулирует в плазме крови в виде комплекса с клетками либо в микровезикулах, высвобождаемых клетками крови. Возможными переносчиками Stx являются эритроциты, тромбоциты и моноциты, имеющие на своей поверхности рецептор Gb3 [55], а также нейтрофилы, которые не экспрессируют рецептор Gb3, но взаимодействуют с Stx через Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) [56]. Выдвигаются предположения, что микровезикулы, высвобождаемые клетками крови, являются переносчиками Stx в клетки клубочков почек [28, 57]. Stx может включаться в микровезикулы крови, генерируемые нейтрофилами, моноцитами, тромбоцитами и эритроцитами, перемещаться к клеткам-мишеням и поглощаться в результате эндоцитоза [57, 58]. Таким образом, Stx, взаимодействуя на первом этапе со своими рецепторами и проникая в клетки крови, впоследствии может покидать их в составе микровезикул и проникать в клетки, которые не несут на своей поверхности специфичных ему рецепторов [57, 58]. В дополнение к токсину Stx в состав содержимого микровезикул, высвобождаемых тромбоцитами и моноцитами, могут входить различные факторы, такие как активированные компоненты комплемента или тканевые факторы, и также переноситься в клетки-мишени [58].

Повреждение эндотелия клубочков было указано как одно из первичных событий в развитии тромботических микроангиопатических поражений при STEC-ГУС [52].

Под воздействием Stx в эндотелиальных клетках происходит активация ядерного фактора транскрипции-кВ (NF-кВ), провоспалительных цитокинов и хемокинов, молекул клеточной адгезии [44, 59–61]. При этом эндотелиальные клетки утрачивают тромборезистентный фенотип, демонстрируют повышенные адгезивные способности. Продемонстрирована способность Stx вызывать формирование тромбоцитарных тромбов на поверхности эндотелиальных клеток в условиях высокого сдвигового напряжения, аналогично тому, что наблюдается в микрососудистом русле [62]. При этом в качестве фактора, непосредственно участвующего в формировании тромбоцитарного тромба выступает фактор фон Виллебранда, который в условиях высокого напряжения сдвига претерпевает конформационные изменения. Было продемонстрировано, что Stx может непосредственно связываться с фактором фон Виллебранда на поверхности клеток, защищая его от расщепления металлопротеиназой ADAMTS13 [63]. Блокада адгезивных белков, включая Р-селектин, снижала тромбогенный эффект Stx [62].

Цитотоксическому воздействию Stx могут подвергаться и подоциты [64–67]. После связывания с рецепторами Gb3, Stx активирует митоген-активируемые протеинкиназы p38 и p42/44 (MAPK), а также факторы транскрипции NF-кВ и AP-1 в подоцитах человека, вызывает высвобождение цитокинов, таких как IL-1 и TNF- α . В свою очередь, цитокины посредством усиления экспрессии Gb3 повышали чувствительность клеток к токсину [66–68] и способствовали апоптозу [64].

Помимо прямой цитотоксической и провоспалительной активности Stx и других продуктов жизнедеятельности *E. coli* важную роль в патогенезе STEC-ГУС играет система комплемента [69–72].

Механизмы активации системы комплемента при STEC-ГУС

Уже первые попытки исследовать, каково участие комплемента в патогенезе STEC-ГУС, выявили снижение уровня C3 и повышение уровня продуктов его распада C3b, C3c и C3d в сыворотке крови у детей во время активной фазы заболевания [73–75]. В некоторых случаях у пациентов со STEC-ГУС снижался уровень C4 [76]. При этом у больных STEC-ГУС наблюдался рост уровня фактора Вb, что прямо говорит об активации именно альтернативного пути системы комплемента [77]. Последующие исследования показали, что рост уровня Вb в плазме больных сопровождается ростом уровня растворимого C5b-9, коррелирует с ним и тяжестью олигурии [78]. Также был выявлен рост уровня C3a в острой фазе

заболевания и возвращение показателей к норме после выздоровления [76]. Кроме активации системы комплемента отмечается отложение C3 и C5b-9 вместе с накоплением фибрина в клубочках почек детей с STEC-ГУС [79]. В совокупности эти данные позволили говорить о связи между активацией системы комплемента, тромбозом почечных микрососудов и повреждением гломерулярных подоцитов.

Stx-опосредованная активация системы комплемента при STEC-ГУС

Stx2 при добавлении к нормальной человеческой сыворотке активирует комплемент в жидкой фазе, что приводит к образованию растворимого C5b-9 [80]. Предполагается, что Stx способен напрямую взаимодействовать с белками комплемента и активировать альтернативный путь. В частности, была выявлена способность Stx2 связываться с короткими доменами (SCR) 6–8 и 18–20 фактора H, которые отвечают за распознавание поверхности клеток хозяина [80]. Связывание Stx2 с фактором H нарушало его кофакторную активность на поверхности клеток, что приводило к усилению активации комплемента и накоплению на поверхности клеток C3b, в то время как активность фактора H в жидкой фазе сохранялась неизменной [80]. Помимо связывания фактора H, Stx2 также выступает в качестве лиганда для двух других принадлежащих к семейству фактора H белков, FHR-1 и FHL-1, которые обнаруживают сходство аминокислотной последовательности и регуляторной функции с фактором H [81]. Кроме прямой регуляции системы комплемента Stx может опосредованно менять его активность. Так, показано, что Stx2 модулирует экспрессию CD59, мембраносвязанного регулятора комплемента, который ингибирует образование комплекса C5b-9. В эндотелиальных клетках, подвергшихся воздействию Stx2, наблюдалось снижение уровня мРНК CD59 и его поверхностной экспрессии [82].

Активация системы комплемента через лектиновый путь

Аномальная активация альтернативного пути при STEC-ГУС также может быть достигнута за счет активации факторов В и D с помощью MBL/фиколин-ассоциированных сериновых протеаз (MASP), что указывает на возможность опосредованной активации альтернативного пути системы комплемента [83]. Недавние данные свидетельствуют о том, что лектиновый путь играет роль в возникновении заболевания, поскольку ингибирование MBL2 у мышей со STEC-ГУС значительно ограничивает отложение C3d в почках и их повреждение [84]. Механизмы активации

лектинового пути до конца не ясны. Установлено, что бактерии *E. coli* штамма 0157:H7 несут на своей поверхности металлопротеазу StcE, специфически расщепляющую ингибитор C1-эстеразы (C1-INH) [85]. Антиген и активность StcE были обнаружены в фекалиях ребенка с инфекцией *E. coli* O157:H7 [85]. C1-ингибитор необратимо связывается и инактивирует как C1g и C1s протеазы классического пути, так и маннан-связывающие лектин-ассоциированные сериновые протеазы MASP-1 и MASP-2 лектинового пути активации комплемента [86].

Клеточные мишени комплемента при STEC-ГУС

Повреждение эндотелиальных клеток

Предположения о том, что альтернативный путь системы комплемента является ключевым медиатором тромбоза микрососудов, нашли свое подтверждение в целом ряде исследований на различных моделях животных и *in vitro*. Перфузия цельной кровью эндотелиальных клеток, которые были обработаны Stx1, продемонстрировала рост отложений C3 и большую площадь тромбообразования [87]. При этом добавление растворимого рецептора комплемента sCR1, ингибитора C3, полностью подавляло образование агрегатов тромбоцитов на поверхности эндотелиальных клеток, что говорит о функциональной связи между отложениями C3 на поверхности эндотелия и тромбозом [87]. Вызванное Stx1 отложение C3 на поверхности эндотелиальных клеток опосредовано активацией P-селектина. Данная молекула адгезии способна с высокой аффинностью связывать C3b и активировать альтернативный путь системы комплемента [87, 88]. Блокада P-селектина подавляла вызванную Stx активацию комплемента и тромбообразование на поверхности эндотелиальных клеток при их перфузии цельной кровью [87].

Повреждение подоцитов

Кроме эндотелиальных клеток активация системы комплемента запускает патологические процессы в гломерулярных подоцитах. Отложения C3 и C5b-9 были обнаружены в клубочках мышей, инфицированных STEC [79]. У мышей дикого типа с ГУС, вызванным введением Stx2/ЛПС, отложение C3 сопровождалось накоплением фибрин(огена), дисфункцией и потерей подоцитов [44, 87, 89]. Было установлено, что накопление фрагмента C3 в клубочках почек активирует важные регуляторы адгезии, миграции и межклеточного взаимодействия подоцитов, такие как интегрин-связанная киназа (ILK), а также транскрипционный фактор Snail, подавляющий экспрессию гена нефрина [89]. При этом у мышей с дефицитом фактора В после введения Stx2/ЛПС

наблюдалось полное восстановление гломерулярной архитектуры, что ясно указывает на то, что активация комплемента по альтернативному пути способствует дисфункции подоцитов [89].

Гемолиз при STEC-ГУС

Отложения C3 и C9 наблюдаются также на поверхности клеток крови и выделяемых ими микровезикул у пациентов с STEC-ГУС. Данный факт служит еще одним доказательством участия комплемента в патогенезе STEC-ГУС [76, 90]. Воздействие Stx2 на цельную кровь вызывает образование тромбоцитарно-моноцитарных и тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов с поверхностно-связанными C3 и C9 [76]. В свою очередь, отложение продуктов активации системы комплемента на тромбоцитах и моноцитах приводит к высвобождению микрочастиц, которые могут способствовать протромботическому состоянию при STEC-ГУС [91]. Воздействие Stx2 на эритроциты вызывает высвобождение гемоглобина и образование покрытых C3 и C5b-9 микровезикул [90]. Что интересно, гемолиз, вызванный Stx2, не проявлялся в отсутствие плазмы и при ее инактивации предварительным нагреванием, а также при использовании экулизумаба, антагониста P2-пуриновых рецепторов сурамина и EDTA. Высвобождение микровезикул эритроцитами в цельной крови в присутствии Stx2 не наблюдалось в отсутствие фактора В и подавлялось EDTA и антагонистами пуринергических рецепторов P2 [90]. Данные наблюдения прямо указывают на участие альтернативного пути комплемента в гемолитическом процессе, происходящем при STEC-ГУС [90].

Shigella dysenteriae

Кроме геморрагических штаммов кишечной палочки, причиной развития ГУС может стать инфекция *Sh. dysenteriae*. В сравнении с кишечной палочкой, данная инфекция существенно менее широко распространена на Земле и представлена преимущественно в развивающихся странах Африки и Азии. Во многом это связано с механизмами передачи инфекции. Единственным носителем *Sh. dysenteriae* является человек, а передача инфекции осуществляется через контаминированную пищу и предметы. В связи с этим частота ассоциированного с *Sh. dysenteriae* ГУС существенно ниже ГУС, ассоциированного с *E. coli* [92]. Так, в период с 1987 по 2012 год было задокументировано всего 488 случаев ассоциированного с шигеллезом ГУС. Однако средний показатель смертности при этом существенно выше, чем при STEC-ГУС, и может достигать 59% [93–99]. Именно ГУС является основной причиной смертности при эпидемиях дизентерии, вызванных инфекцией *Sh. dysenteriae* [92]. Развитие

ГУС при шигеллезе преимущественно связано с инфекцией *Sh. dysenteriae* серотипа SD1 [100]. Данный серотип в сравнении с другими видами *Shigella* и серотипами *Sh. dysenteriae* отличается повышенным уровнем секреции шига-токсина. Данный токсин идентичен токсину Stx1 геморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7, который, как уже говорилось ранее, вместе с Stx2 играет ключевую роль в развитии ГУС [101]. Кроме шига-токсина, *Sh. dysenteriae* серотипа SD1, так же как и *E. coli*, продуцирует ЛПС, который рассматривается в качестве потенциального медиатора повреждения сосудов, развития ДВС-синдрома и сепсиса. ЛПС был обнаружен в крови больных ГУС, ассоциированным с инфекцией *Sh. dysenteriae* серотипа SD1. При этом у больных с неотягощенной развитием ГУС диареей ЛПС в крови выявлялся редко [102]. Двукратное внутривенное введение ЛПС, продуцируемого *Sh. dysenteriae*, вызывало генерализованную реакцию Шварцмана и клиническую картину ГУС [103]. Данные факты позволяют предполагать, что в основе ГУС, вызванного инфекцией *Sh. dysenteriae*, и ГУС, вызванного инфекцией *E. coli* O157:H7, лежат общие механизмы патогенеза. Однако стоит учитывать, что инфекция *E. coli* O157:H7 может вызывать развитие ГУС у детей и взрослых, в то время как шигеллез провоцирует развитие ГУС исключительно у детей. Также, в отличие от кишечной палочки, *Sh. dysenteriae* серотипа SD1 энтероинвазивна. Вызываемая ей диарея сопровождается проникновением бактерии в общий кровоток.

Streptococcus pneumoniae и другие бактерии, продуцирующие нейраминидазу

Вторым по встречаемости инфекционным агентом после геморрагической кишечной палочки, способным вызывать гемолитико-уремический синдром, является *S. pneumoniae*, на долю которой приходится примерно 5% всех случаев ГУС у детей и 38–43% всех случаев ГУС, не связанных с инфекцией STEC. Ежегодная заболеваемость составляет примерно 6 случаев на 10 млн детей возрастом до 18 лет в год. Чаще всего вызываемый инфекцией *S. pneumoniae* ГУС развивается после пневмонии, осложненной эмпиемой или менингитом [104].

На сегодняшний день рассматривается несколько вероятных механизмов развития ГУС при пневмококковой инфекции. Наиболее распространенное мнение, согласно которому продуцируемая *S. pneumoniae* нейраминидаза, циркулируя в кровотоке, удаляет с поверхности эритроцитов, тромбоцитов и эндотелиальных клеток N-ацетилнейраминовую кислоту (Neu5Ac) от сиалогликопротеинов клеточных мембран, обнажая антиген Томсена–Фриденрайха (Т-антиген) [104]. Данный

дисахарид не выявляется на поверхности нормальных клеток и в случае экспонирования на цитоплазматической мембране распознается циркулирующими в крови иммуноглобулинами [105]. Антитела связывают Т-антиген на поверхности эритроцитов, тромбоцитов и эндотелиальных клеток, что приводит к агрегации эритроцитов, агрегации тромбоцитов в микроциркуляторном русле и развитию ТМА [106, 107]. Важно отметить, что определяющим моментом в активации агрегации тромбоцитов нейраминидазой является десИАлирование фактора VIII [108]. Данный механизм исключает роль мутаций в генах факторов системы комплемента как определяющего фактора риска развития ГУС, вызываемого пневмококковой инфекцией (SP-ГУС), хотя и отмечается, что десИАлирование может приводить к снижению резистентности клеток к активности факторов системы комплемента [104, 109, 110]. Помимо презентации Т-антигена на поверхности клеток десИАлирование может приводить к потере клетками участков связывания фактора Н. При этом может происходить неконтролируемая активация альтернативного пути системы комплемента. Было показано, что у больных SP-ГУС десИАлированию подвергается и сам фактор Н, что, с одной стороны, увеличивает его активность связывания С3b, а с другой — никак не сказывается на его способности диссоциировать С3b и С3bBb(P)-конвертазу и снижает его способность препятствовать агрегации эритроцитов [111]. Тем не менее десИАлирование эритроцитов и тромбоцитов не является специфичным для ГУС. Данный процесс наблюдается и у пациентов с инвазивной пневмококковой инфекцией, неотягощенной ГУС [107, 112].

ГУС, вызванный пневмококковой инфекцией, может развиваться в отсутствие антител к Т-антигену [113]. Только 60–90% пациентов с ГУС демонстрируют положительную реакцию Кумбса [114]. Нарушение регуляции альтернативного пути системы комплемента может быть вызвано прямым связыванием фактора Н бактериальными белками. Так, некоторые серотипы *S. pneumoniae* экспрессируют белки (PspC, CbpA, Hic), которые могут связывать фактор Н, меняя его активность и элиминируя его из плазмы крови [115, 116]. Генетические исследования продемонстрировали наличие у значительной части больных SP-ГУС мутаций, ранее ассоциировавшихся с аГУС [111].

Список бактерий, способных продуцировать нейраминидазу и вызывать ГУС, не ограничивается *S. pneumoniae*. На сегодняшний день описаны случаи развития ГУС на фоне бактериальной инфекции, вызванной β-гемолитическим стрептококком группы А (*S. pyogenes*) [117–119]. При этом наблюдались гипокомплементемия и отложения С3 на поверхности эндотелиальных клеток капилляров [118,

120]. Помимо нейраминидазы, в патогенезе ГУС могут быть задействованы продуцируемые *S. pyogenes* белки M1, Fba, NAPIr [121, 122]. Связывая фактор Н системы комплемента, белок Fba может нарушать его регуляторную активность. Ассоциированный с нефритом рецептор плазмينا NAPIr откладывается в клубочках и вызывает их повреждение посредством связывания плазмينا и поддержания его локальной активности [123, 124]. Кроме стрептококков вызывать ГУС могут и другие бактерии, продуцирующие нейраминидазу, такие как *Clostridium perfringens* [125–128].

Bordetella pertussis

Bordetella pertussis является возбудителем острого респираторного инфекционного заболевания, известного как коклюш. На сегодняшний день коклюш остается значимой причиной заболеваемости и смертности детей младше 2 лет. Инфекция передается воздушно-капельным путем и проявляется поражением слизистых оболочек верхних дыхательных путей. В особо тяжелых случаях инфекция может сопровождаться развитием таких осложнений, как судороги, апноэ, пневмония, энцефалопатия, и приводить к смерти [129]. Первый случай развития ГУС на фоне инфекции *B. pertussis* был описан в 2002 году [130]. У ребенка с нарушениями в структуре фактора Н через несколько недель после заражения развился ГУС с последующим летальным исходом. В дальнейшем было описано сразу несколько случаев развития рецидивирующего ГУС после инфицирования *B. pertussis* у больных, не имеющих дефектов в факторах системы комплемента [131–133]. Было установлено, что у больных с рецидивирующим ГУС в острой фазе может снижаться одновременно уровень С3 и С4 [133]. Это говорит об одновременной активации классического и альтернативного путей комплемента. Механизмы активации пока до конца не установлены. Известно, что бактерии *B. pertussis* экспрессируют ряд белков, позволяющих ей уклоняться от активности системы комплемента [134]. Белок-автотранспортер BvkA подавляет отложение С3 и С4 и формирование мембраноатакующего комплекса на поверхности бактерии. Механизм данного подавления неизвестен. Предполагается, что BvkA либо способствует деградации С4b, либо ингибирует активацию С4 [135]. Белок Vag8 был идентифицирован как фактор связывания С1-ингибитора на поверхности бактериальной клетки [136, 137]. Поверхностный белок, филаментозный гемоглютинин, в комплексе с одним или несколькими не установленными пока BvgAS-регулируемыми белками связывает регуляторный фактор системы комплемента С4BP [138–140]. С4BP представляет собой паукообразную молекулу массой 570 кДа,

состоящую из семи идентичных α -цепей и одной β -цепи, соединенных дисульфидными мостиками. Обе цепи состоят из белковых доменов контроля комплемента. С4ВР связывается с С4b, вызывая распад СР/LP С3-конвертазы С4b2b, и действует как кофактор для протеолитического фактора I плазмы в протеолитической деградации С4b [141]. Наконец, бактерии *B. pertussis* способны связывать на своей поверхности фактор Н системы комплемента и подобные ему белки FHR-1 и FHL-1. Было установлено, что связывание фактора Н происходит через его домены SCR20 и SCR5-7 [142, 143]. С одной стороны, связывание регуляторных белков позволяет бактерии уклоняться от активности системы комплемента. С другой стороны, этот процесс может нарушать баланс в регуляции системы комплемента, приводя к его избыточной активности.

Salmonella typhi

Вызванная *Salmonella typhi* инфекция крайне редко выступает в качестве причины развития ГУС, в связи с чем механизмы, лежащие в основе развития ГУС при брюшном тифе остаются невыясненными. Тем не менее предполагается, что в качестве ключевого фактора, запускающего цепь взаимодействий, приводящих к развитию ГУС, может выступать липополисахарид *S. typhi*. Специфичные к нему иммуноглобулины IgM и IgA выявляются в плазме больных брюшным тифом, отягощенном ГУС [144].

Иные бактериальные инфекции

В современной литературе появляется все больше данных о том, что некоторые бактерии, ранее не продуцировавшие Stx, могут приобретать данную способность. Так, разными группами исследователей были обнаружены штаммы *Sh. sonnei*, продуцирующие либо Stx-1, либо Stx-2a [145–148]. Известно, что гены Stx переносятся в геноме фагов λ или “Stx-конвертирующих бактериофагов”, которые могут встраивать ДНК в хромосомы бактерий-хозяев посредством транспозиции или рекомбинации [148]. *E. coli* и *Shigella* spp. являются близкими генетическими родственниками, что позволяет видам рода *Shigella* получать гены токсинов от *E. coli*. Это указывает на то, что ранее нетоксигенная *Sh. sonnei* может получить гены вирулентности при инвазии фагом, несущим гены токсина. Фаги, несущие ген Stx, были обнаружены в сточных водах и в кале здоровых людей [149, 150]. Было установлено, что данные фаги могут инфицировать и размножаться в культурах Stx-негативных штаммов *E. coli* и *Sh. sonnei* [149]. Фаги, несущие ген Stx, дольше, чем их бактериальные хозяева, сохраняют свою жизнеспособность и могут попадать в организм с загряз-

ненной пищей и водой [151]. Другой способ превращения бактерий, обычно не продуцирующих Stx (таких как *Sh. sonnei*), в продуценты Stx, предполагает коинфицирование с геморрагическими штаммами *E. coli* или *Sh. dysenteriae*. В результате высвобождаемые при лизисе *E. coli* или *Sh. dysenteriae* бактериофаги заражают бактерии, не несущие гены Stx [149, 152]. На сегодняшний день уже описан как минимум один случай развития ГУС на фоне инфекции *Sh. sonnei* [153].

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ГУС

Вирус гриппа

Грипп остается одной из наиболее частых инфекционных причин смерти в западном мире, обладает высокой генетической изменчивостью и развивающейся резистентностью к противовирусным препаратам [154]. Опасность для человека представляют вирусы гриппа А, В и С [155]. Описываются случаи развития гемолитико-уремического синдрома на фоне острой респираторной инфекции, вызванной вирусом гриппа А, в частности H1N1 [156–160]. Зафиксировано также несколько случаев ГУС, вызванных вирусом гриппа В [161–163]. Таких клинических случаев сравнительно мало, и на данном этапе механизмы, опосредующие появление ГУС при вирусе гриппа, остаются малоизученными. В экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* была продемонстрирована способность вируса H1N1 вызывать апоптоз эндотелиальных клеток, активацию тромбоцитов и последующее образование микротромбов [154, 164, 165]. В основе патогенности вируса гриппа А как индуктора ГУС может лежать наличие нейраминидазы (NA), закодированной в 6-м сегменте РНК и образующей тетрамер на внешней мембране вируса. NA обладает сиалидазной активностью, необходимой для выхода вируса из клетки. Участие нейраминидазы вируса гриппа А в патогенезе ГУС может отличаться от такового при инфекции *Streptococcus pneumoniae* в связи с тем, что в случае пневмококковой инфекции нейраминидаза находится в свободном состоянии и циркулирует в плазме крови, тогда как нейраминидаза вируса непосредственно связана с его липопротеиновой оболочкой. Было продемонстрировано, что эритроциты, предварительно подвергшиеся воздействию вирусных частиц, активируют альтернативный путь системы комплемента в сыворотке крови человека. При этом уровень активности альтернативного пути комплемента зависел от количества вирусных частиц, предварительному воздействию которых подвергались эритроциты, и от степени десиалирования мембран эритроцитов [166]. У больных гриппом А H1N1 отмечается активация системы компле-

мента, выраженная в росте уровня C5b-9 в плазме крови [167]. Также было продемонстрировано, что острое повреждение легких у мышей, инфицированных гриппом А H5N1, связано с чрезмерной активацией комплемента с отложением C3 и C5b-9 и повышенной экспрессией комплементарных рецепторов C3aR и C5aR [168]. Предполагается, что в основе патогенеза ГУС, вызываемого вирусом гриппа, может лежать активация молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток, как это было продемонстрировано в случае со STEC-ГУС, однако данное предположение требует проверки. Также высказывается гипотеза о триггерном действии вируса на чувствительный к ГУС гаплотип [169–171]. Так, у некоторых пациентов с тромботической микроангиопатией, связанной с гриппом А и В, были обнаружены мутации, потенциально связанные с дисрегуляцией системы комплемента (мутации C3 и MCP) [157, 161, 162, 172]. С другой стороны, описаны случаи, когда активация системы комплемента и развитие ТМА наблюдалось у инфицированных гриппом пациентов, не несущих мутаций [173]. Однако данный факт не позволяет исключить гипотезу о прямой роли вируса H1N1 в детерминации транзиторной активации комплемента и развитии ГУС.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)

Связь между ВИЧ-инфекцией и возникновением ГУС была задокументирована уже в 1984 году [174]. Однако роль ВИЧ в описанном случае была неоднозначна. Больной на момент развития ГУС проходил лечение от саркомы Капоши и умер от сепсиса, вызванного инфекцией *Staphylococcus aureus*. В дальнейшем были описаны случаи развития ГУС на фоне ВИЧ-инфекции, не отягощенной иными инфекционными и опухолевыми заболеваниями. С одной стороны, обследование больных ГУС на фоне ВИЧ-инфекции показало, что развитие синдрома не обязательно обусловлено наличием ассоциированных с ГУС мутаций. С другой стороны, полученные данные указывают на то, что в патогенезе ГУС задействована система комплемента [175, 176]. Так, у женщины с установленной ВИЧ-инфекцией ГУС сопровождался снижением уровня фактора C3 и фактора В системы комплемента. Уровень C4 оставался в пределах нормы, что указывает на активацию альтернативного пути системы комплемента. Биопсия почки показала колокализацию повышенного сывороточного МАК, отложений C5b-9 и артериоларных микроангиопатических поражений в почках. При этом использование ингибитора альтернативного пути системы комплемента экулизумаба оказалось эффективным и привело к ремиссии. Стоит отметить, что у исследователей не было возможности проверить паци-

ентку на наличие мутаций, связанных с белками-регуляторами комплемента [175]. Генетическое обследование другого больного с ВИЧ-ассоциированным ГУС не выявило наличие ни одной мутации, связанной с нарушениями активности системы комплемента. Тест на аутоантитела к фактору Н был отрицательным. Уровень ADAMTS13 в пределах нормальных показателей (72%). Тем не менее данному пациенту была назначена терапия блокатором фактора C5 (экулизумабом), которая дала положительный результат. Логично предположить, что в данном случае ГУС был спровоцирован ВИЧ посредством активации альтернативного пути комплемента [176]. Однако исследования группы бессимптомных пациентов с ВИЧ-инфекцией и пациентов с сепсисом и малярией на фоне ВИЧ-инфекции показали, что ВИЧ может активировать систему комплемента через классический путь [177]. Противоречивость данных, полученных разными группами исследователей, может быть обусловлена наличием у пациентов с ВИЧ-инфекцией сопутствующих заболеваний и ассоциированных с аГУС мутаций, а также тем, на какой стадии развития вызванного ВИЧ-инфекцией иммунодефицита находился пациент на момент обследования [178]. Тем не менее можно выделить сразу несколько возможных механизмов, запуск которых может приводить к активации системы комплемента и нарушениям в ее работе, приводящим к развитию ТМА. Многочисленные данные указывают на то, что при инфицировании ВИЧ происходит опосредованная антителами активация классического пути, которая приводит к опосредованному системой комплемента лизису вирусных частиц и инфицированных вирусом клеток [179–181]. Было установлено, что лизис развивается быстро и эффективен на ранних стадиях инфекции [178]. Уровни антител повышаются в ответ на постепенное увеличение вирусной нагрузки и, по-видимому, сохраняются на высоком уровне на протяжении всего заболевания [182]. Как следствие, сохраняется повышенная активность классического пути комплемента. Активация системы комплемента вирусом ВИЧ-1 также может быть опосредована лектиновым путем [183]. Была продемонстрирована способность комплекса gp120/gp41 Env связываться с маннан-связывающим лектином (MBL) и активировать систему комплемента [184–186]. Кроме того, эксперименты *in vitro* показали, что MBL может влиять на выведение ВИЧ-1 из крови путем связывания вируса с последующим поглощением тканевыми макрофагами и усилением опосредованной антителами нейтрализации [187, 188]. Тем не менее, роль лектинового пути системы комплемента в развитии иммунного ответа на инфекцию ВИЧ требует дальнейших исследований. Активация системы

комплемента при ВИЧ-инфекции сопровождается опсонизацией вирусных частиц факторами системы комплемента, которые, с одной стороны, защищают их от опосредованного комплементом лизиса, с другой — усиливают их вирулентность. Отложения продуктов расщепления C3 и анафилатоксина C5a на вирусных частицах ВИЧ-1 облегчают взаимодействие ВИЧ-1 с такими клетками, как моноциты/макрофаги и дендритные клетки, экспрессирующие рецепторы комплемента CR3 и CR4 [189, 190]. Опсонизация интактных вирусных частиц фактором C1q приводит к усилению инфекции ВИЧ-1 в клеточных культурах, которая опосредована рецепторами CR2 [191]. Было показано, что CR1 и CR2 вносят свой вклад независимым и комплементарным образом в проникновение опсонизированного вируса в Т-клетки, экспрессирующие рецептор комплемента [192]. Также было продемонстрировано, что продукты активации системы комплемента C5a и C5a(desArg), но не C3a или C3a(desArg) могут повышать восприимчивость моноцитов и макрофагов к ВИЧ-инфекции посредством стимуляции секреции TNF-альфа и IL-6 этими клетками [193]. В дополнение к активации комплемента, усиливающей инфекционность ВИЧ-1, ВИЧ-1 активно стимулирует синтез фактора комплемента C3 в астроцитах и нейронах [194]. Данный эффект может быть опосредован вирусными белками gp41 и Nef [194]. Отложения C3 и его высокая активность могут играть ключевую роль в патогенезе неврологических расстройств, наблюдаемых у инфицированных ВИЧ-1. Кроме того, связывание антител против ВИЧ с опсонизированными факторами системы комплемента вирионами облегчает взаимодействие ВИЧ-1 с эритроцитами. ВИЧ-1 связывается с эритроцитами зависимым от системы комплемента комплемента и рецептора CR1 образом. Эти связанные с ВИЧ-1 эритроциты могут не только доставлять иммунокомплексный ВИЧ-1 в органы, восприимчивые к инфекции, но и свободный ВИЧ [195]. При этом защита ВИЧ-1 от лизиса обусловлена, по крайней мере частично, присутствием регуляторов активации комплемента CD59 и CD55 в вирусной оболочке, которые вирус рекрутирует из клетки-хозяина в процессе почкования [196–198]. Кроме того, дополнительную устойчивость к атакам системы комплемента обеспечивает связывание фактора H с ВИЧ-1 [196]. Таким образом, с одной стороны, ВИЧ активирует систему комплемента и стимулирует синтез факторов системы комплемента и провоспалительных цитокинов. С другой стороны, он демонстрирует способность уклоняться от системы комплемента, используя ее для усиления своей вирулентности. В совокупности данные процессы могут приводить к нарушениям в работе системы комплемента и развитию опосредованных

комплементом ТМА. Тем не менее данные предположения требуют тщательной проверки.

Энтеровирусные инфекции

Участие инвазивных энтеровирусных инфекций в развитии ГУС остается на сегодняшний день под вопросом. Первый случай ГУС, ассоциированного с энтеровирусной инфекцией, был описан еще в 1965 году. У больного с ГУС был обнаружен вирус Коксаки группы А типа 4 [199]. Впоследствии было зарегистрировано более 60 пациентов с ГУС, у которых была выявлена энтеровирусная инфекция, в том числе вирус Коксаки и вирус ЕСНО [200–206].

Проблема в том, что приводимые в описанных случаях диагнозы энтеровирусной инфекции основывались на серологии, получении вирусных культур из горла, прямой кишки и кала, а также выявлении вирусных частиц в образцах кала с помощью электронной микроскопии. Данные подходы подтверждают само наличие инфекции, но не позволяют непосредственно связать наличие энтеровирусной инфекции с развитием ГУС. Также необходимо отметить, что пациенты не всегда обследовались на наличие геморрагической бактериальной инфекции. Сравнительное исследование на наличие энтеровирусных инфекций в двух группах больных с ГУС, STEC-положительных (58 человек) и STEC-отрицательных (31 человек), не выявило между ними статистически значимых отличий [201]. Авторы данной работы предложили исключить энтеровирусы из списка инфекционных возбудителей, которые могут провоцировать ГУС. Однако рядом исследователей подобная позиция ставится под вопрос. Описано два случая, когда у больных ГУС энтеровирусная инфекция выявлялась непосредственно в почках [204, 205]. В одном случае вирусная культура не дала положительного результата, однако из почечных тканей была выделена энтеровирусная РНК. При этом не было выявлено никаких отклонений в серологических показателях факторов системы комплемента, активность ADAMTS13 была в норме, была исключена пневмококковая инфекция, инфекция *E. coli* серотипа O157:H7, шигеллез или сальмонеллез. Однако клинические признаки и биопсия почки полностью соответствовали ГУС [207].

Как и в случае с некоторыми другими инфекциями, механизмы патогенеза ГУС, вызываемого энтеровирусными инфекциями, остаются до конца не ясны. Большинство исследователей склоняется к тому, что они могут выступать в качестве триггера у людей с генетической предрасположенностью к аГУС. Было показано, что многие серотипы эховируса (EV) и вируса Коксаки В (CBV) связывают человеческий фактор ускорения рас-

пада (DAF) и используют его в качестве рецептора [208]. Фактор ускорения распада DAF представляет из себя гликозилфосфатидилинозитол (GPI), заякоренный мембранный белок, который ингибирует как классический, так и альтернативный пути активации комплемента, ускоряя диссоциацию уже сформированных C3-конвертаз и предотвращая образование новых [209–212]. Связь вирусных частиц с DAF может быть опосредована C3b, а ее формирование может приводить к активации альтернативного пути системы комплемента, как это было продемонстрировано для вируса Коксаки В3 [213]. Еще один из возможных путей – повреждение эндотелиальных клеток непосредственно вирусом или в результате вызванного им цитокинового шторма. На примере вируса Коксаки В было показано, что вирусная инфекция может вызывать повышенную экспрессию молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток и опосредованное ими развитие ТМА [214].

SARS-CoV-2

Коронавирус SARS-CoV-2 вызывает острую, преимущественно респираторную инфекцию, которая в особо тяжелых случаях сопровождается развитием тромботической микроангиопатии и вызванной ею органной недостаточностью. Одной из форм тромботической микроангиопатии, которая наблюдается у больных COVID-19, является ГУС. Механизмы развития ГУС при коронавирусной инфекции остаются до конца не выясненными. Полученные данные указывают на то, что инфекция SARS-CoV-2 может провоцировать развитие ГУС самостоятельно, а также потенциально является фактором риска развития осложнений при ГУС, вызванном инфекцией *E. coli* [215, 216]. Генетическое обследование больных COVID-19, отягощенной ГУС, показало, что не все они являются носителями ассоциированных с аГУС мутаций [217]. С одной стороны, это говорит о том, что вирусная инфекция SARS-CoV-2 может выступать в качестве триггера для аГУС. С другой стороны, возможно, что вирус SARS-CoV-2 способен самостоятельно вызывать ГУС вне зависимости от наличия генетических отклонений. Имеются данные о том, что инфекция вирусом SARS-CoV-2 вызывает опосредованное комплементом воспаление и тромботическую микроангиопатию [218]. Высказываются предположения, что гликопротеин S коронавируса SARS-CoV-2 может связываться с маннозосвязывающим лектином (MBL) и активировать таким образом MBL-ассоциированную сериновую протеазу MASP2 [219]. В свою очередь, активация MASP2 является первым этапом лектинового пути активации комплемента и частью петли положительной обратной связи, ведущей к устойчивой активации аль-

тернативного пути, воспалению и запуску коагуляционного каскада [220, 221].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Список возбудителей инфекционных заболеваний, способных вызывать развитие тромботических микроангиопатий, включая ГУС, постепенно расширяется. При этом они демонстрируют способность самостоятельно вызывать ГУС, как геморрагические штаммы *E. coli*, либо могут выступать в качестве триггера, запускающего развитие аГУС. Механизмы патогенеза ГУС при инфекционных заболеваниях крайне сложны и в каждом случае требуют изучения. Они могут различаться способом активации, задействованными в патогенезе системами инфицированного организма, вовлеченностью в процесс различных клеток, тканей и органов. Развитие ГУС может быть вызвано как поверхностными антигенами возбудителя, так и продуцируемыми продуктами: ферментами, токсинами. В патогенезе ГУС кроме эндотелиальных клеток, тромбоцитов и эритроцитов могут быть задействованы другие клеточные элементы крови и специализированные клетки органов и тканей (альвеолоциты легких, подоциты почек и т.д.). Тем не менее приведенные нами литературные данные дают основание для рассмотрения системы комплемента в качестве общего звена в механизмах развития ГУС при разных инфекционных заболеваниях. В частности, особого внимания заслуживает альтернативный путь активации комплемента. Необходимо также учесть, что инфекционные заболевания не всегда протекают с развитием ГУС в качестве осложнения. По всей видимости, для развития ГУС требуется сочетание до конца не установленных на сегодняшний день факторов. Одним из таких факторов, вероятно, являются функционально значимые мутации в генах факторов системы комплемента. Представленные данные говорят о том, что список диагностических процедур при аГУС должен быть расширен и включать в себя определение более широкого спектра инфекционных заболеваний, чем принято сейчас. В свою очередь, лечение больных аГУС может требовать комплексного подхода, включающего подавление активности системы комплемента и лечение инфекционного заболевания, вызвавшего дисрегуляцию данной системы. Дальнейшие исследования в данном направлении позволили бы ответить на вопрос, может ли система комплемента выступать в качестве универсальной мишени для фармакологической терапии при лечении инфекционных форм ГУС, установить конкретные мишени для разработки фармакологических препаратов, усовершенствовать протоколы диагностики и лечения.

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00409, <https://rscf.ru/project/22-15-00409/>.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aigner C., Schmidt A., Gaggl M., Sunder-Plassmann G. 2019. An updated classification of thrombotic microangiopathies and treatment of complement gene variant-mediated thrombotic microangiopathy. *Clin. Kidney J.* **12**, 333–337. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfz040>
- Brocklebank V., Wood K.M., Kavanagh D. 2018. Thrombotic microangiopathy and the kidney. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 300–317. <https://doi.org/10.2215/CJN.00620117>
- Fakhouri F., Zuber J., Fremeaux-Bacchi V., Loirat C. 2017. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* **390**, 681–696. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30062-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30062-4)
- Loirat C., Fakhouri F., Ariceta G., Besbas N., Bitzan M., Bjerre A., Coppo R., Emma F., Johnson S., Karpman D., Landau D., Langman C.B., Lapeyraque A.L., Licht C., Nester C., Pecoraro C., Riedl M., van de Kar N.C., Van de Walle J., Vivarelli M., Fremeaux-Bacchi V., International H.U.S. 2016. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatr. Nephrol.* **31**, 15–39. <https://doi.org/10.1007/s00467-015-3076-8>
- Fakhouri F., Fila M., Hummel A., Ribes D., Sellier-Leclerc A.L., Ville S., Pouteil-Noble C., Coindre J.P., Le Quintrec M., Rondeau E., Boyer O., Provot F., Djeddi D., Hanf W., Delmas Y., Louillet F., Lahoche A., Favre G., Chatelet V., Launay E.A., Presne C., Zaloszczyk A., Caillard S., Bally S., Raimbourg Q., Tricot L., Mousson C., Le Thuaut A., Loirat C., Fremeaux-Bacchi V. 2021. Eculizumab discontinuation in children and adults with atypical hemolytic-uremic syndrome: A prospective multicenter study. *Blood.* **137**, 2438–2449. <https://doi.org/10.1182/blood.2020009280>
- Warwicker P., Goodship T.H., Donne R.L., Pirson Y., Nicholls A., Ward R.M., Turnpenny P., Goodship J.A. 1998. Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* **53**, 836–844. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.1998.00824.x>
- Zipfel P.F., Skerka C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 729–740. <https://doi.org/10.1038/nri2620>
- Cserhalmi M., Papp A., Brandus B., Uzonyi B., Jozsi M. 2019. Regulation of regulators: Role of the complement factor H-related proteins. *Semin. Immunol.* **45**, 101341. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101341>
- Wurzner R., Joysey V.C., Lachmann P.J. 1994. Complement component C7. Assessment of in vivo synthesis after liver transplantation reveals that hepatocytes do not synthesize the majority of human C7. *J. Immunol.* **152**, 4624–4629.
- Carroll M.C. 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 545–568. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.545>
- Arbore G., Kemper C., Kolev M. 2017. Intracellular complement – the complosome – in immune cell regulation. *Mol. Immunol.* **89**, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.012>
- Bhakdi S., Tranum-Jensen J. 1986. C5b-9 assembly: average binding of one C9 molecule to C5b-8 without poly-C9 formation generates a stable transmembrane pore. *J. Immunol.* **136**, 2999–3005.
- Podack E.R., Tschoop J., Muller-Eberhard H.J. 1982. Molecular organization of C9 within the membrane attack complex of complement. Induction of circular C9 polymerization by the C5b-8 assembly. *J. Exp. Med.* **156**, 268–282. <https://doi.org/10.1084/jem.156.1.268>
- Ward P.A., Newman L.J. 1969. A neutrophil chemotactic factor from human C5. *J. Immunol.* **102**, 93–99.
- Ogden C.A., Elkon K.B. 2006. Role of complement and other innate immune mechanisms in the removal of apoptotic cells. *Curr. Dir. Autoimmun.* **9**, 120–142. <https://doi.org/10.1159/000090776>
- Anliker-Ort M., Dingemans J., van den Anker J., Kaufmann P. 2020. Treatment of rare inflammatory kidney diseases: Drugs targeting the terminal complement pathway. *Front. Immunol.* **11**, 599417. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599417>
- Dempsey P.W., Allison M.E., Akkaraju S., Goodnow C.C., Fearon D.T. 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: Bridging innate and acquired immunity. *Science.* **271**, 348–350. <https://doi.org/10.1126/science.271.5247.348>
- Chen J.Y., Cortes C., Ferreira V.P. 2018. Properdin: A multifaceted molecule involved in inflammation and diseases. *Mol. Immunol.* **102**, 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.018>
- Mukherjee P., Thomas S., Pasinetti G.M. 2008. Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through regulation of glutamate receptor subunit 2 *in vitro* and *in vivo*. *J. Neuroinflammation.* **5**, 5. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-5>
- Ling M., Murali M. 2019. Analysis of the complement system in the clinical immunology laboratory. *Clin. Lab. Med.* **39**, 579–590. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.07.006>
- Garred P., Genster N., Pilely K., Bayarri-Olmos R., Rosbjerg A., Ma Y.J., Skjoedt M.O. 2016. A journey

- through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol. Rev.* **274**, 74–97.
<https://doi.org/10.1111/imr.12468>
22. Pouw R.B., Ricklin D. 2021. Tipping the balance: Intricate roles of the complement system in disease and therapy. *Semin. Immunopathol.* **43**, 757–771.
<https://doi.org/10.1007/s00281-021-00892-7>
23. Bossi F., Fischetti F., Pellis V., Bulla R., Ferrero E., Mollnes T.E., Regoli D., Tedesco F. 2004. Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. *J. Immunol.* **173**, 6921–6927.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6921>
24. Chen Y., Yang C., Jin N., Xie Z., Tang Y., Fei L., Jia Z., Wu Y. 2007. Terminal complement complex C5b-9-treated human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization. *Eur. J. Immunol.* **37**, 167–176.
<https://doi.org/10.1002/eji.200636285>
25. Jozsi M., Barlow P.N., Meri S. 2021. Editorial: Function and dysfunction of complement factor H. *Front. Immunol.* **12**, 831044.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.831044>
26. Majowicz S.E., Scallan E., Jones-Bitton A., Sargeant J.M., Stapleton J., Angulo F.J., Yeung D.H., Kirk M.D. 2014. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog. Dis.* **11**, 447–455.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1704>
27. Rivas M., Chinen I., Miliwebsky E., Masana M. 2014. Risk factors for shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated human diseases. *Microbiol. Spectr.* **2**.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0002-2013>
28. Karpman D., Loos S., Tati R., Arvidsson I. 2017. Haemolytic uraemic syndrome. *J Intern. Med.* **281**, 123–148.
<https://doi.org/10.1111/joim.12546>
29. Bowen E.E., Coward R.J. 2018. Advances in our understanding of the pathogenesis of hemolytic uremic syndromes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **314**, F454–F461.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00376.2017>
30. Garg A.X., Suri R.S., Barrowman N., Rehman F., Matsell D., Rosas-Arellano M.P., Salvadori M., Haynes R.B., Clark W.F. 2003. Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *JAMA.* **290**, 1360–1370.
<https://doi.org/10.1001/jama.290.10.1360>
31. Rosales A., Hofer J., Zimmerhackl L.B., Jungraithmayr T.C., Riedl M., Giner T., Strasak A., Orth-Holler D., Wurzner R., Karch H., German-Austrian HUS Study Group. 2012. Need for long-term follow-up in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome due to late-emerging sequelae. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 1413–1421.
<https://doi.org/10.1093/cid/cis196>
32. Frankel G., Phillips A.D. 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: Getting off the pedestal. *Cell Microbiol.* **10**, 549–556.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01103.x>
33. Orth D., Ehrlenbach S., Brockmeyer J., Khan A.B., Huber G., Karch H., Sarg B., Lindner H., Wurzner R. 2010. EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. *Infect. Immun.* **78**, 4294–4301.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00488-10>
34. Djafari S., Ebel F., Deibel C., Kramer S., Hudel M., Chakraborty T. 1997. Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **25**, 771–784.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5141874.x>
35. Tarr P.I., Gordon C.A., Chandler W.L. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* **365**, 1073–1086.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71144-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2)
36. Bauwens A., Betz J., Meisen I., Kemper B., Karch H., Muthing J. 2013. Facing glycosphingolipid-Shiga toxin interaction: Dire straits for endothelial cells of the human vasculature. *Cell Mol. Life Sci.* **70**, 425–457.
<https://doi.org/10.1007/s00018-012-1060-z>
37. Rutjes N.W., Binnington B.A., Smith C.R., Maloney M.D., Lingwood C.A. 2002. Differential tissue targeting and pathogenesis of verotoxins 1 and 2 in the mouse animal model. *Kidney Int.* **62**, 832–845.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00502.x>
38. Scheutz F., Teel L.D., Beutin L., Pierard D., Buvens G., Karch H., Mellmann A., Caprioli A., Tozzoli R., Morabito S., Strockbine N.A., Melton-Celsa A.R., Sanchez M., Persson S., O'Brien A.D. 2012. Multi-center evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2951–2963.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>
39. Gallegos K.M., Conrady D.G., Karve S.S., Gunasekera T.S., Herr A.B., Weiss A.A. 2012. Shiga toxin binding to glycolipids and glycans. *PLoS One.* **7**, e30368.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030368>
40. Clayton F., Pysher T.J., Lou R., Kohan D.E., Denkers N.D., Tesh V.L., Taylor F.B., Jr., Siegler R.L. 2005. Lipopolysaccharide upregulates renal shiga toxin receptors in a primate model of hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Nephrol.* **25**, 536–540.
<https://doi.org/10.1159/000088523>
41. Louise C.B., Obrig T.G. 1992. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* **60**, 1536–1543.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.4.1536-1543.1992>
42. Ikeda M., Ito S., Honda M. 2004. Hemolytic uremic syndrome induced by lipopolysaccharide and Shiga-like toxin. *Pediatr. Nephrol.* **19**, 485–489.
<https://doi.org/10.1007/s00467-003-1395-7>

43. Keepers T.R., Psotka M.A., Gross L.K., Obrig T.G. 2006. A murine model of HUS: Shiga toxin with lipopolysaccharide mimics the renal damage and physiologic response of human disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 3404–3414.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2006050419>
44. Zanchi C., Zoja C., Morigi M., Valsecchi F., Liu X.Y., Rottoli D., Locatelli M., Buelli S., Pezzotta A., Mapelli P., Geelen J., Remuzzi G., Hawiger J. 2008. Fractalkine and CX3CR1 mediate leukocyte capture by endothelium in response to Shiga toxin. *J. Immunol.* **181**, 1460–1469.
45. O'Brien A.D., Tesh V.L., Donohue-Rolfe A., Jackson M.P., Olsnes S., Sandvig K., Lindberg A.A., Keusch G.T. 1992. Shiga toxin: Biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **180**, 65–94.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-77238-2_4
46. Lingwood C.A. 1996. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol.* **4**, 147–153.
[https://doi.org/10.1016/0966-842x\(96\)10017-2](https://doi.org/10.1016/0966-842x(96)10017-2)
47. Lingwood C.A. 2003. Shiga toxin receptor glycolipid binding. Pathology and utility. *Methods Mol. Med.* **73**, 165–86.
48. Endo Y., Tsurugi K., Yutsudo T., Takeda Y., Ogasawara T., Igarashi K. 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* **171**, 45–50.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13756.x>
49. Lee M.S., Koo S., Jeong D.G., Tesh V.L. 2016. Shiga toxins as multi-functional proteins: Induction of host cellular stress responses, role in pathogenesis and therapeutic applications. *Toxins (Basel)*. **8**.
<https://doi.org/10.3390/toxins8030077>
50. Petruzzello-Pellegrini T.N., Moslemi-Naeini M., Marsden P.A. 2013. New insights into Shiga toxin-mediated endothelial dysfunction in hemolytic uremic syndrome. *Virulence*. **4**, 556–563.
<https://doi.org/10.4161/viru.26143>
51. Tesh V.L. 2012. Activation of cell stress response pathways by Shiga toxins. *Cell. Microbiol.* **14**, 1–9.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01684.x>
52. Zoja C., Buelli S., Morigi M. 2010. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr. Nephrol.* **25**, 2231–2240.
<https://doi.org/10.1007/s00467-010-1522-1>
53. Brigotti M., Tazzari P.L., Ravanelli E., Carnicelli D., Rocchi L., Arfilli V., Scavia G., Minelli F., Ricci F., Pagliaro P., Ferretti A.V., Pecoraro C., Paglialonga F., Edefonti A., Procaccino M.A., Tozzi A.E., Caprioli A. 2011. Clinical relevance of shiga toxin concentrations in the blood of patients with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**, 486–490.
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182074d22>
54. He X., Ardissino G., Patfield S., Cheng L.W., Silva C.J., Brigotti M. 2018. An improved method for the sensitive detection of Shiga toxin 2 in human serum. *Toxins (Basel)*. **10**.
<https://doi.org/10.3390/toxins10020059>
55. Obrig T.G., Karpman D. 2012. Shiga toxin pathogenesis: Kidney complications and renal failure. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **357**, 105–136.
https://doi.org/10.1007/82_2011_172
56. Brigotti M., Carnicelli D., Arfilli V., Tamassia N., Borsetti F., Fabbri E., Tazzari P.L., Ricci F., Pagliaro P., Spisni E., Cassatella M.A. 2013. Identification of TLR4 as the receptor that recognizes Shiga toxins in human neutrophils. *J. Immunol.* **191**, 4748–4758.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300122>
57. Stahl A.L., Arvidsson I., Johansson K.E., Chromek M., Rebetz J., Loos S., Kristofferson A.C., Bekassy Z.D., Morgelin M., Karpman D. 2015. A novel mechanism of bacterial toxin transfer within host blood cell-derived microvesicles. *PLoS Pathog.* **11**, e1004619.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004619>
58. Villysson A., Tontanahal A., Karpman D. 2017. Microvesicle involvement in Shiga toxin-associated infection. *Toxins (Basel)*. **9**.
<https://doi.org/10.3390/toxins9110376>
59. Matussek A., Lauber J., Bergau A., Hansen W., Rohde M., Dittmar K.E., Gunzer M., Mengel M., Gatzlaff P., Hartmann M., Buer J., Gunzer F. 2003. Molecular and functional analysis of Shiga toxin-induced response patterns in human vascular endothelial cells. *Blood*. **102**, 1323–1332.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3301>
60. Morigi M., Micheletti G., Figliuzzi M., Imberti B., Karmali M.A., Remuzzi A., Remuzzi G., Zoja C. 1995. Verotoxin-1 promotes leukocyte adhesion to cultured endothelial cells under physiologic flow conditions. *Blood*. **86**, 4553–4558.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3301>
61. Zoja C., Angioletti S., Donadelli R., Zanchi C., Tomasoni S., Binda E., Imberti B., de Loo M., Monnens L., Remuzzi G., Morigi M. 2002. Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-kappaB dependent up-regulation of IL-8 and MCP-1. *Kidney Int.* **62**, 846–856.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00503.x>
62. Morigi M., Galbusera M., Binda E., Imberti B., Gastoldi S., Remuzzi A., Zoja C., Remuzzi G. 2001. Verotoxin-1-induced up-regulation of adhesive molecules renders microvascular endothelial cells thrombogenic at high shear stress. *Blood*. **98**, 1828–1835.
63. Lo N.C., Turner N.A., Cruz M.A., Moake J. 2013. Interaction of Shiga toxin with the A-domains and multimers of von Willebrand Factor. *J. Biol. Chem.* **288**, 33118–33123.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487413>
64. Dettmar A.K., Binder E., Greiner F.R., Liebau M.C., Kurschat C.E., Jungraithmayr T.C., Saleem M.A., Schmitt C.P., Feifel E., Orth-Holler D., Kemper M.J., Pepys M., Wurzner R., Oh J. 2014. Protection of human podocytes from shiga toxin 2-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis by human serum amyloid P component. *Infect. Immun.* **82**, 1872–1879.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01591-14>

65. Ergonul Z., Clayton F., Fogo A.B., Kohan D.E. 2003. Shigatoxin-1 binding and receptor expression in human kidneys do not change with age. *Pediatr. Nephrol.* **18**, 246–253.
<https://doi.org/10.1007/s00467-002-1025-9>
66. Hughes A.K., Stricklett P.K., Schmid D., Kohan D.E. 2000. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human glomerular epithelial cells. *Kidney Int.* **57**, 2350–2359.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00095.x>
67. Morigi M., Buelli S., Zanchi C., Longaretti L., Macconi D., Benigni A., Moioli D., Remuzzi G., Zoja C. 2006. Shigatoxin-induced endothelin-1 expression in cultured podocytes autocrinally mediates actin remodeling. *Am. J. Pathol.* **169**, 1965–1975.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051331>
68. Hughes A.K., Stricklett P.K., Kohan D.E. 2001. Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human glomerular epithelial cells. *Nephron.* **88**, 14–23.
<https://doi.org/10.1159/000045953>
69. Keir L.S., Saleem M.A. 2014. Current evidence for the role of complement in the pathogenesis of Shiga toxin haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **29**, 1895–1902.
<https://doi.org/10.1007/s00467-013-2561-1>
70. Mele C., Remuzzi G., Noris M. 2014. Hemolytic uremic syndrome. *Semin. Immunopathol.* **36**, 399–420.
<https://doi.org/10.1007/s00281-014-0416-x>
71. Orth-Holler D., Wurzner R. 2014. Role of complement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Semin. Thromb. Hemost.* **40**, 503–507.
<https://doi.org/10.1055/s-0034-1375295>
72. Zoja C., Buelli S., Morigi M. 2019. Shiga toxin triggers endothelial and podocyte injury: The role of complement activation. *Pediatr. Nephrol.* **34**, 379–388.
<https://doi.org/10.1007/s00467-017-3850-x>
73. Koster F.T., Boonpucknavig V., Sujaho S., Gilman R.H., Rahaman M.M. 1984. Renal histopathology in the hemolytic-uremic syndrome following shigellosis. *Clin. Nephrol.* **21**, 126–133.
74. Monnens L., Molenaar J., Lambert P.H., Proesmans W., van Munster P. 1980. The complement system in hemolytic-uremic syndrome in childhood. *Clin. Nephrol.* **13**, 168–171.
75. Robson W.L., Leung A.K., Fick G.H., McKenna A.I. 1992. Hypocomplementemia and leukocytosis in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Nephron.* **62**, 296–299.
<https://doi.org/10.1159/000187063>
76. Stahl A.L., Sartz L., Karpman D. 2011. Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood.* **117**, 5503–5513.
<https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-309161>
77. Thurman J.M., Marians R., Emlen W., Wood S., Smith C., Akana H., Holers V.M., Lesser M., Kline M., Hoffman C., Christen E., Trachtman H. 2009. Alternative pathway of complement in children with diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**, 1920–1924.
<https://doi.org/10.2215/CJN.02730409>
78. Ferraris J.R., Ferraris V., Acquier A.B., Sorroche P.B., Saez M.S., Ginaca A., Mendez C.F. 2015. Activation of the alternative pathway of complement during the acute phase of typical haemolytic uraemic syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **181**, 118–125.
<https://doi.org/10.1111/cei.12601>
79. Arvidsson I., Rebetz J., Loos S., Herthelius M., Kristoffersson A.C., Englund E., Chromek M., Karpman D. 2016. Early terminal complement blockade and C6 deficiency are protective in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected mice. *J. Immunol.* **197**, 1276–1286.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502377>
80. Orth D., Khan A.B., Naim A., Grif K., Brockmeyer J., Karch H., Joannidis M., Clark S.J., Day A.J., Fidanzi S., Stoiber H., Dierich M.P., Zimmerhackl L.B., Wurzner R. 2009. Shiga toxin activates complement and binds factor H: Evidence for an active role of complement in hemolytic uremic syndrome. *J. Immunol.* **182**, 6394–6400.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900151>
81. Poolpol K., Orth-Holler D., Speth C., Zipfel P.F., Skerka C., de Cordoba S.R., Brockmeyer J., Bielaszewska M., Wurzner R. 2014. Interaction of Shiga toxin 2 with complement regulators of the factor H protein family. *Mol. Immunol.* **58**, 77–84.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.11.009>
82. Ehrlenbach S., Rosales A., Posch W., Wilflingseder D., Hermann M., Brockmeyer J., Karch H., Satchell S.C., Wurzner R., Orth-Holler D. 2013. Shiga toxin 2 reduces complement inhibitor CD59 expression on human renal tubular epithelial and glomerular endothelial cells. *Infect. Immun.* **81**, 2678–2685.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01079-12>
83. Iwaki D., Kanno K., Takahashi M., Endo Y., Matsushita M., Fujita T. 2011. The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. *J. Immunol.* **187**, 3751–3758.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100280>
84. Ozaki M., Kang Y., Tan Y.S., Pavlov V.I., Liu B., Boyle D.C., Kushak R.I., Skjoedt M.O., Grabowski E.F., Taira Y., Stahl G.L. 2016. Human mannose-binding lectin inhibitor prevents Shiga toxin-induced renal injury. *Kidney Int.* **90**, 774–782.
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.05.011>
85. Lathem W.W., Grys T.E., Witowski S.E., Torres A.G., Kaper J.B., Tarr P.I., Welch R.A. 2002. StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol. Microbiol.* **45**, 277–288.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02997.x>
86. Zeerleder S. 2011. C1-inhibitor: More than a serine protease inhibitor. *Semin. Thromb. Hemost.* **37**, 362–374.
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1276585>
87. Morigi M., Galbusera M., Gastoldi S., Locatelli M., Buelli S., Pezzotta A., Pagani C., Noris M., Gobbi M., Stravalaci M., Rottoli D., Tedesco F., Remuzzi G.,

- Zimbabwe. *Pediatr. Nephrol.* **16**, 1142–1145. <https://doi.org/10.1007/s004670100049>
98. Parsonnet J., Greene K.D., Gerber A.R., Tauxe R.V., Vallejo Aguilar O.J., Blake P.A. 1989. *Shigella dysenteriae* type 1 infections in US travellers to Mexico. 1988. *Lancet.* **2**, 543–545. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90662-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90662-4)
 99. Rollins N.C., Wittenberg D.F., Coovadia H.M., Pillay D.G., Karas A.J., Sturm A.W. 1995. Epidemic *Shigella dysenteriae* type 1 in Natal. *J. Trop. Pediatr.* **41**, 281–284. <https://doi.org/10.1093/tropej/41.5.281>
 100. Bennish M.L., Khan W.A., Begum M., Bridges E.A., Ahmed S., Saha D., Salam M.A., Acheson D., Ryan E.T. 2006. Low risk of hemolytic uremic syndrome after early effective antimicrobial therapy for *Shigella dysenteriae* type 1 infection in Bangladesh. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 356–362. <https://doi.org/10.1086/499236>
 101. Tzipori S., Sheoran A., Akiyoshi D., Donohue-Rolfe A., Trachtman H. 2004. Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 926–941. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.926-941.2004>
 102. Koster F., Levin J., Walker L., Tung K.S., Gilman R.H., Rahaman M.M., Majid M.A., Islam S., Williams R.C., Jr. 1978. Hemolytic-uremic syndrome after shigellosis. Relation to endotoxemia and circulating immune complexes. *N. Engl. J. Med.* **298**, 927–933. <https://doi.org/10.1056/NEJM197804272981702>
 103. Butler T., Rahman H., Al-Mahmud K.A., Islam M., Bardhan P., Kabir I., Rahman M.M. 1985. An animal model of haemolytic-uraemic syndrome in shigellosis: Lipopolysaccharides of *Shigella dysenteriae* I and *S. flexneri* produce leucocyte-mediated renal cortical necrosis in rabbits. *Br. J. Exp. Pathol.* **66**, 7–15.
 104. Cody E. M., Dixon B.P. 2019. Hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Clin. North. Am.* **66** (1), 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.09.011>
 105. Vaith P., Uhlenbruck G. 1978. The Thomsen agglutination phenomenon: A discovery revisited 50 years later. *Z. Immunitätsforsch Immunobiol.* **154**, 1–15.
 106. Copelovitch L., Kaplan B.S. 2008. *Streptococcus pneumoniae*-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **23**, 1951–1956. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0518-y>
 107. Huang D.T., Chi H., Lee H.C., Chiu N.C., Huang F.Y. 2006. T-antigen activation for prediction of pneumococcus-induced hemolytic uremic syndrome and hemolytic anemia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 608–610. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000223494.83542.ad>
 108. Rose P.E., Armour J.A., Williams C.E., Hill F.G. 1985. Verotoxin and neuraminidase induced platelet aggregating activity in plasma: Their possible role in the pathogenesis of the haemolytic uraemic syndrome. *J. Clin. Pathol.* **38**, 438–441. <https://doi.org/10.1136/jcp.38.4.438>
 109. Gilbert R.D., Nagra A., Haq M.R. 2013. Does dysregulated complement activation contribute to haemolytic uraemic syndrome secondary to *Streptococcus*
- Zoja C. 2011. Alternative pathway activation of complement by Shiga toxin promotes exuberant C3a formation that triggers microvascular thrombosis. *J. Immunol.* **187**, 172–180. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100491>
88. Del Conde I., Cruz M.A., Zhang H., Lopez J.A., Afshar-Kharghan V. 2005. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J. Exp. Med.* **201**, 871–879. <https://doi.org/10.1084/jem.20041497>
 89. Locatelli M., Buelli S., Pezzotta A., Corna D., Perico L., Tomasoni S., Rottoli D., Rizzo P., Conti D., Thurman J.M., Remuzzi G., Zoja C., Morigi M. 2014. Shiga toxin promotes podocyte injury in experimental hemolytic uremic syndrome via activation of the alternative pathway of complement. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 1786–1798. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013050450>
 90. Arvidsson I., Stahl A.L., Hedstrom M.M., Kristoffersson A.C., Rylander C., Westman J.S., Storry J.R., Olsson M.L., Karpman D. 2015. Shiga toxin-induced complement-mediated hemolysis and release of complement-coated red blood cell-derived microvesicles in hemolytic uremic syndrome. *J. Immunol.* **194**, 2309–2318. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402470>
 91. Sims P.J., Faioni E.M., Wiedmer T., Shattil S.J. 1988. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J. Biol. Chem.* **263**, 18205–18212.
 92. Butler T. 2012. Haemolytic uraemic syndrome during shigellosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **106**, 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.04.001>
 93. Al-Qarawi S., Fontaine R.E., Al-Qahtani M.S. 1995. An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with antibiotic treatment of hospital inpatients for dysentery. *Emerg. Infect. Dis.* **1**, 138–140. <https://doi.org/10.3201/eid0104.950407>
 94. Bin Saeed A.A., El Bushra H.E., Al-Hamdan N.A. 1995. Does treatment of bloody diarrhea due to *Shigella dysenteriae* type 1 with ampicillin precipitate hemolytic uremic syndrome? *Emerg. Infect. Dis.* **1**, 134–137. <https://doi.org/10.3201/eid0104.950406>
 95. Bloom P.D., MacPhail A.P., Klugman K., Louw M., Raubenheimer C., Fischer C. 1994. Haemolytic-uraemic syndrome in adults with resistant *Shigella dysenteriae* type I. *Lancet.* **344**, 206. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)92815-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92815-0)
 96. Houdouin V., Doit C., Mariani P., Brahimi N., Loirat C., Bourrillon A., Bingen E. 2004. A pediatric cluster of *Shigella dysenteriae* serotype 1 diarrhea with hemolytic uremic syndrome in 2 families from France. *Clin. Infect. Dis.* **38**, e96–99. <https://doi.org/10.1086/383474>
 97. Oneko M., Nyathi M.N., Doehring E. 2001. Post-dysenteric hemolytic uremic syndrome in Bulawayo,

- pneumoniae?* *Med. Hypotheses*. **81**, 400–403.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.05.030>
110. Johnson S., Waters A. 2012. Is complement a culprit in infection-induced forms of haemolytic uraemic syndrome? *Immunobiology*. **217**, 235–243.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.022>
111. Gomez Delgado I., Corvillo F., Nozal P., Arjona E., Madrid A., Melgosa M., Bravo J., Szilagyi A., Csuka D., Veszeli N., Prohaszka Z., Sanchez-Corral P. 2021. Complement genetic variants and FH desialylation in *S. pneumoniae*-haemolytic uraemic syndrome. *Front. Immunol.* **12**, 641656.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.641656>
112. Poschmann A., Fischer K., Grundmann A., Vongjirad A. 1976. Neuraminidase induced hemolytic anemia. Experimental and clinical observations. *Monatsschr. Kinderheilkd.* (1902). **124**, 15–24.
113. Eber S.W., Polster H., Quentin S.H., Rumpf K.W., Lynen R. 1993. Hemolytic-uremic syndrome in pneumococcal meningitis and infection. Importance of T-transformation. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **141**, 219–222.
114. Loupiac A., Elayan A., Cailliez M., Adra A.L., Decramer S., Thouret M.C., Harambat J., Guignonis V. 2013. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae*-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **32**, 1045–1049.
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31829ee872>
115. Herbert A.P., Makou E., Chen Z.A., Kerr H., Richards A., Rappsilber J., Barlow P.N. 2015. Complement evasion mediated by enhancement of captured factor H: Implications for protection of self-surfaces from complement. *J. Immunol.* **195**, 4986–4998.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501388>
116. Lu L., Ma Z., Jokiranta T.S., Whitney A.R., DeLeo F.R., Zhang J.R. 2008. Species-specific interaction of *Streptococcus pneumoniae* with human complement factor H. *J. Immunol.* **181**, 7138–7146.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7138>
117. Bollaert P.E., Bauer P., Judlin P., Laprevote-Heully M.C., Lambert H., Larcan A. 1989. Hemorrhagic colitis with *Streptococcus pyogenes* preceding hemolytic uremic syndrome during early pregnancy. *Nephron.* **52**, 103–104.
<https://doi.org/10.1159/000185598>
118. Izumi T., Hyodo T., Kikuchi Y., Imakiire T., Ikenoue T., Suzuki S., Yoshizawa N., Miura S. 2005. An adult with acute poststreptococcal glomerulonephritis complicated by hemolytic uremic syndrome and nephrotic syndrome. *Am. J. Kidney Dis.* **46**, e59–63.
<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.06.010>
119. Yildiz B., Kural N., Yazar C. 2004. Atypical hemolytic uremic syndrome associated with group A beta hemolytic streptococcus. *Pediatr. Nephrol.* **19**, 943–944.
<https://doi.org/10.1007/s00467-004-1536-7>
120. Shepherd A.B., Palmer A.L., Bigler S.A., Baliga R. 2003. Hemolytic uremic syndrome associated with group A beta-hemolytic streptococcus. *Pediatr. Nephrol.* **18**, 949–951.
<https://doi.org/10.1007/s00467-003-1191-4>
121. Pandiripally V., Gregory E., Cue D. 2002. Acquisition of regulators of complement activation by *Streptococcus pyogenes* serotype M1. *Infect. Immun.* **70**, 6206–6214.
<https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6206-6214.2002>
122. Pandiripally V., Wei L., Skerka C., Zipfel P.F., Cue D. 2003. Recruitment of complement factor H-like protein 1 promotes intracellular invasion by group A streptococci. *Infect. Immun.* **71**, 7119–7128.
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.7119-7128.2003>
123. Inoue D., Oda T., Iwama S., Hoshino T., Mukae M., Sakai T., Kojima A., Uchida T., Kojima T., Sugisaki K., Tomiyasu T., Yoshikawa N., Yamada M. 2022. Thrombotic microangiopathy with transiently positive direct Coombs test in an adult with poststreptococcal acute glomerulonephritis: a case report. *BMC Nephrol.* **23**, 56.
<https://doi.org/10.1186/s12882-022-02684-z>
124. Oda T., Yoshizawa N., Yamakami K., Sakurai Y., Takechi H., Yamamoto K., Oshima N., Kumagai H. 2012. The role of nephritis-associated plasmin receptor (NAPlr) in glomerulonephritis associated with streptococcal infection. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, **417675**.
<https://doi.org/10.1155/2012/417675>
125. Poschmann A., Fischer K. 1979. Exchange transfusion with heparinised fresh blood in necrotising enterocolitis. *Lancet.* **1**, 824–825.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(79\)91343-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(79)91343-6)
126. Seger R., Joller P., Bird G.W., Wingham J., Wuest J., Kenny A., Rapp A., Garzoni D., Hitzig W.H., Duc G. 1980. Necrotising enterocolitis and neuraminidase-producing bacteria. *Helv. Paediatr. Acta.* **35**, 121–128.
127. Seges R.A., Kenny A., Bird G.W., Wingham J., Baals H., Stauffer U.G. 1981. Pediatric surgical patients with severe anaerobic infection: Report of 16 T-antigen positive cases and possible hazards of blood transfusion. *J. Pediatr. Surg.* **16**, 905–910.
[https://doi.org/10.1016/s0022-3468\(81\)80844-5](https://doi.org/10.1016/s0022-3468(81)80844-5)
128. Seitz R.C., Poschmann A., Hellwege H.H. 1997. Monoclonal antibodies for the detection of desialylation of erythrocyte membranes during haemolytic disease and haemolytic uraemic syndrome caused by the in vivo action of microbial neuraminidase. *Glycoconj. J.* **14**, 699–706.
<https://doi.org/10.1023/a:1018565316310>
129. Paddock C.D., Sanden G.N., Cherry J.D., Gal A.A., Langston C., Tatti K.M., Wu K.H., Goldsmith C.S., Greer P.W., Montague J.L., Eliason M.T., Holman R.C., Guarner J., Shieh W.J., Zaki S.R. 2008. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 328–338.
<https://doi.org/10.1086/589753>
130. Berner R., Krause M.F., Gordjani N., Zipfel P.F., Boehm N., Krueger M., Brandis M., Zimmerhackl L.B. 2002. Hemolytic uremic syndrome due to an altered factor H triggered by neonatal pertussis. *Pediatr. Nephrol.* **17**, 190–192.
<https://doi.org/10.1007/s00467-001-0798-6>
131. Chaturvedi S., Licht C., Langlois V. 2010. Hemolytic uremic syndrome caused by *Bordetella pertussis* infec-

- tion. *Pediatr. Nephrol.* **25**, 1361–1364.
<https://doi.org/10.1007/s00467-010-1449-6>
132. Pela I., Seracini D., Caprioli A., Castelletti F., Giammanco A. 2006. Hemolytic uremic syndrome in an infant following *Bordetella pertussis* infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**, 515–517.
<https://doi.org/10.1007/s10096-006-0171-6>
133. Saida K., Ogura M., Kano Y., Ishimori S., Yoshikawa T., Nagata H., Sato M., Kamei K., Ishikura K. 2018. Treatment of hemolytic uremic syndrome related to *Bordetella pertussis* infection – is plasma exchange or eculizumab use necessary? *BMC Nephrol.* **19**, 365.
<https://doi.org/10.1186/s12882-018-1168-y>
134. Jongerius I., Schuijt T.J., Mooi F.R., Pinelli E. 2015. Complement evasion by *Bordetella pertussis*: Implications for improving current vaccines. *J. Mol. Med. (Berl.)*. **93**, 395–402.
<https://doi.org/10.1007/s00109-015-1259-1>
135. Barnes M.G., Weiss A.A. 2001. BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect. Immun.* **69**, 3067–3072.
<https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3067-3072.2001>
136. Marr N., Shah N.R., Lee R., Kim E.J., Fernandez R.C. 2011. *Bordetella pertussis* autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS One*. **6**, e20585.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020585>
137. Mooi F.R., van Loo I.H., van Gent M., He Q., Bart M.J., Heuvelman K.J., de Greeff S.C., Diavatopoulos D., Teunis P., Nagelkerke N., Mertsola J. 2009. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1206–1213.
<https://doi.org/10.3201/eid1508.081511>
138. Berggard K., Johnsson E., Mooi F.R., Lindahl G. 1997. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: Role of filamentous hemagglutinin. *Infect. Immun.* **65**, 3638–3643.
<https://doi.org/10.1128/iai.65.9.3638-3643.1997>
139. Berggard K., Lindahl G., Dahlback B., Blom A.M. 2001. *Bordetella pertussis* binds to human C4b-binding protein (C4BP) at a site similar to that used by the natural ligand C4b. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2771–2780.
[https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200109\)31:9<2771::aid-immu2771>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200109)31:9<2771::aid-immu2771>3.0.co;2-0)
140. Fernandez R.C., Weiss A.A. 1998. Serum resistance in bvg-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 57–63.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13026.x>
141. Zipfel P.F., Hallstrom T., Riesbeck K. 2013. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes—tipping the balance. *Mol. Immunol.* **56**, 152–160.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.222>
142. Amdahl H., Jarva H., Haanpera M., Mertsola J., He Q., Jokiranta T.S., Meri S. 2011. Interactions between *Bordetella pertussis* and the complement inhibitor factor H. *Mol. Immunol.* **48**, 697–705.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.11.015>
143. Meri T., Amdahl H., Lehtinen M.J., Hyvarinen S., McDowell J.V., Bhattacharjee A., Meri S., Marconi R., Goldman A., Jokiranta T.S. 2013. Microbes bind complement inhibitor factor H via a common site. *PLoS Pathog.* **9**, e1003308.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003308>
144. Albaqali A., Ghuloom A., Al Arayed A., Al Ajami A., Shome D.K., Jamsheer A., Al Mahroos H., Jelacic S., Tarr P.I., Kaplan B.S., Dhiman R.K. 2003. Hemolytic uremic syndrome in association with typhoid fever. *Am. J. Kidney Dis.* **41**, 709–713.
<https://doi.org/10.1053/ajkd.2003.50135>
145. Beutin L., Strauch E., Fischer I. 1999. Isolation of *Shigella sonnei* lysogenic for a bacteriophage encoding gene for production of Shiga toxin. *Lancet.* **353**, 1498.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)00961-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)00961-7)
146. Lamba K., Nelson J.A., Kimura A.C., Poe A., Collins J., Kao A.S., Cruz L., Inami G., Vaishampayan J., Garza A., Chaturvedi V., Vugia D.J. 2016. Shiga toxin 1-producing *Shigella sonnei* infections, California, United States, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 679–686.
<https://doi.org/10.3201/eid2204.151825>
147. Nyholm O., Lienemann T., Halkilahti J., Mero S., Rimhanen-Finne R., Lehtinen V., Salmenlinna S., Siitonen A. 2015. Characterization of *Shigella sonnei* isolate carrying Shiga toxin 2-producing gene. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 891–892.
<https://doi.org/10.3201/eid2105.140621>
148. Schmidt H. 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* **152**, 687–695.
[https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01249-9](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01249-9)
149. Martinez-Castillo A., Quiros P., Navarro F., Miro E., Muniesa M. 2013. Shiga toxin 2-encoding bacteriophages in human fecal samples from healthy individuals. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4862–4868.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01158-13>
150. Muniesa M., Jofre J. 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2443–2448.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2443-2448.1998>
151. Muniesa M., Lucena F., Jofre J. 1999. Comparative survival of free shiga toxin 2-encoding phages and *Escherichia coli* strains outside the gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5615–5618.
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5615-5618.1999>
152. Chan Y.S., Ng T.B. 2016. Shiga toxins: From structure and mechanism to applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 1597–1610.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7236-3>
153. Adams C., Vose A., Edmond M.B., Lyckholm L. 2017. *Shigella sonnei* and hemolytic uremic syndrome: A case report and literature review. *IDCases.* **8**, 6–8.
<https://doi.org/10.1016/j.idcr.2017.02.003>
154. Armstrong S.M., Wang C., Tigdi J., Si X., Dumpit C., Charles S., Gamage A., Moraes T.J., Lee W.L. 2012. Influenza infects lung microvascular endothelium leading to microvascular leak: role of apoptosis and

- claudin-5. *PLoS One*. **7**, e47323.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047323>
155. Hutchinson E.C. 2018. Influenza virus. *Trends Microbiol.* **26**, 809–810.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.013>
156. Allen U., Licht C. 2011. Pandemic H1N1 influenza A infection and (atypical) HUS - more than just another trigger? *Pediatr. Nephrol.* **26**, 3–5.
<https://doi.org/10.1007/s00467-010-1690-z>
157. Bento D., Mapril J., Rocha C., Marchbank K.J., Kavanagh D., Barge D., Strain L., Goodship T.H., Meneses-Oliveira C. 2010. Triggering of atypical hemolytic uremic syndrome by influenza A (H1N1). *Ren. Fail.* **32**, 753–756.
<https://doi.org/10.3109/0886022X.2010.486491>
158. Caltik A., Akyuz S.G., Erdogan O., Demircin G. 2011. Hemolytic uremic syndrome triggered with a new pandemic virus: influenza A (H1N1). *Pediatr. Nephrol.* **26**, 147–148.
<https://doi.org/10.1007/s00467-010-1649-0>
159. Trachtman H., Sethna C., Epstein R., D'Souza M., Rubin L.G., Ginocchio C.C. 2011. Atypical hemolytic uremic syndrome associated with H1N1 influenza A virus infection. *Pediatr. Nephrol.* **26**, 145–146.
<https://doi.org/10.1007/s00467-010-1636-5>
160. Watanabe T. 2001. Hemolytic uremic syndrome associated with influenza A virus infection. *Nephron.* **89**, 359–360.
<https://doi.org/10.1159/000046102>
161. Kobbe R., Schild R., Christner M., Oh J., Loos S., Kemper M.J. 2017. Case report - atypical hemolytic uremic syndrome triggered by influenza B. *BMC Nephrol.* **18**, 96.
<https://doi.org/10.1186/s12882-017-0512-y>
162. Mittal N., Hartemayer R., Jandeska S., Giordano L. 2019. Steroid responsive atypical hemolytic uremic syndrome triggered by influenza B infection. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **41**, e63–e67.
<https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001180>
163. van Hoeve K., Vandermeulen C., Van Ranst M., Levchenko E., van den Heuvel L., Mekahli D. 2017. Occurrence of atypical HUS associated with influenza B. *Eur. J. Pediatr.* **176**, 449–454.
<https://doi.org/10.1007/s00431-017-2856-5>
164. Boilard E., Pare G., Rousseau M., Cloutier N., Dubuc I., Levesque T., Borgeat P., Flamand L. 2014. Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood.* **123**, 2854–2863.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515536>
165. Rondina M.T., Brewster B., Grissom C.K., Zimmerman G.A., Kastendieck D.H., Harris E.S., Weyrich A.S. 2012. *In vivo* platelet activation in critically ill patients with primary 2009 influenza A(H1N1). *Chest.* **141**, 1490–1495.
<https://doi.org/10.1378/chest.11-2860>
166. Lambre C.R., Kazatchkine M.D., Maillet F., Thibon M. 1982. Guinea pig erythrocytes, after their contact with influenza virus, acquire the ability to activate the human alternative complement pathway through virus-induced desialation of the cells. *J. Immunol.* **128**, 629–634.
167. Bernal J.E., Mollnes T.E., Waehre T., Olstad O.K., Halvorsen B., Ueland T., Laake J.H., Furuseth M.T., Maagaard A., Kjekshus H., Aukrust P., Jonassen C.M. 2011. Excessive innate immune response and mutant D222G/N in severe A (H1N1) pandemic influenza. *J. Infect.* **63**, 308–316.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.07.004>
168. Sun S., Zhao G., Liu C., Wu X., Guo Y., Yu H., Song H., Du L., Jiang S., Guo R., Tomlinson S., Zhou Y. 2013. Inhibition of complement activation alleviates acute lung injury induced by highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **49**, 221–230.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0428OC>
169. Noris M., Remuzzi G. 2015. Glomerular diseases dependent on complement activation, including atypical hemolytic uremic syndrome, membranoproliferative glomerulonephritis, and C3 glomerulopathy: Core curriculum 2015. *Am. J. Kidney Dis.* **66**, 359–375.
<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.03.040>
170. Salvadori M., Bertoni E. 2013. Update on hemolytic uremic syndrome: Diagnostic and therapeutic recommendations. *World J. Nephrol.* **2**, 56–76.
<https://doi.org/10.5527/wjn.v2.i3.56>
171. Thurman J.M. 2015. Complement in kidney disease: Core curriculum 2015. *Am. J. Kidney Dis.* **65**, 156–168.
<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.06.035>
172. Bitzan M., Zieg J. 2018. Influenza-associated thrombotic microangiopathies. *Pediatr. Nephrol.* **33**, 2009–2025.
<https://doi.org/10.1007/s00467-017-3783-4>
173. Silecchia V., D'Onofrio G., Valerio E., Rubin G., Vidal E., Murer L. 2021. Influenza-associated hemolytic uremic syndrome: The pathogenic role of the virus. *Clin. Nephrol. Case Stud.* **9**, 45–48.
<https://doi.org/10.5414/CNCS110219>
174. Boccia R.V., Gelmann E.P., Baker C.C., Marti G., Longo D.L. 1984. A hemolytic-uremic syndrome with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* **101**, 716–717.
https://doi.org/10.7326/0003-4819-101-5-716_2
175. Freist M., Garrouste C., Szlavik N., Coppo P., Lautrette A., Heng A.E. 2017. Efficacy of eculizumab in an adult patient with HIV-associated hemolytic uremic syndrome: A case report. *Medicine (Baltimore).* **96**, e9358.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009358>
176. Jin A., Boroujerdi-Rad L., Shah G., Chen J.L. 2016. Thrombotic microangiopathy and human immunodeficiency virus in the era of eculizumab. *Clin. Kidney J.* **9**, 576–579.
<https://doi.org/10.1093/ckj/sfw035>
177. Huson M.A., Wouters D., van Mierlo G., Grobusch M.P., Zeerleder S.S., van der Poll T. 2015. HIV coinfection enhances complement activation during sepsis. *J. Infect. Dis.* **212**, 474–483.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiv074>

178. Huber M., Fischer M., Misselwitz B., Manrique A., Kuster H., Niederost B., Weber R., von Wyl V., Gunthard H.F., Trkola A. 2006. Complement lysis activity in autologous plasma is associated with lower viral loads during the acute phase of HIV-1 infection. *PLoS Med.* **3**, e441.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030441>
179. Senaldi G., Peakman M., McManus T., Davies E.T., Tee D.E., Vergani D. 1990. Activation of the complement system in human immunodeficiency virus infection: Relevance of the classical pathway to pathogenesis and disease severity. *J. Infect. Dis.* **162**, 1227–1232.
<https://doi.org/10.1093/infdis/162.6.1227>
180. Spear G.T., Takefman D.M., Sullivan B.L., Landay A.L., Zolla-Pazner S. 1993. Complement activation by human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **67**, 53–59.
<https://doi.org/10.1128/JVI.67.1.53-59.1993>
181. Stoiber H., Kacani L., Speth C., Wurzner R., Dierich M.P. 2001. The supportive role of complement in HIV pathogenesis. *Immunol. Rev.* **180**, 168–176.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2001.1800115.x>
182. Humbert M., Dietrich U. 2006. The role of neutralizing antibodies in HIV infection. *AIDS Rev.* **8**, 51–59.
183. Ji X., Gewurz H., Spear G.T. 2005. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol. Immunol.* **42**, 145–152.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.015>
184. Ezekowitz R.A., Kuhlman M., Groopman J.E., Byrn R.A. 1989. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J. Exp. Med.* **169**, 185–196.
<https://doi.org/10.1084/jem.169.1.185>
185. Haurum J.S., Thiel S., Jones I.M., Fischer P.B., Laursen S.B., Jensenius J.C. 1993. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. *AIDS.* **7**, 1307–1313.
<https://doi.org/10.1097/00002030-199310000-00002>
186. Saifuddin M., Hart M.L., Gewurz H., Zhang Y., Spear G.T. 2000. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* **81**, 949–955.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-4-949>
187. Hart M.L., Saifuddin M., Spear G.T. 2003. Glycosylation inhibitors and neuraminidase enhance human immunodeficiency virus type 1 binding and neutralization by mannose-binding lectin. *J. Gen. Virol.* **84**, 353–360.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.18734-0>
188. Ying H., Ji X., Hart M.L., Gupta K., Saifuddin M., Zariffard M.R., Spear G.T. 2004. Interaction of mannose-binding lectin with HIV type 1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **20**, 327–335.
<https://doi.org/10.1089/088922204322996563>
189. Bajtaj Z., Speth C., Erdei A., Dierich M.P. 2004. Cutting edge: Productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). *J. Immunol.* **173**, 4775–4778.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.8.4775>
190. Pruenster M., Wilflingseder D., Banki Z., Ammann C.G., Muellauer B., Meyer M., Speth C., Dierich M.P., Stoiber H. 2005. C-type lectin-independent interaction of complement opsonized HIV with monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **35**, 2691–2698.
<https://doi.org/10.1002/eji.200425940>
191. Prohaszka Z., Nemes J., Hidvegi T., Toth F.D., Kerekes K., Erdei A., Szabo J., Ujhelyi E., Thielens N., Dierich M.P., Spath P., Ghebrehiwet B., Hampl H., Kiss J., Arlaud G., Fust G. 1997. Two parallel routes of the complement-mediated antibody-dependent enhancement of HIV-1 infection. *AIDS.* **11**, 949–958.
<https://doi.org/10.1097/00002030-199708000-00002>
192. Delibrias C.C., Kazatchkine M.D., Fischer E. 1993. Evidence for the role of CR1 (CD35), in addition to CR2 (CD21), in facilitating infection of human T cells with opsonized HIV. *Scand. J. Immunol.* **38**, 183–189.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1993.tb01711.x>
193. Kacani L., Banki Z., Zwirner J., Schennach H., Bajtaj Z., Erdei A., Stoiber H., Dierich M.P. 2001. C5a and C5a(desArg) enhance the susceptibility of monocyte-derived macrophages to HIV infection. *J. Immunol.* **166**, 3410–3415.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.5.3410>
194. Speth C., Schabetsberger T., Mohsenipour I., Stockl G., Wurzner R., Stoiber H., Lass-Florl C., Dierich M.P. 2002. Mechanism of human immunodeficiency virus-induced complement expression in astrocytes and neurons. *J. Virol.* **76**, 3179–3188.
<https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3179-3188.2002>
195. Horakova E., Gasser O., Sadallah S., Inal J.M., Bourgeois G., Ziekau I., Klimkait T., Schifferli J.A. 2004. Complement mediates the binding of HIV to erythrocytes. *J. Immunol.* **173**, 4236–4241.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.4236>
196. Stoiber H., Pinter C., Siccardi A.G., Clivio A., Dierich M.P. 1996. Efficient destruction of human immunodeficiency virus in human serum by inhibiting the protective action of complement factor H and decay accelerating factor (DAF, CD55). *J. Exp. Med.* **183**, 307–310.
<https://doi.org/10.1084/jem.183.1.307>
197. Saifuddin M., Parker C.J., Peeples M.E., Gorny M.K., Zolla-Pazner S., Ghassemi M., Rooney I.A., Atkinson J.P., Spear G.T. 1995. Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1. *J. Exp. Med.* **182**, 501–509.
<https://doi.org/10.1084/jem.182.2.501>
198. Schmitz J., Zimmer J.P., Kluxen B., Aries S., Bogel M., Gigli I., Schmitz H. 1995. Antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity in sera from patients with HIV-1 infection is controlled by CD55 and CD59. *J. Clin. Invest.* **96**, 1520–1526.
<https://doi.org/10.1172/JCI118190>
199. Glasgow L.A., Balduzzi P. 1965. Isolation of Coxsackie virus group A, type 4, from a patient with hemolytic-

- uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **273**, 754–756.
<https://doi.org/10.1056/NEJM196509302731407>
200. Austin T.W., Ray C.G. 1973. Coxsackie virus group B infections and the hemolytic-uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* **127**, 698–701.
<https://doi.org/10.1093/infdis/127.6.698>
201. De Petris L., Gianviti A., Caione D., Innocenzi D., Edefonti A., Montini G., De Palo T., Tozzi A.E., Caprioli A., Rizzoni G. 2002. Role of non-polio enterovirus infection in pediatric hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **17**, 852–855.
<https://doi.org/10.1007/s00467-002-0966-3>
202. Larke R.P., Preiksaitis J.K., Devine R.D., Harley F.L. 1983. Haemolytic uraemic syndrome: Evidence of multiple viral infections in a cluster of ten cases. *J. Med. Virol.* **12**, 51–59.
<https://doi.org/10.1002/jmv.1890120106>
203. O'Regan S., Robitaille P., Mongeau J.G., McLaughlin B. 1980. The hemolytic uremic syndrome associated with ECHO 22 infection. *Clin. Pediatr. (Phila)*. **19**, 125–127.
<https://doi.org/10.1177/000992288001900207>
204. Ray C.G., Portman J.N., Stamm S.J., Hickman R.O. 1971. Hemolytic-uremic syndrome and myocarditis. Association with coxsackievirus B infection. *Am. J. Dis. Child.* **122**, 418–420.
<https://doi.org/10.1001/archpedi.1971.02110050088010>
205. Ray C.G., Tucker V.L., Harris D.J., Cuppage F.E., Chin T.D. 1970. Enteroviruses associated with the hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics*. **46**, 378–388.
206. Vecilla M.C., Ruiz Moreno M., Bernacer M., Casado S., Rocandio L. 1984. Familial hemolytic-uremic syndrome associated with Coxsackie B infection. *An. Esp. Pediatr.* **20**, 369–374.
207. Lee M.D., Tzen C.Y., Lin C.C., Huang F.Y., Liu H.C., Tsai J.D. 2013. Hemolytic uremic syndrome caused by enteroviral infection. *Pediatr. Neonatol.* **54**, 207–210.
<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2012.10.012>
208. Spiller O.B., Goodfellow I.G., Evans D.J., Almond J.W., Morgan B.P. 2000. Echoviruses and coxsackie B viruses that use human decay-accelerating factor (DAF) as a receptor do not bind the rodent analogues of DAF. *J. Infect. Dis.* **181**, 340–343.
<https://doi.org/10.1086/315210>
209. Fujita T., Inoue T., Ogawa K., Iida K., Tamura N. 1987. The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb. *J. Exp. Med.* **166**, 1221–1228.
<https://doi.org/10.1084/jem.166.5.1221>
210. Medof M.E., Kinoshita T., Nussenzweig V. 1984. Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J. Exp. Med.* **160**, 1558–1578.
<https://doi.org/10.1084/jem.160.5.1558>
211. Nicholson-Weller A., Burge J., Fearon D.T., Weller P.F., Austen K.F. 1982. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *J. Immunol.* **129**, 184–189.
212. Nicholson-Weller A., Wang C.E. 1994. Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J. Lab. Clin. Med.* **123**, 485–491.
213. Anderson D.R., Carthy C.M., Wilson J.E., Yang D., Devine D.V., McManus B.M. 1997. Complement component 3 interactions with coxsackievirus B3 capsid proteins: innate immunity and the rapid formation of splenic antiviral germinal centers. *J. Virol.* **71**, 8841–8845.
<https://doi.org/10.1128/JVI.71.11.8841-8845.1997>
214. Zanone M.M., Favaro E., Conaldi P.G., Greening J., Bottelli A., Perin P.C., Klein N.J., Peakman M., Camussi G. 2003. Persistent infection of human microvascular endothelial cells by coxsackie B viruses induces increased expression of adhesion molecules. *J. Immunol.* **171**, 438–446.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.438>
215. Richardson G.M., Su S.W., Iragorri S. 2022. Case report: Diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in the Era of COVID-19. *Front. Pediatr.* **10**, 979850.
<https://doi.org/10.3389/fped.2022.979850>
216. Smarz-Widelska I., Syroka-Glowka M., Janowska-Jaremek J., Koziol M.M., Zaluska W. 2022. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome after SARS-CoV-2 Infection: Report of Two Cases. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **19**.
<https://doi.org/10.3390/ijerph191811437>
217. Dalkiran T., Kandur Y., Kara E.M., Dagoglu B., Taner S., Oncu D. 2021. Thrombotic microangiopathy in a severe pediatric case of COVID-19. *Clin. Med. Insights. Pediatr.* **15**, 11795565211049897.
<https://doi.org/10.1177/11795565211049897>
218. Helms J., Tacquard C., Severac F., Leonard-Lorant I., Ohana M., Delabranche X., Merdji H., Clere-Jehl R., Schenck M., Fagot Gandet F., Fafi-Kremer S., Castelain V., Schneider F., Grunebaum L., Angles-Cano E., Sattler L., Mertes P.M., Meziani F., Group C.T. 2020. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: A multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med.* **46**, 1089–1098.
<https://doi.org/10.1007/s00134-020-06062-x>
219. Magro C., Mulvey J.J., Berlin D., Nuovo G., Salvatore S., Harp J., Baxter-Stoltzfus A., Laurence J. 2020. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. *Transl. Res.* **220**, 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.007>
220. Beltrame M.H., Catarino S.J., Goeldner I., Boldt A.B., de Messias-Reason I.J. 2014. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Front. Pediatr.* **2**, 148.
<https://doi.org/10.3389/fped.2014.00148>
221. Krarup A., Wallis R., Presanis J.S., Gal P., Sim R.B. 2007. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS One.* **2**, e623.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000623>

Complement System As a Common Link in the Pathogenesis of Hemolytic Uremic Syndrome

M. S. Blinova¹, G. A. Generalova^{2, 3}, Kh. M. Emirova^{2, 3}, E. G. Popov⁴,
N. V. Tsvetaeva⁵, S. A. Vasiliev⁵, P. P. Avdonin^{1, *}

¹*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

²*Saint Vladimir Moscow City Children's Clinical Hospital, Moscow, 107014 Russia*

³*Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, 127473 Russia*

⁴*National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov,
Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia*

⁵*Hematology Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, 125167 Russia*

*e-mail: ppavdonin@gmail.com

Hemolytic uremic syndrome (HUS) is the most common cause of acute renal failure in children. The main causes of HUS are infections caused by Shiga toxin-producing bacteria: hemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1. They account for up to 90% of all cases of HUS. The remaining 10% represent a heterogeneous group of diseases collectively referred to as atypical HUS. The pathogenesis of most cases of atypical HUS is based on congenital or acquired disorders in the complement system. Over the past decades, evidence has accumulated that, in addition to *E. coli* and *Sh. dysenteriae* type 1, a wide variety of bacterial and viral infections, including the pathogens of pneumonia *Streptococcus pneumoniae*, immunodeficiency virus, H1N1 influenza, and a new coronavirus infection, can cause the development of HUS. In particular, infectious diseases act as the main cause of recurrence of atypical HUS. This review presents summarized data from recent studies, indicating that in various types of infectious HUS, disturbances in the complement system are a key pathogenetic factor. The links in the complement system are considered, the dysregulation of which in bacterial and viral infections can lead to complement hyperactivation with subsequent damage to the microvascular endothelium and the development of acute renal failure.

Keywords: hemolytic uremic syndrome, complement system, thrombotic microangiopathy, eculizumab, *Escherichia coli*, Shiga toxin, STEC-HUS, hemolytic anemia, thrombocytopenia, acute renal failure, pathogenesis, endothelium

УДК 577.112.345

МЕМБРАНОАКТИВНЫЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО НАПРАВЛЕННЫЕ АГЕНТЫ И СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ

© 2023 г. А. П. Садиков^а, З. Г. Дениева^б, У. А. Буданова^{а, *}, Ю. Л. Себякин^а

^аМИРЭА – Российский технологический университет

(Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

^бИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,

Москва, 119071 Россия

*e-mail: c-221@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 03.04.2023 г.

Митохондрии являются “энергетическими станциями”, без которых невозможно нормальное функционирование живой клетки. Благодаря разнообразию процессов, которые протекают при участии митохондрий, а также особенностям митохондрий здоровых и опухолевых клеток, эта органелла представляет собой привлекательную мишень для терапии онкологических заболеваний. В данном обзоре рассмотрены разнообразные подходы к созданию диагностических и терапевтических средств, селективно направленных на митохондрии пораженных клеток. Описаны основные митохондриально направленные лиганды, их конъюгация с известными противоопухолевыми препаратами, а также комбинации с распространенными средствами доставки лекарственных агентов, применяемых в целях медицины.

Ключевые слова: митохондрии, наночастицы, делокализованные катионы, противоопухолевые средства

DOI: 10.31857/S0233475523040060, **EDN:** OJUULY

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности человека. Согласно оценкам, представленным Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), в 2020 году диагноз “онкологическое заболевание” был поставлен более, чем 19 млн человек, а погибло около 10 млн человек. Это очень сложная по своему фенотипическому проявлению болезнь, однако вовремя выявленные случаи можно эффективно лечить.

Для лечения опухолей существует целый ряд разнообразных подходов, таких как хирургия, иммунотерапия, гормонотерапия, химиотерапия, лучевая терапия, а также комбинирование нескольких методов. Однако такие стратегии имеют существенные недостатки, в первую очередь, их неселективный характер, который оказывает негативное влияние на соседние здоровые ткани. Чтобы преодолеть эти серьезные ограничения, ученые по всему миру ищут новые терапевтические мишени, а также разрабатывают инновационные, относительно безопасные для здоровых клеток и тканей подходы к лечению.

Одной из передовых стратегий борьбы с онкологическими заболеваниями может стать создание препаратов, нацеленных на митохондрии клеток. Митохондрии, являющиеся фабрикой по производству энергии, играют важную роль как в жизни, так и в гибели клеток [1]. В последние годы они рассматриваются в качестве важной мишени воздействия лекарственных средств из-за активного участия в пролиферации опухолевых клеток [2]. Благодаря разнообразию существующих на сегодняшний день медицинских наноматериалов, создание селективно направленных на митохондрии препаратов является реализуемой практической задачей. Данный подход интересен тем, что он имеет высокую эффективность и потенциал для преодоления многих терапевтических ограничений [3].

В данном обзоре внимание уделено митохондриям как перспективной терапевтической мишени. Приведены основные структурные фрагменты – лиганды, способные селективно связываться с митохондриальной мембраной, а также их комбинации с распространенными средствами доставки лекарственных агентов. Подобные

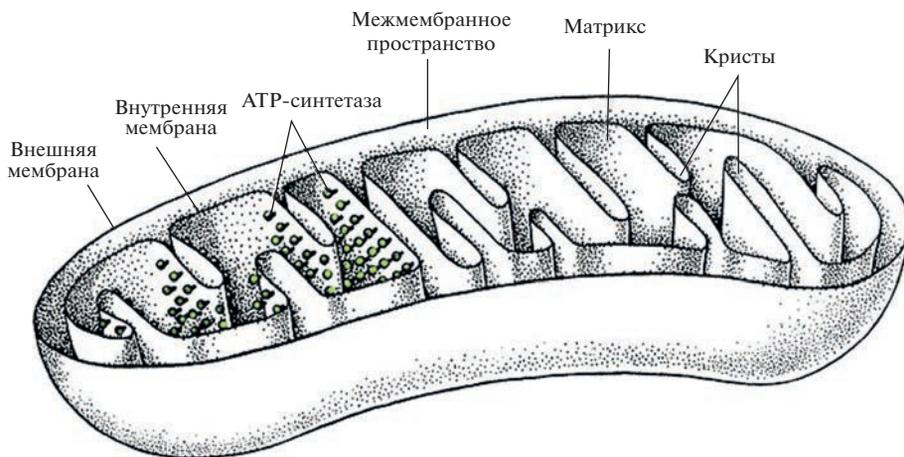


Рис. 1. Схематическое изображение строения митохондрии клетки.

системы способны предотвращать преждевременное разрушение лекарственного вещества за счет его инкапсулирования, тем самым снижая иммунный ответ организма на терапию. Таким образом, транспортные системы, модифицированные митохондриально направленными лигандами, увеличивают эффективность и селективность таргетной терапии опухолей, что связано с высокой аффинностью вектора к гиперполяризованным митохондриям опухолевых клеток.

МИТОХОНДРИИ КАК ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ

Митохондрия — органелла, основной функцией которой является производство энергии для жизнеобеспечения клетки. Она участвует в регулировании жизненно важных клеточных процессов (цикл Кребса, окисление жирных кислот, цикл мочевины, запасание кальция для клеточной сигнальной активности и др.), а также опосредует рост и гибель клеток [4]. Эукариотические клетки содержат до 1000–2000 митохондрий, которые занимают до 20% внутреннего объема клетки [5]. Митохондрия может быть представлена в виде отдельной органеллы овальной формы и иметь размер от 0.5 до 10 мкм (рис. 1) либо в виде связанных упорядоченных структур, называемых митохондриальной сетью или ретикулумом [6, 7]. Митохондрия имеет две мембраны (внутреннюю и внешнюю), уникальный геном и воспроизводится путем бинарного деления. В митохондриальном геноме человека содержится 37 генов, 13 из которых продуцируют различные компоненты электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) [8]. Компоненты митохондрии имеют свою индивидуальную роль в делении, слиянии и взаимодействии с другими органеллами. Нарушение в этих процессах может привести к повреждению ДНК клетки, кальциевой перегрузке, расстройству ме-

таболизма и, в конечном итоге, развитию онкологического заболевания [9].

Благодаря разнообразию процессов, которые протекают при участии митохондрий, эти органеллы представляют собой привлекательные мишени для терапии опухолей. На сегодняшний день известны препараты, нацеленные на окислительное фосфорилирование, цикл Кребса, метаболизм глутамина и митохондриальную динамику [10]. Ингибиторы дыхательной цепи переноса электронов (Тамоксифен, α -токоферил сукцинат, метформин и 3-бромопируват) препятствуют усиленному производству активных форм кислорода (АФК), что, в свою очередь, может привести к смерти опухолевой клетки, нуждающейся в повышенном содержании АФК [11]. Известно, что при глиоме, хондросаркоме и остром миелоидном лейкозе встречаются мутации генов, кодирующих изоцитратдегидрогиназы (ИДГ) — ферменты, участвующие в цикле Кребса [12]. В связи с этим нацеливание терапевтических молекул на данные белки исследуют как подход к лечению раковых опухолей. *L*-Глутамин является необходимым субстратом для правильной работы митохондрий, а антагонисты или ингибиторы метаболизма *L*-глутамина играют важную роль в борьбе с онкологическими заболеваниями [10]. Сообщают, что антагонист *L*-глутамина пропрепарат JHU-083 подавляет рост провоцируемой протоонкогенным белком MYC медуллобластомы [13], а ингибитор метаболизма *L*-глутамина V9302 показывает повышение эффективности анти-PD-1 терапии моноклональными антителами [14]. К динамике митохондрий относят циклы слияния, деления, биогенеза и митофагии, которые вместе поддерживают оптимальную клеточную биоэнергетику и гомеостаз АФК. Нацеливание на такие процессы очень актуально для создания противоопухолевых средств. Выявлены онкогенные эффекты митохондриальной дисфункции [15], опосредо-

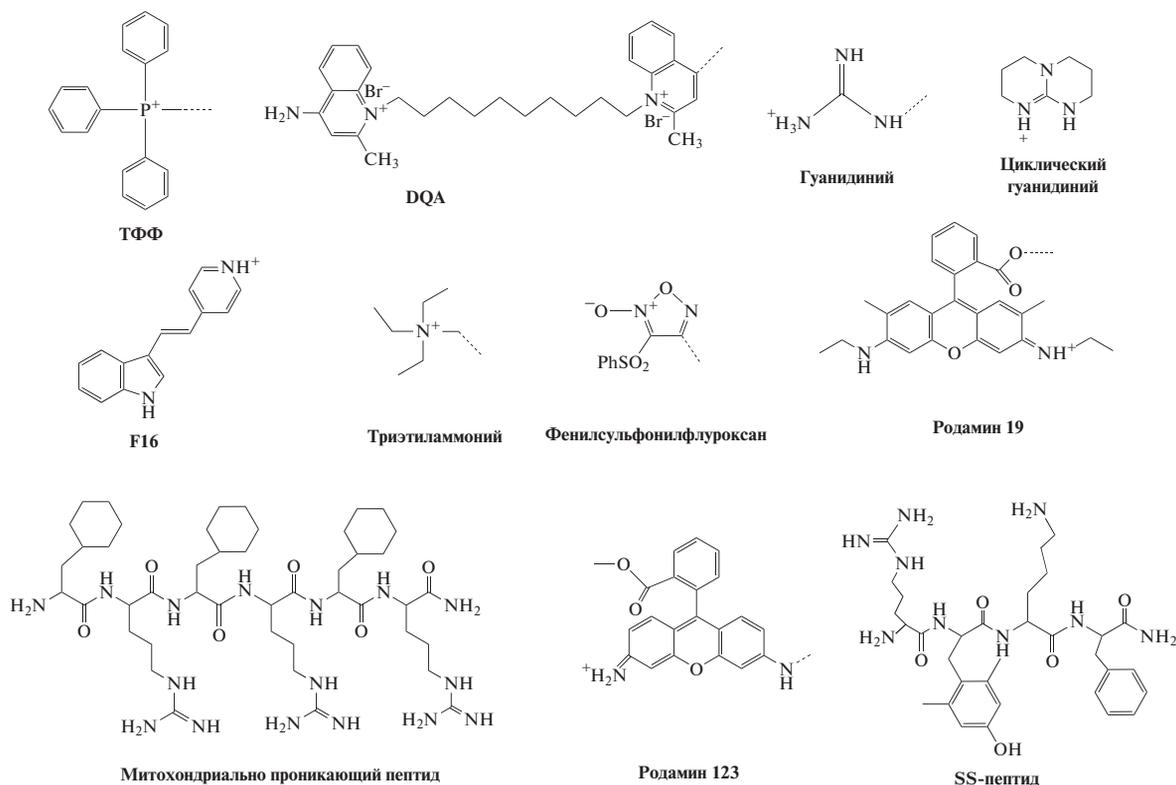


Рис. 2. Нацеленные на митохондрии структурные фрагменты.

ванные динамикой митохондрий и каспазозависимым повреждением ДНК. На сегодняшний день разрабатывают подходы, в которых мишенью для терапии выступают белки, участвующие в изменении морфологии и локализации митохондрий [16]. Прямое или косвенное ингибирование деления митохондрий может быть целесообразным для лечения рака молочной железы [17].

Таким образом, уникальные особенности митохондрий делают ее перспективной целью для лекарств и закладывают большой потенциал для разработки противоопухолевых лекарственных соединений, нацеленных непосредственно на эту органеллу живой клетки.

СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА МИТОХОНДРИИ

За последнее десятилетие обнаружен ряд специфичных для митохондрий соединений, которые могут значительно повысить терапевтическую эффективность и уменьшить побочные эффекты связанных с ними лекарственных средств. Способность таких молекул селективно воздействовать на митохондрии дает возможность “атаковать” опухолевые клетки, вызывая их скорую гибель.

На сегодняшний день наиболее широко используемыми митохондриально нацеленными лигандами являются трифенилфосфоний, деквалиний (DQA), короткие пептиды, родамин 19 и 123, производные пиридина и гуанидина, 4-(1H-индол-3-ил-винил)-N-метилпиридиния иодид (F16) и 2,3-диметилбензотриазолия иодид (рис. 2). Все они относятся к группе делокализованных липофильных катионов (ДЛК), которые преимущественно накапливаются в митохондриях опухолевых клеток благодаря трансмембранному потенциалу у митохондрий этих клеток [18].

Поглощение и накопление митохондриями ДЛК обусловлено значением электрохимического потенциала мембраны ($\Delta\Psi$). У здоровой клетки трансмембранный потенциал плазматической мембраны составляет от -40 до -60 мВ, а митохондриальной мембраны – от -120 до -180 мВ; у опухолевых клеток трансмембранный потенциал митохондрий достигает -220 мВ, благодаря чему возможна селективная доставка агентов в митохондрии опухолевой клетки [16].

Для раковых клеток наблюдается трех-пятикратное увеличение цитозольной концентрации ДЛК по сравнению с внеклеточной, а в митохондриальном матриксе концентрация увеличивается в 100–1000 раз (рис. 3) [18].

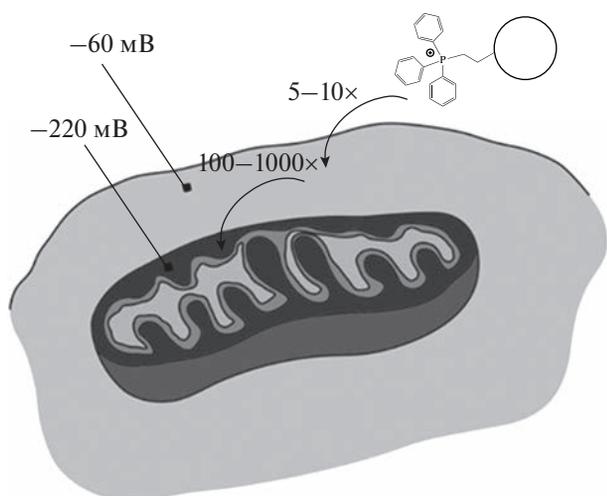


Рис. 3. Значения трансмембранных потенциалов плазматической и митохондриальной мембран опухолевых клеток.

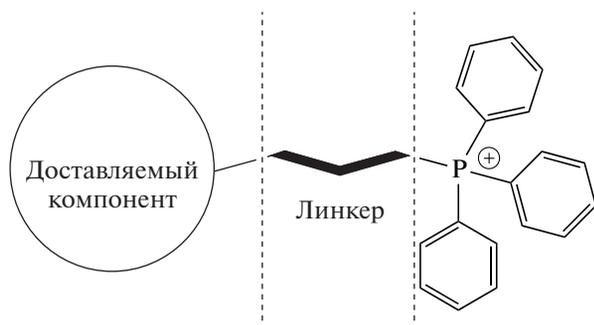


Рис. 4. Схематическое изображение типичной структуры трифенилфосфониевого конъюгата, направленного на митохондрию. Доставляемый компонент – функциональная часть (например, противоопухолевый препарат); линкер – гидрофобное соединительное звено.

Поглощение катионных липофильных соединений зависит не только от мембранного потенциала митохондрий, но также и от гидрофобности соединения. Внешняя митохондриальная мембрана проницаема для широкого спектра молекул с молекулярной массой ниже $\sim 5\text{--}10$ кДа, однако проникновение сквозь внутреннюю мембрану ограничено и представляет собой многоступенчатый процесс, кинетика которого зависит от физико-химических свойств нацеленного на митохондрию соединения. Например, некоторые гидрофильные соединения не могут быть эффективно доставлены в митохондрию даже при присоединении к таргетному лиганду. Тем не менее эта проблема может быть решена путем добавления гидрофобной алкильной группировки. Чем выше коэффициент распределения октанол/вода (гидрофильно-липофильный баланс соединения), тем

больше накопление вещества в матриксе митохондрий [18]. Если вещество, нацеленное на митохондрию, представлено слабой кислотой или основанием, следует ожидать воздействия протонирования/депротонирования на их поглощение. Было подсчитано, что депротонирование кислот способствует проникновению в митохондрии, а протонирование оснований оказывает противоположный эффект [18].

Трифенилфосфоний

Трифенилфосфоний (ТФФ) – широко известный, митохондриально нацеленный лиганд, представляющий собой гидрофобные фенильные кольца, присоединенные к четвертичному атому фосфора. Преимущества применения ТФФ включают относительно простую синтез и очистку, сочетание липофильных и гидрофильных свойств, а также низкую химическую реакционную способность. Это приводит к значительной эффективности использования ТФФ для терапии и профилактики онкологических заболеваний [19]. Алкилированные катионы трифенилфосфония изначально использовались в качестве зондов для изучения механизмов окислительного фосфорилирования и для определения потенциала митохондриальной мембраны. При использовании этого лиганда для нацеливания на митохондрии ТФФ-катионы присоединяют к разнообразным зондам, антиоксидантам и фармакофорам (рис. 4) [20–23]. В настоящее время с помощью данного подхода модифицируют противоопухолевые препараты и наночастицы-переносчики, чем улучшается их эффективность и снижается токсичность [24].

Синтез конъюгатов ТФФ обычно состоит из двух стадий: синтеза катионного соединения и его “сшивки” с функциональными фрагментами. На рис. 5 приведены химические структуры некоторых соединений на основе ТФФ, проявляющих противоопухолевую активность в различных экспериментах *in vitro* или *in vivo* [25].

1,1'-Декаметилен-бис-(4-аминохинальдиний-хлорид)

1,1'-Декаметилен-бис-(4-аминохинальдиний-хлорид) также известный как деквалиний (DQA) – это катионный болаамфифил, который состоит из двух фрагментов хинолиния, связанных друг с другом алкильной цепью из 10 атомов углерода. DQA уже более 60 лет применяется в качестве противоинфекционного препарата [26]. Он обладает селективностью к митохондриям, а также сродством к различным функциональным белкам, что может быть применено в противоопухолевой терапии, а также лечении бактериальных, вирусных, грибковых и паразитарных заболева-

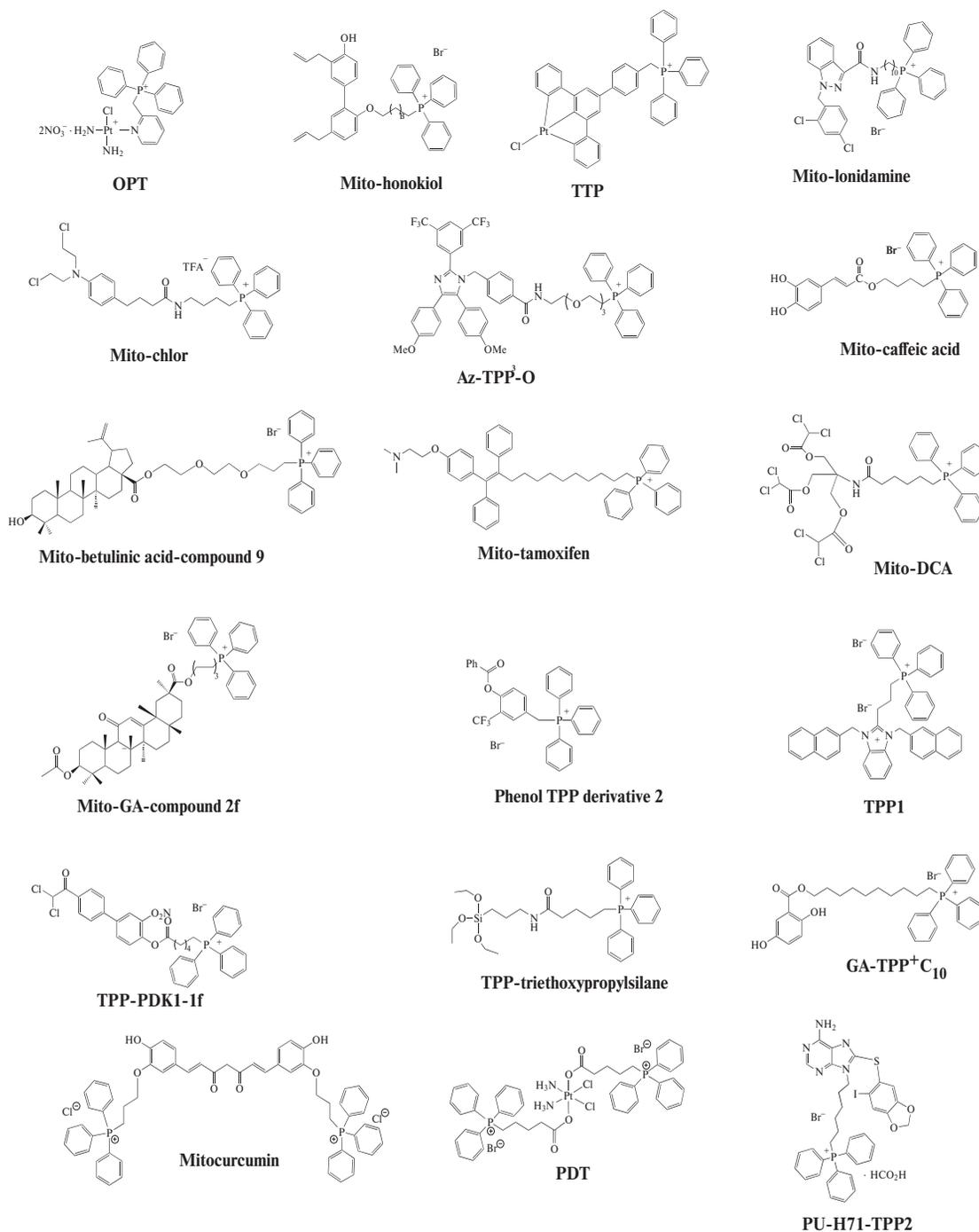


Рис. 5. Распространенные конъюгаты трифенилфосфония с противоопухолевой активностью [25].

ний [27]. В водном растворе молекулы DQA образуют везикулы, известные как DQA-сомы. Их используют для доставки низкомолекулярных молекул или ДНК в митохондрии [28]. Предложены системы доставки нуклеиновых кислот, включающие DQA: катионный липид 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP) и липид хелпер 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанол-амин (DOPE) – наносомы (рис. 6). Их стабиль-

ность, эффективность внутриклеточного поглощения и нацеливания на митохондрии опухолевых клеток оказались выше по сравнению с DQA-сомами [18].

Пептиды, проникающие в митохондрии

Пептиды, проникающие в митохондрии (Mitochondria-penetrating peptides, MPP), представляют

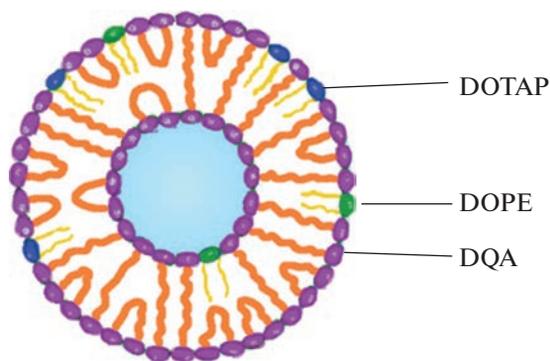
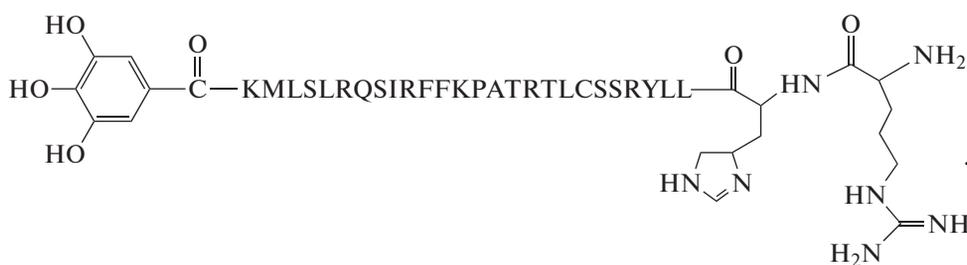


Рис. 6. Схематичное изображение наномомы, содержащей DQA, DOTAP и DOPE.

собой структуры с повторяющимися липофильными и катионными аминокислотными остатками. МРР демонстрируют эффективное накопление в митохондриях и обладают низкой токсичностью [29]. Широко известным представителем МРР является (*L*-циклогексилаланин-*D*-аргинин)₃ [30]. Другим примером митохондриально специфичных пептидов служат SS-пептиды (пептиды Сзето–Шиллера) [31]. Это небольшие антиоксидантные молекулы, способные проникать в клетки и накапливаться в митохондриях независимо от электрохимического потенциала (в отличие от остальных лигандов). Эффективность действия SS-пептидов зависит от способности прямо взаимодействовать с кардиолипином во внутренней мембране митохондрий [32]. Антиоксидантные свойства таких структур приписывают остаткам *L*-тирозина или диметил-*L*-тирозина, которые вступают в реакцию с АФК, нейтрализуя их и, тем самым, предотвращая окисление кардиолипина. Это, в свою очередь, ингибирует разрушение митохондрий, связанное с окислительным

стрессом. Одним из современных препаратов на основе SS-пептидов, который рассматривают в качестве подходящего кандидата для химиотерапии онкологических заболеваний, является SS-02-Doxil – липосомальный препарат с доxorубицином, одобренный управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) [33].

Пептид MTS-H₃R₉ может быть потенциальным митохондриальным средством доставки с улучшенной эффективностью селективного нацеливания на митохондрии. Также был получен его конъюгат с галловой кислотой (GA-MTS-H₃R₉) в качестве модельного препарата, который обладает противовоспалительной, антиоксидантной, противоопухолевой и антибактериальной активностью в результате сочетания положительно заряженных остатков *L*-гистидина и *L*-аргинина. Благодаря своим свойствам он широко используется в разработке лекарственных средств, продуктов питания, косметики и биомедицины [34].



GA-MTS-H₃R₉

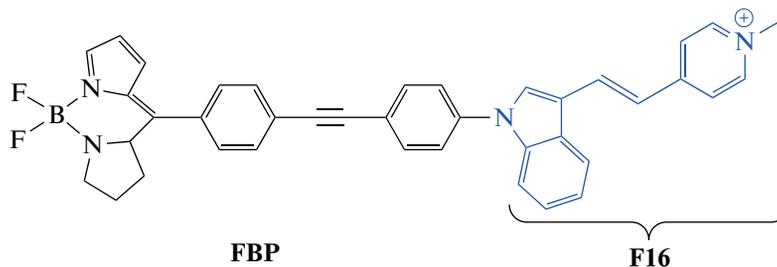
(*E*)-4-(1*H*-индол-3-илвинил)-*N*-метилпиридиния иодид

(*E*)-4-(1*H*-Индол-3-илвинил)-*N*-метилпиридиний (F16) представляет собой ДЛК, который, накапливаясь в митохондриальном матриксе, из-

меняет потенциал мембраны относительно его нормального уровня (потенциала покоя). В целом, накопление F16 в митохондриях подчиняется тому же механизму, что и в случае других ДЛК. Эта молекула способна вызывать нарушение метаболизма митохондрий путем деполяризации

мембраны, что в конечном итоге приводит к клеточной гибели. Однако в отличие от других агентов провоцирующих апоптоз F16 действует в митохондриях на стыке апоптотического и некротиче-

ского путей [35]. Также известно об антипролиферативных свойствах F16, выявленных на различных линиях клеток рака молочной железы мышей и человека [36, 37].



Синтезирован бифункциональный борсодержащий противоопухолевый агент FBP, включающий F16. Данное соединение оценено на активность в отношении опухолевых клеток *in vitro* и способность к визуализации органелл. Было показано, что оно избирательно накапливается в митохондриях и проявляет избирательную цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам, при этом наблюдаемые значения IC_{50} в 2–20 раз ниже, чем у нормальных клеток [38]. Авторы предположили, что FBP можно использовать в качестве бифункционального средства, обладающего избирательной противоопухолевой активностью, а также способностью к субклеточной визуализации. Визуализировать FBP и аналогичные конъюгаты с F16 возможно благодаря флуоресцентным свойствам F16, что было показано на клетках аденокарциномы MCF-7 и фибробластах [39].

и нерасщепляемые в условиях клетки линкеры. Расщепляемыми являются структуры, чувствительные к эндогенным химическим агентам. К ним относят молекулы, содержащие дисульфидные связи. Они демонстрируют оптимальный профиль транспорта и высвобождения терапевтической молекулы у целевого сайта [42]. К нерасщепляемым линкерам относят структуры содержащие, например, простые эфирные связи [43, 44]. Для их деградации необходимо наличие специфических ферментов, экспрессия которых может варьироваться в зависимости от типа клеток, окружающей среды и метаболического статуса, что может влиять на кинетику расщепления и делать ее непостоянной. Также большое распространение получили линкеры на основе амидных и сложных эфирных связей, гликолей, алифатических фрагментов и ароматических соединений [45, 46].

Родамины

Родамины могут служить лигандами для нацеливания на митохондрии благодаря своим липофильным и катионным свойствам. Родамины способны ингибировать ЭТЦ митохондрий. Наиболее часто применяют родамин 19 и родамин 123 для нарушения процесса окислительного фосфорилирования [40]. В качестве перспективного средства для лечения патологий головного мозга, связанных с окислительным стрессом, рассматривают додециловый эфир родамина 19 ($C_{12}R_1$) [41].

Линкеры, связывающие ДЛК и терапевтические молекулы

Структурный фрагмент, используемый для ковалентного связывания терапевтической молекулы и ДЛК — линкер — оказывает важное влияние на свойства конъюгата. На сегодняшний день используют различные типы линкеров. Так, синтезированы структуры, содержащие расщепляемые

СРЕДСТВА ДОСТАВКИ МОЛЕКУЛ В МИТОХОНДРИИ

Для эффективной доставки к митохондриям противоопухолевые препараты присоединяют непосредственно к лигандам через ковалентные связи или через промежуточное звено — спейсер. Кроме того, разрабатываются средства доставки лекарственных препаратов, конъюгированные с нацеленными на митохондрии лигандами и загруженными необходимыми терапевтическими молекулами (рис. 6). Использование подобных наночастиц (НЧ) позволяет преодолевать различные физико-химические препятствия (плохую растворимость в воде, низкую биодоступность), уменьшать нецелевую токсичность, дает возможность разработать терапевтические системы с пролонгированным высвобождением лекарства, что особенно важно для лечения онкологических заболеваний [3]. Наночастицы, нацеленные на митохондрии, должны быть тщательно спроектированы для достижения определенного про-

странственно-временного распределения внутри органеллы, необходимого для оптимального терапевтического эффекта. Противоопухолевые препараты, проходящие и уже прошедшие клинические испытания, в основном, представляют собой липосомы (например, Doxil, Vuxeos и Onivyde), биоразлагаемые полимерные мицеллы и дендримеры (например, NK105, Genexol и NC6004) или неорганические НЧ (NBTXR3 и NanoTherm). Большинство современных препаратов, содержащих наночастицы, вводятся внутривенно для системной доставки в опухоли, а некоторые лекарства (например, NanoTherm и NBTXR3) были разработаны для внутриопухолевого введения [10].

Липосомы

Липосомы – широко распространенные системы доставки лекарств, которые представляют собой сферические везикулы, имеющие по меньшей мере один липидный бислой. Липосомы получили массовое признание благодаря их превосходной биосовместимости и биоразлагаемости, простому получению и способности инкапсулировать как гидрофильные, так и липофильные молекулы [47, 48]. Липосомы используются для повышения эффективности лекарств и специфичности к опухоли, а также снижения побочной токсичности. На данный момент существует более десятка липосомальных препаратов, одобренных для клинического использования управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) или Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA), и многие препараты проходят клинические испытания [49].

Разработаны фuzогенные липосомы Mito-Porter, способные переносить в митохондрии различные объекты: терапевтические соединения, углеводы, пептиды, нуклеиновые кислоты, золотые наночастицы [50, 51]. Наиболее эффективные транспортные системы имеют следующий липидный состав: 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанламин (DOPE)/сфингомиелин (SM)/стеарил-октааргинин (STR-R8) (9 : 2 : 1, мольное соотношение) или DOPE/фосфатидная кислота (PA)/STR-R8 (9 : 2 : 1, мольное соотношение) [52]. Этот особый тип липосом может доставлять препараты в митохондрии, взаимодействуя с их мембраной. Высокая концентрация STR-R8 позволяет липосомам проникать в клетки путем микропиноцитоза. Mito-Porter успешно связываются как с внешней, так и с внутренней митохондриальными мембранами. Кроме того, их можно специфично нацеливать на митохондриальный ген [53].

Синтезированы и исследованы pH-чувствительные многофункциональные липосомы Lip-

STPP, загруженные доксорубицином (DOX) и лонидамином (LND). Они содержат две группы из *n*-гидроксibenзойной кислоты и трифенилфосфония для нацеливания на митохондрии. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что Lip-STPP способствует значительному синергическому эффекту DOX и LND при глиоме, ингибируя пролиферацию опухолевых клеток. Эти липосомы способствуют апоптозу и некрозу, ингибируют миграцию и инвазию клеток глиомы, а также метастазирование опухоли, нарушают функции митохондрий, таким образом продлевая время жизни пациента [54].

Сконструирована митохондриально-направленная липосомальная система (*L-G₂R-DA*), способная переносить фотосенсибилизатор индоцианиновый зеленый (ICG), поражающая митохондрии опухолевых клеток при фотодинамической терапии рака (ФДТ) [55]. Носитель состоит из четырех компонентов: дендритных липопептидов (*L-G₂R*) (рис. 7а), соевого фосфатидилхолина, холестерина и полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтанолamina (*DSPE-PEG2000*). Для повышения процента накопления в опухоли и снижения поглощения нормальными тканями к остаткам *L*-аргинина была присоединена 2,3-диметилмалеиновая кислота (*DA*), которая удаляется из *L-G₂R-DA* в кислом микроокружении опухоли (рис. 7б).

В целом, система ICG/*L-G₂R-DA* предлагает следующие преимущества в терапии раковых опухолей: (1) транспортная система долго циркулирует в кровотоке, не захватываясь ретикулоэндотелиальной системой, что увеличивает ее накопление в пораженной ткани; (2) pH-зависимое переключение поверхностного заряда для обеспечения субклеточного нацеливания на митохондрии после интернализации в опухолевых клетках; и (3) высокая полезная нагрузка агентами ФДТ, доставляемых в митохондрии [56].

Керасомы

Керасомы представляют собой гибридные органо-неорганические наночастицы (НЧ), которые можно рассматривать как липосомы с достаточно прочной силиконовой оболочкой, способные к транспорту активных веществ [57, 58]. Разработан общий метод синтеза для изготовления модифицированных с помощью ТФФ липосомальных керасом, которые можно применять в качестве наноносителей для митохондриально-направленных терапевтических средств с использованием DOX в качестве модельного лекарства. Керасомы были получены путем самосборки и золь-гель реакции амфифильных органотриалкоксисиланов с образованием двухслойных везикул, покрытых силикатной поверхностью, к кото-

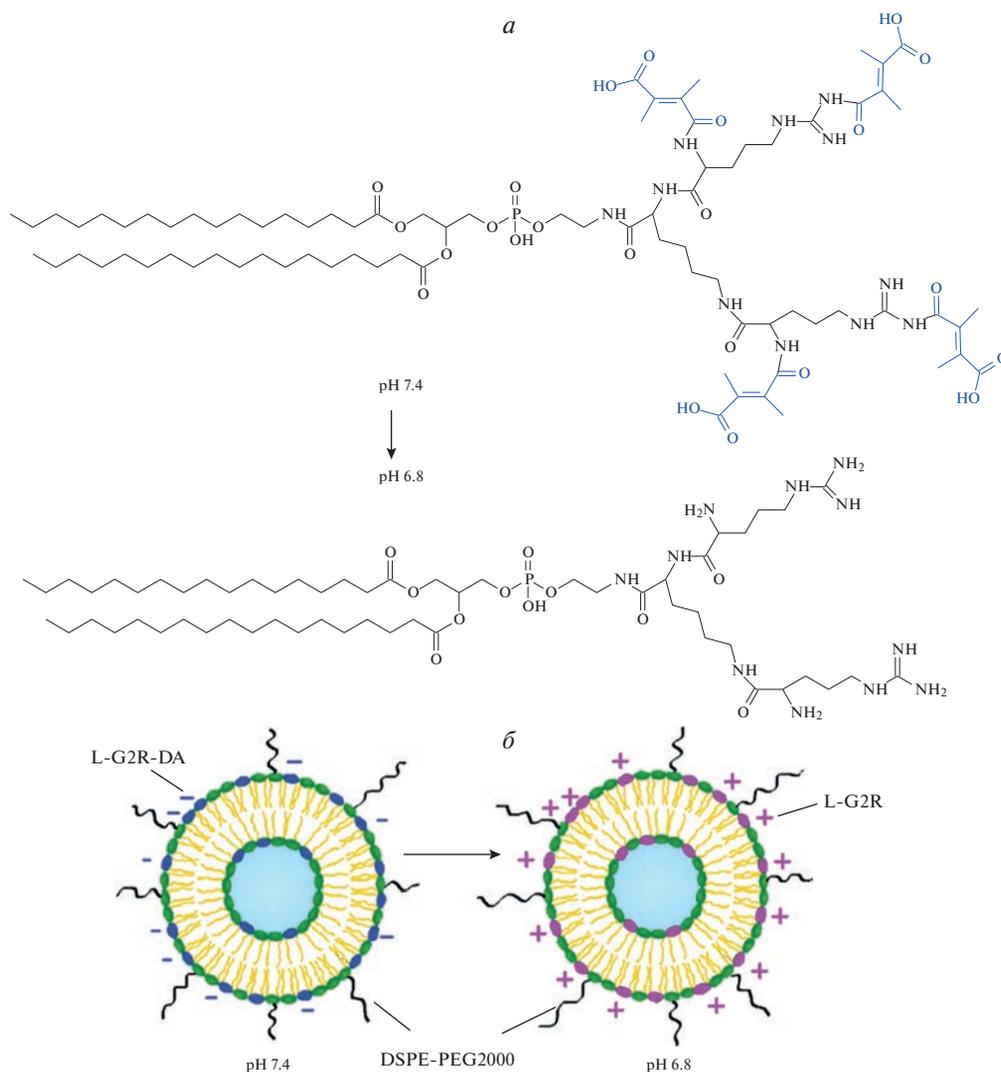


Рис. 7. Структура дендритного липида L-G2R-DA при разных значениях pH среды (а) и схематическое изображение митохондриально-направленной липосомы (б).

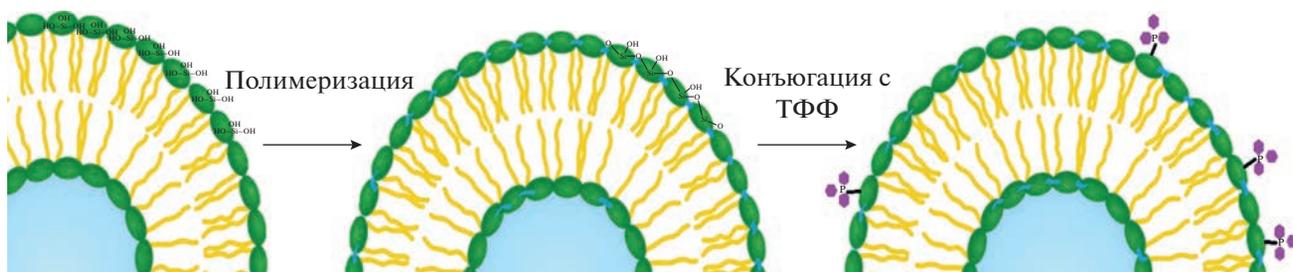


Рис. 8. Формирование и модификация керасом.

рой затем присоединили фрагмент направленно-го действия аминопропилсилоксан- ТФФ (рис. 8).

Керасомы продемонстрировали высокую стабильность, биосовместимость и способность к замедленному высвобождению активного вещества в течение 24 ч при 37°C. Показано повышенное накопление DOX модифицированных ТФФ в ми-

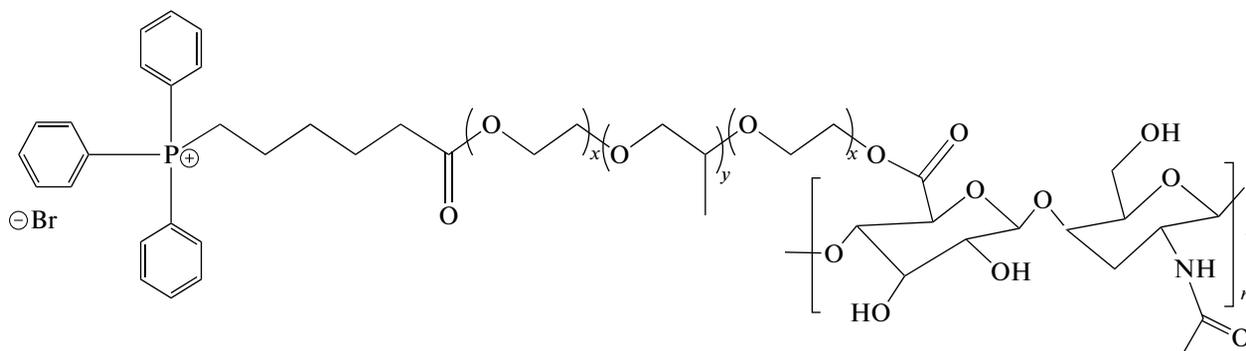
тохондриях по сравнению с не векторными CER-DOX [59].

Полимерные наночастицы

Полимерные НЧ получают из биоразлагаемых полимеров, таких как полигликолевая кислота,

полимолочная кислота, поликапролактон или полимолочно-ко-гликолевая кислота (PLGA) и многих других. Известно, что конъюгированные с фолиевой кислотой и ТФФ полиглицеринадипинатовые наночастицы могут двукратно увеличивать активность противоопухолевых препаратов [60]. Система двойного назначения из полилактид-полиэтиленгликоль-2-(3-((S)-5-амино-1- карбокси-ипентил)-уреидо) пентандиоата и трифенилфосфония (PLA-PEG-ACU-

РА/ТРР) позволяет совместно доставлять противоопухолевые препараты ингенол-3-ангелат и доксорубин для лечения рака предстательной железы [61]. Такие наномедицинские препараты могут связываться с простатическим специфическим мембранным антигеном (ПСМА), активируя сильный противоопухолевый иммунный ответ, ингибируя рост опухоли как *in vitro*, так и *in vivo*.



TPP-F127-GA

Синтезировано производное плюроника F127 и гиалуроновой кислоты (GA), образующее в воде полимерные мицеллы, нацеленные на митохондрии, для доставки паклитакселя в клетки рака легкого. Такая система продемонстрировала высокую противоопухолевую эффективность комплекса *in vitro* и *in vivo* в сочетании с низкой токсичностью по отношению к здоровым тканям [62].

Разработана мицеллярная система (GA-ТРР), нацеленная на митохондрии, состоящая из конъюгата трифенилфосфина, полиэтиленгликоля и поликапролактона, для направленной доставки гамбогиновой кислоты. Показано, что полученные мицеллы обеспечивают высокую загрузку лекарственного средства, сохраняют стабильность и четко определенную сферическую форму. GA-ТРР индуцирует апоптоз опухолевых клеток, ингибируя экспрессию белков, связанных с апоптозом, и стимулирует активность каспаз 3, 7 и 9.

Продemonстрировано повышенное накопление лекарственного средства в митохондриях, вызывающее снижение их мембранного потенциала и высвобождение цитохрома С. Таким образом, мицеллярная система GA-ТРР может стать многообещающей стратегией лечения рака легких путем индукции апоптоза через митохондриальный сигнальный путь [63].

Дендримеры

Дендримеры представляют собой наноразмерные сверхразветвленные молекулы, состоящие из

трех слоев полимеров: центрального ядра, разветвленного слоя и концевой функциональной группы (короны). Дендримеры могут имитировать определенные свойства мицелл и липосом, что делает их пригодными для доставки лекарств [64].

Разработана и синтезирована система на основе дендримеров, внешний слой которых модифицирован 3-карбоксыпропилтрифенилфосфония бромидом (СТРР) для нацеливания на митохондрии – UCNPs@G4/Ce6/CAT-СТРР. Она может преобразовывать ближний инфракрасный свет в видимый, тем самым индуцируя выработку цитотоксических АФК. Возможность загружать в нее гидрофобный фотосенсибилизатор хлорин е6 (Ce6) и гидрофильную каталазу (CAT) делает ее привлекательной для усиления эффекта ФДТ [65].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание средств доставки противоопухолевых препаратов в митохондрии является перспективным направлением на пути к появлению новых эффективных лекарственных средств. Более 40 лет де локализованные липофильные катионы исследуют в качестве молекул, способных накапливаться в митохондриях опухолевых клеток [66, 67]. С тех пор описано, разработано и синтезировано множество молекул, селективно направленных на данную органеллу. Многие из этих соединений демонстрируют значительный противоопухолевый эффект в экспериментах *in vitro*. Несмотря

ря на известные достоинства, не во многих исследованиях изучалась активность ДЛК *in vivo* и их эффективность в клинических испытаниях. В будущем все еще предстоит выяснить, как подобные вещества действуют в условиях функционирующей иммунной системы. Поскольку данное направление стремительно развивается, а большое количество многообещающих кандидатов находится в разработке, можно предположить успешное внедрение в клиническую практику новых лекарственных препаратов на основе некоторых из них.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reichert A.S., Neupert W. 2004. Mitochondriomics or what makes us breathe. *Trends in genetics*. **20** (11), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.08.012>
2. Cho H., Cho Y.Y., Shim M.S., Lee J.Y., Lee H.S., Kang H.C. 2020. Mitochondria-targeted drug delivery in cancers. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1866** (8), 165808. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165808>
3. Buchke S., Sharma M., Bora A., Relekar M., Bhanu P., Kumar J. 2022. Mitochondria-targeted, nanoparticle-based drug-delivery systems: Therapeutics for mitochondrial disorders. *Life (Basel)*. **12** (5), 657. <https://doi.org/10.3390/life12050657>
4. Nelson D.L., Cox M.M. 2021. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Bloomsbury Academic. 1260 p.
5. Рем К.-Г., Кельман Я. 2021. *Наглядная биохимия*. М.: Бином, Лаборатория знаний. 512 с.
6. Bleck C.K.E., Kim, Y., Willingham, T.B., Glancy, B. 2018. Subcellular connectomic analyses of energy networks in striated muscle. *Nat. Commun.* **9**, 5111.
7. Valente A.J., Fonseca J., Moradi F., Foran G., Necaikov A., Stuart J.A. 2019. Quantification of mitochondrial network characteristics in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1158**, 183–196. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8367-0_10
8. Белякович А.Г. 1990. *Изучение митохондрий и бактерий с помощью соли тетразолия п-НТФ*. ОНТИ НЦБИ АН СССР. 232 с.
9. Tait S.W., Green D.R. 2013. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5** (9), a008706. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008706>
10. S Allemailem K., Almatroudi A., Alsahli M.A., Aljaghwan A., M. El-Kady A., Rahmani A.H., Khan A.A. 2021. Novel strategies for disrupting cancer-cell functions with mitochondria-targeted antitumor drug-loaded nanoformulations. *Int. J. Nanomedicine*. **16**, 3907–3936. <https://doi.org/10.2147/IJN.S303832>
11. Dong L., Neuzil J. 2019. Targeting mitochondria as an anticancer strategy. *Cancer Commun. (Lond)*. **39** (1), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s40880-019-0412-6>
12. Reddy M.S., Bhattacharjee D., Jain N. 2022. Plk1 regulates mutant IDH1 enzyme activity and mutant IDH2 ubiquitination in mitosis. *Cell. Signalling*. **92**, 110279. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110279>
13. Hanaford A.R., Alt J., Rais R., Wang S.Z., Kaur H., Thorek D.L.J., Eberhart C.G., Slusher B.S., Martin A.M., Raabe E.H. 2019. Orally bioavailable glutamine antagonist prodrug JHU-083 penetrates mouse brain and suppresses the growth of MYC-driven medulloblastoma. *Transl. Oncol.* **12** (10), 1314–1322. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.05.013>
14. Li Q., Zhong X., Yao W., Yu J., Wang C., Li Z., Lai S., Qu F., Fu X., Huang X., Zhang D., Liu Y., Li H. 2022. Inhibitor of glutamine metabolism V9302 promotes ROS-induced autophagic degradation of B7H3 to enhance antitumor immunity. *J. Biol. Chem.* **298** (4), 101753. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101753>
15. Cao K., Riley J.S., Heilig R., Montes-Gómez A.E., Vringer E., Berthenet K., Cloix C., Elmasry Y., Spiller D.G., Ichim G., Campbell K.J., Gilmore A.P., Tait S.W.G. 2022. Mitochondrial dynamics regulate genome stability via control of caspase-dependent DNA damage. *Dev. Cell*. **57** (10), 1211–1225. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.03.019>
16. Forrest M.D. 2015. Why cancer cells have a more hyperpolarised mitochondrial membrane potential and emergent prospects for therapy. *BioRxiv*. **025197**. <https://doi.org/10.1101/025197>
17. Weiner-Gorzel K., Murphy M. 2021. Mitochondrial dynamics, a new therapeutic target for triple negative breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Reviews on Cancer*. **1875** (2), 188518. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188518>
18. Bae Y., Jung M.K., Song S.J., Green E.S., Lee S., Park H.S., Jeong S.H., Han J., Mun J.Y., Ko K.S., Choi J.S. 2017. Functional nanosome for enhanced mitochondria-targeted gene delivery and expression. *Mitochondrion*. **37**, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.06.005>
19. Zielonka J., Joseph J., Sikora A., Hardy M., Ouari O., Vasquez-Vivar J., Cheng G., Lopez M., Kalyanaraman B. 2017. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications. *Chem. Rev.* **117** (15), 10043–10120. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>
20. Murphy M.P. 1997. Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. *Trends Biotech.* **15** (8), 326–330. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01068-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01068-8)
21. Burns R.J., Smith R.A.J., Murphy M.P. 1995. Synthesis and characterization of thiobutyltriphenylphosphonium bromide, a novel thiol reagent targeted to the mitochondrial matrix. *Arch. Biochem. Biophys.* **322** (1),

- 60–68.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1436>
22. Burns R.J., Murphy M.P. 1997. Labeling of mitochondrial proteins in living cells by the thiol probe thiobutyl-triphenylphosphonium bromide. *Arch. Biochem. Biophys.* **339** (1), 33–39.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9861>
 23. Smith R.A., Porteous C.M., Gane A.M., Murphy M.P. 2003. Delivery of bioactive molecules to mitochondria *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **100** (9), 5407–5412.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0931245100>
 24. Su Y., Tu Y., Lin H., Wang M.M., Zhang G.D., Yang J., Liu H.K., Su Z. 2022. Mitochondria-targeted Pt (IV) prodrugs conjugated with an aggregation-induced emission luminogen against breast cancer cells by dual modulation of apoptosis and autophagy inhibition. *J. Inorg. Biochem.* **226**, 111653.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111653>
 25. Huang M., Myers C.R., Wang Y., You M. 2021. Mitochondria as a novel target for cancer chemoprevention: Emergence of mitochondrial-targeting agents. *Cancer Prev. Res.* **14** (3), 285–306.
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-20-0425>
 26. Bailly C. 2021. Medicinal applications and molecular targets of dequalinium chloride. *Biochem. Pharmacol.* **186**, 114467.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114467>
 27. Shi M., Zhang J., Li X., Pan S., Li J., Yang C., Hu H., Qiao M., Chen D., Zhao X. 2018. Mitochondria-targeted delivery of doxorubicin to enhance antitumor activity with HER-2 peptide-mediated multifunctional pH-sensitive DQAsomes. *Int. J. Nanomedicine.* **13**, 4209–4226.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S163858>
 28. Bailly C. 2021. Medicinal applications and molecular targets of dequalinium chloride. *Biochem. Pharmacol.* **186**, 114467.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114467>
 29. Mallick S., Thuy L.T., Lee S., Park J.I., Choi J.S. 2018. Liposomes containing cholesterol and mitochondria-penetrating peptide (MPP) for targeted delivery of antimycin A to A549 cells. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* **161**, 356–364.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.052>
 30. Somsri S., Mungthin M., Klubthawee N., Adisakwatana P., Hanpithakpong W., Aunpad R.A. 2021. Mitochondria-penetrating peptide exerts potent anti-plasmodium activity and localizes at parasites' mitochondria. *Antibiotics (Basel).* **10** (12), 1560.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10121560>
 31. Szeto H.H. 2006. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. *The AAPS J.* **8** (2), E277–E283.
<https://doi.org/10.1007/BF02854898>
 32. Szeto H.H., Schiller P.W. 2011. Novel therapies targeting inner mitochondrial membrane—from discovery to clinical development. *Pharm Res.* **28** (11), 2669–2679.
<https://doi.org/10.1007/s11095-011-0476-8>
 33. Haftcheshmeh S.M., Jaafari M.R., Mashreghi M., Mehrabian A., Alavizadeh S.H., Zamani P., Zarqi J., Darvishi M.H., Gheybi F. 2021. Liposomal doxorubicin targeting mitochondria: A novel formulation to enhance anti-tumor effects of Doxil® *in vitro* and *in vivo*. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **62**, 102351.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102351>
 34. Bae Y., Kim G., Jessa F., Ko K.S., Han J. 2022. Gallic acid-mitochondria targeting sequence-H3R9 induces mitochondria-targeted cytoprotection. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **26**, 15–24.
<https://doi.org/10.4196/kjpp.2022.26.1.15>
 35. Tee T.T., Cheah Y.H., Hawariah L.P. 2007. F16, a fraction from *Eurycoma longifolia* jack extract, induces apoptosis via a caspase-9-independent manner in MCF-7 cells. *Anticancer Res.* **27** (5A), 3425–3430.
 36. Dubinin M.V., Semenova A.A., Nedopekina D.A., Davletshin E.V., Spivak A.Y., Belosludtsev K.N. 2021. Effect of F16-betulin conjugate on mitochondrial membranes and its role in cell death initiation. *Membranes.* **11** (5), 352.
<https://doi.org/10.3390/membranes11050352>
 37. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., Penkov N.V., Nedopekina D.A., Sharapov V.A., Khoro-shavina E.I., Davletshin E.V., Belosludtseva N.V., Spivak A.Y., Belosludtsev K.N. 2021. Mitochondria-targeted prooxidant effects of betulinic acid conjugated with delocalized lipophilic cation F16. *Free Radic. Biol. Med.* **168**, 55–69.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.036>
 38. Watley R.L., Awuah S.G., Bio M., Cantu R., Gobeze H.B., Nesterov V.N., Das S.K., D'Souza F., You Y. 2015. Dual functioning thieno-pyrrole fused BODIPY dyes for NIR optical imaging and photodynamic therapy: Singlet oxygen generation without heavy halogen atom assistance. *Chem. Asian J.* **10**, 1335–1343.
<https://doi.org/10.1002/asia.201500140>
 39. Belosludtsev K.N., Ilzorkina A.I., Belosludtseva N.V., Sharapov V.A., Penkov N.V., Serov D.A., Karagyaur M.N., Nedopekina D.A., Davletshin E.V., Solovieva M.E., Spivak A.Y., Kuzmina U.S., Vakhitova Y.V., Akatov V.S., Dubinin M.V. 2022. Comparative study of cytotoxic and membranotropic properties of betulinic acid-F16 conjugate on breast adenocarcinoma cells (MCF-7) and primary human fibroblasts. *Biomedicines.* **10** (11), 2903.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10112903>
 40. Zhang D., Wen L., Huang R., Wang H., Hu X., Xing D. 2018. Mitochondrial specific photodynamic therapy by rare-earth nanoparticles mediated near-infrared graphene quantum dots. *Biomaterials.* **153**, 14–26.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.034>
 41. Khailova L.S., Silachev D.N., Rokitskaya T.I., Avetisyan A.V., Lyamsaev K.G., Severina I.I., Il'yasova T.M., Gulyaev M.V., Dedukhova V.I., Trendeleva T.A., Plotnikov E.Y., Zvyagilskaya R.A., Chernyak B.V., Zorov D.B., Antonenko Y.N., Skulachev V.P. 2014. A short-chain alkyl derivative of Rhodamine 19 acts as a mild uncoupler of mitochondria and a neuroprotector. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA) – Bioenerget.* **1837** (10), 1739–1747.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.07.006>
 42. Lei E.K., Kelley S.O. 2017. Delivery and release of small-molecule probes in mitochondria using traceless linkers. *J. Amer. Chem. Soc.* **139** (28), 9455–9458.
<https://doi.org/10.1021/jacs.7b04415>

43. Ripcke J., Zarse K., Ristow M., Birringer M. 2009. Small-molecule targeting of the mitochondrial compartment with an endogenously cleaved reversible tag. *ChemBioChem*. **10**(10), 1689–1696. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900159>
44. Pathak R.K., Marrache S., Harn D.A., Dhar S. 2014. Mito-DCA: A mitochondria targeted molecular scaffold for efficacious delivery of metabolic modulator dichloroacetate. *ACS Chem. Biol.* **9** (5), 1178–1187. <https://doi.org/10.1021/cb400944y>
45. Battogtokh G., Choi Y.S., Kang D.S., Park S.J., Shim M.S., Huh K.M., Kang H.C. 2018. Mitochondria-targeting drug conjugates for cytotoxic, anti-oxidizing and sensing purposes: current strategies and future perspectives. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. **8** (6), 862–880. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.05.006>
46. Dubinin M.V., Semenova A.A., Ilzorkina A.I., Penkov N.V., Nedopekina D.A., Sharapov V.A., Khoro-shavina E.I., Davletshin E.V., Belosludtseva N.V., Spivak A.Yu., Belosludtsev K.N. 2021. Mitochondria-targeted prooxidant effects of betulinic acid conjugated with delocalized lipophilic cation F1. *Free Radical Biol. and Medicine*. **168**, 55–69. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.036>
47. Mojarad-Jabali S., Farshbaf M., Walker P.R., Hemmati S., Fatahi Y., Zakeri-Milani P., Sarfraz M., Valizadeh H. 2021. An update on actively targeted liposomes in advanced drug delivery to glioma. *Int. J. Pharmaceutics*. **602**, 120645. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120645>
48. Turetskiy E.A., Koloskova O.O., Nosova A.S., Shilovskiy I.P., Sebyakin Y.L., Khaïtov M.R. 2017. Physicochemical properties of lipopeptide-based liposomes and their complexes with siRNA. *Biomed. Khim.* **63** (5), 472–475. Russian. <https://doi.org/10.18097/PBMC20176305472>
49. Liu P., Chen G., Zhang J. 2022. A review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules*. **27** (4), 1372. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>
50. Yamada Y., Akita H., Kamiya H., Kogure K., Yamamoto T., Shinohara Y., Yamashita K., Kobayashi H., Kikuchi H., Harashima H. 2008. MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes*. **1778** (2), 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.002>
51. Yamada Y., Nakamura K., Abe J., Hyodo M., Haga S., Ozaki M., Harashima H. 2015. Mitochondrial delivery of coenzyme Q10 via systemic administration using a MITO-Porter prevents ischemia/reperfusion injury in the mouse liver. *J. Control. Release*. **213**, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.037>
52. Yamada Y., Tabata M., Yasuzaki Y., Nomura M., Shibata A., Ibayashi Y., Taniguchi Y., Sasaki S., Harashima H. 2014. A nanocarrier system for the delivery of nucleic acids targeted to a pancreatic beta cell line. *Biomaterials*. **35** (24), 6430–6438. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.017>
53. Yamada Y., Maruyama M., Kita T., Usami S.I., Kitajiri S.I., Harashima H. 2020. The use of a MITO-Porter to deliver exogenous therapeutic RNA to a mitochondrial disease's cell with a A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene results in an increase in mitochondrial respiratory activity. *Mitochondrion*. **55**, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.09.008>
54. Lu J., Li R., Mu B., Peng Y., Zhao Y., Shi Y., Guo L., Hai L., Wu Y. 2022. Multiple targeted doxorubicin-liposomes modified with p-hydroxybenzoic acid and triphenylphosphonium to synergistically treat glioma. *Eur. J. Med. Chem.* **230**, 114093. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114093>
55. Thomas A.P., Lee A.J., Palanikumar L., Jana B., Kim K., Kim S., Ok H., Seol J., Kim D., Kang B.H., Ryu J.H. 2019. Mitochondrial heat shock protein-guided photodynamic therapy. *Chem. Commun. (Camb.)*. **55** (84), 12631–12634. <https://doi.org/10.1039/c9cc06411g>
56. Jiang L., Zhou S., Zhang X., Li C., Ji S., Mao H., Jiang X. 2021. Mitochondrion-specific dendritic lipopeptide liposomes for targeted sub-cellular delivery. *Nature Comm.* **12**, 2390. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22594-2>
57. Cao Z., Zhu W., Wang W., Zhang C., Xu M., Liu J., Feng S.T., Jiang Q., Xie X. 2014. Stable cerasomes for simultaneous drug delivery and magnetic resonance imaging. *Int. J. Nanomedicine*. **9**, 5103–5116. <https://doi.org/10.2147/IJN.S66919>
58. Gileva A., Sarychev G., Kondrya U., Mironova M., Sapach A., Selina O., Budanova U., Burov S., Sebyakin Y., Markvicheva E. 2019. Lipoamino acid-based cerasomes for doxorubicin delivery: Preparation and in vitro evaluation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **100**, 724–734. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.111>
59. Wang Y., Wang B., Liao H., Song X., Wu H., Wang H., Shen H., Ma X., Tan M. 2015. Liposomal nanohybrid cerasomes for mitochondria-targeted drug delivery. *J. Mater. Chem. B*. **3** (36), 7291–7299. <https://doi.org/10.1039/c5tb01197c>
60. Damrongrak K., Kloysawat K., Bunsupa S., Sakchasri K., Wongrakpanich A., Taresco V., Cuzzucoli Crucitti V., Garnett M.C., Suksiriworapong J. 2022. Delivery of acetogenin-enriched *Annona muricata* Linn leaf extract by folic acid-conjugated and triphenylphosphonium-conjugated poly (glycerol adipate) nanoparticles to enhance toxicity against ovarian cancer cells. *Int. J. Pharm.* **618**, 121636. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121636>
61. Wang Z., Sun C., Wu H., Xie J., Zhang T., Li Y., Xu X., Wang P., Wang C. 2021. Cascade targeting codelivery of ingenol-3-angelate and doxorubicin for enhancing cancer chemoimmunotherapy through synergistic effects in prostate cancer. *Mater. Today Bio*. **13**, 100189. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100189>
62. Wang H., Zhang F., Wen H., Shi W., Huang Q., Huang Y., Xie J., Li P., Chen J., Qin L., Zhou Y. 2020. Tumor- and mitochondria-targeted nanoparticles eradicate drug resistant lung cancer through mitochon-

- drial pathway of apoptosis. *J. Nanobiotechnol.* **18** (1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0562-3>
63. Xu Y., Wang S., Chan H.F., Liu Y., Li H., He C., Li Z., Chen M. 2017. Triphenylphosphonium-modified poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) micelles for mitochondria-targeted gambogic acid delivery. *Int. J. Pharm.* **522** (1–2), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.064>
64. Wang J., Li B., Qiu L., Qiao X., Yang H. 2022. Dendrimer-based drug delivery systems: History, challenges, and latest developments. *J. Biol. Eng.* **16** (1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13036-022-00298-5>
65. Liang S., Sun C., Yang P., Ma P., Huang S., Cheng Z., Yu X., Lin J. 2020. Core-shell structured upconversion nanocrystal-dendrimer composite as a carrier for mitochondria targeting and catalase enhanced anti-cancer photodynamic therapy. *Biomaterials.* **240**, 119850. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119850>
66. Johnson L.V., Walsh M.L., Chen L.B. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **77** (2), 990–994. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.2.990>
67. Summerhayes I.C., Lampidis T.J., Bernal S.D., Nadakavukaren J.J., Nadakavukaren K.K., Shepherd E.L., Chen L.B. 1982. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **79** (17), 5292–5296. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.17.5292>

Membrane-Active Mitochondria-Targeted Antitumor Agents and Drug Delivery Systems

A. P. Sadikov¹, Z. G. Denieva², U. A. Budanova^{1, *}, Yu. L. Sebyakin¹

¹MIREA – Russian Technology University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology), Moscow, 119571 Russia

²Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: c-221@yandex.ru

Mitochondria are “power stations” of cells. Without them the normal functioning of a living cell is impossible. This organelle is an attractive target for antitumor therapy because of the variety of processes in which mitochondria are involved and the differences between mitochondria in healthy and tumor cells. In this review, various approaches to the development of diagnostic and therapeutic agents selectively directed to the mitochondria of tumor cells are described. The main mitochondrial vector ligands, their conjugation with known antitumor drugs, as well as their combination with common drug delivery systems are described.

Keywords: mitochondria, nanoparticles, delocalized cations, anticancer agents

УДК 577.352

ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН НЕ МОЖЕТ БЫТЬ ОПИСАНА МОДЕЛЬЮ ПОСТОЯННОГО ЛИНЕЙНОГО НАТЯЖЕНИЯ КРОМКИ ПОРЫ

© 2023 г. П. К. Гифер^{a, b, *}, О. В. Батищев^a

^aИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Москва, 119071 Россия

^bМосковский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Московская обл., г. Долгопрудный, 141700 Россия

*e-mail: gifer.pk@phystech.edu

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 08.03.2023 г.

Принята к публикации 09.03.2023 г.

В работе был исследован процесс электропорации бислойных липидных мембран (БЛМ) из диолеоилфосфатидилхолина (ДОФХ). Экспериментально полученная зависимость среднего времени жизни от приложенного напряжения в диапазоне 200–375 мВ является немонотонной и не может быть описана в рамках классической теории электропорации. Эти результаты согласуются с современными моделями процесса образования сквозных проводящих пор в мембране, подразумевающими сложный профиль энергии поры и его зависимость от натяжения мембраны и внешнего электрического поля. Мы показали, что в рамках классической теории электропорации невозможно объяснить экспериментально наблюдаемые зависимости среднего времени жизни мембраны от приложенной разности потенциалов. Таким образом, теория требует дальнейших уточнений.

Ключевые слова: липидная мембрана, БЛМ, электропорация, линейное натяжение, диолеоилфосфатидилхолин, энергия поры

DOI: 10.31857/S0233475523040059, **EDN:** OJMPRP

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших функций клеточных мембран заключается в том, чтобы сохранять внутриклеточные пространства и саму клетку изолированными от внешней среды, обеспечивая при этом контролируемый обмен веществ. Несмотря на то, что биологические мембраны содержат значительное количество белков, основная структура, определяющая барьерную функцию, — это бислой амфифильных молекул липидов. Нарушение барьерной функции мембран является причиной развития многих патологий, так как происходит нарушение нормального гомеостаза клетки, приводящее в итоге к ее гибели. По этой причине вопрос регуляции проницаемости липидного бислоя клеточных мембран является предметом интенсивных исследований в этой области с применением теоретических, экспериментальных и вычислительных методов [1]. В результате проведенных исследований было выяснено, что проницаемость мембран может быть увеличена за счет образования в ней пор при приложении внешнего электрического поля. Такое явление получило название “электропорация”.

За последние десятилетия электропорация клеточных мембран стала основой многих биотехнологических (микробная инактивация, экстракция биомолекул) [2] и биомедицинских (электрохимиотерапия, трансфекция, слияние клеток) [3–5] приложений. Однако несмотря на широкое применение этого метода, в понимании механизма порообразования остается много белых пятен.

Формирование пор в мембранах — это сложный процесс перестроения молекул липидов. Образование любого проводящего дефекта приводит к контакту гидрофобных цепей липидов с водой, что энергетически невыгодно (межфазное натяжение на границе раздела декан/вода составляет примерно 60 мН/м). По этой причине липиды вынуждены деформироваться и поворачиваться на кромке поры, чтобы сделать ее гидрофильной.

Классическая теория порообразования описывает изменение свободной энергии мембраны при формировании в ней поры как [6]:

$$E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma, \quad (1)$$

где r — радиус поры, γ — линейное натяжение кромки поры (избыточная энергия липидного

материала на кромке поры, отнесенная к ее периметру), σ – латеральное натяжение мембраны. Максимум энергии находится в точке критического радиуса поры, который характеризуется как $r^* = \gamma/\sigma$. Поры с радиусом меньше критического могут залечиваться, в то время как поры с радиусом больше критического будут вызывать разрушение мембраны. В рамках такого подхода мембрана рассматривалась как бесконечно тонкая пленка, а структура липидов была неявно представлена параметром γ [6]. Тем не менее, в рамках данной модели удалось описать влияние липидов различной молекулярной формы на устойчивость мембран к формированию сквозных пор [7]. В рамках такой теории было невозможно прогнозировать то, как изменение, например, конформационной подвижности углеводородных цепей липидных молекул будет влиять на устойчивость мембраны к электропорации [8]. Начиная с 1988 года стали появляться различные теоретические работы, в которых были предприняты попытки явно учесть структуру липидного бислоя и упругие деформации мембраны в процессе формирования поры [9–12]. Так, было показано, что формирование поры начинается с образования гидрофобного дефекта в мембране [9], проникаемого только для воды, но не для ионов [12], который затем перестраивается в гидрофильную пору посредством деформаций монослоев мембраны. В работах [13–15] авторы впервые смогли построить полную траекторию процесса формирования поры в липидном бислое, от начала образования гидрофобного дефекта до расширения гидрофильной поры, в рамках теории упругости жидких кристаллов, адаптированной к липидным мембранам [16]. В результате было показано, что процесс образования поры в мембране сопряжен с преодолением двух энергетических барьеров, а линейное натяжение кромки поры оказывается в этом случае не фиксированным параметром, а сложной функцией радиуса и латерального натяжения мембраны. Получается, что значения линейного натяжения кромки поры, измеренные для одного и того же липида в разных экспериментальных системах, могут сильно различаться. Это предсказание согласуется с экспериментальными наблюдениями.

Экспериментально процесс контролируемого образования пор исследуется в различных модельных системах, которые имитируют липидный матрикс клеточных мембран: бислои липидные мембраны (БЛМ) с растворителем [17], без растворителя [18], гигантские однослойные везикулы (ГОВ) [19] и т.п. Эти работы показали, что в разных системах при одинаковых липидных составах значения γ непредсказуемо различаются. Так, авторы статьи [20] продемонстрировали, что значения γ для яичного лецитина могут находиться в диапазоне от 8.6 до 42 пН. По-видимому, это

связано с тем, что характерные размеры пор, для которых производится измерение линейного натяжения, отличаются в различных модельных системах.

О наличии разных характерных размеров пор свидетельствуют также эксперименты по электрослиянию клеток. Так, было показано, что сочетание наносекундных и микросекундных электрических импульсов высокого напряжения позволяет сначала создавать малые поры с радиусом порядка 1 нм, а затем расширять их до радиусов 60–70 нм [21]. Соответственно, если экспериментальные и теоретические исследования ведут к пониманию того, что пора в мембране представляет собой переход нескольких характерных структур друг в друга, а энергетический барьер имеет сложную форму, то остается вопрос, что именно характеризует линейное натяжение, определяемое в экспериментах как некая константа.

В данной работе мы исследовали процесс электропорации модельных бислоиных липидных мембран, сформированных из диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) по классической методике Мюллера–Рудина [22]. Полученная сложная зависимость среднего времени жизни мембран от приложенного напряжения может быть объяснена в рамках гипотезы о наличии двух энергетических барьеров на траектории формирования поры с радиусом выше критического. Мы проанализировали, каким образом такой вид энергетического профиля поры может повлиять на теоретическую модель, применяемую для описания получаемых данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бислоиные липидные мембраны формировались методом Мюллера–Рудина [22] из раствора 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ДОФХ, Avanti Polar Lipids, США) в декане концентрации 10 и 15 г/л (чистота $\geq 99\%$, Sigma, США) на отверстии в тефлоновой перегородке (диаметр $d = 0.8$ мм), разделяющей две полуячейки. Буферный раствор, которым заполняли полуячейки, содержал 100 мМ KCl (чистота $\geq 99.5\%$, Реахим, Россия) и 5 мМ HEPES (чистота $\geq 99\%$, Helicon, Россия) в бидистиллированной воде с pH 7.5. Для проведения электрических измерений и приложения к мембране внешнего электрического поля в каждую из полуячеек погружали Ag/AgCl-электроды. Процесс формирования мембраны контролировался по росту ее электрической емкости методом потенциодинамики [23]. Для этого треугольные импульсы напряжения подавались на БЛМ с генератора электрических сигналов (АКИП-3409/2, АО ПриСТ, Россия), а токовые отклики регистрировались через усилитель тока (Keithley, модель 428, США) и передавались на компьютер с помощью АЦП (Л-кард, модель L761, Россия). Процесс об-

разования мембраны и достижения необходимого значения электрической емкости контролировался с помощью осциллографа (АКИП-4115/1А, АО ПриСТ, Россия).

После формирования мембраны к ней прикладывали постоянное напряжение в диапазоне от 200 до 375 мВ до момента электрического пробоя, который регистрировался по резкому росту электрического тока через мембрану. В ходе трех серий экспериментов для каждого значения напряжения проводилось по 15-138 измерений времени жизни мембраны. Экспериментальные данные регистрировались с помощью программы LGraph (Л-кард, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно классической теории электропорации [24], зависимость свободной энергии поры от ее радиуса в присутствии внешнего электрического поля имеет следующий вид:

$$E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma - 0.5\pi C U^2 r^2, \quad (2)$$

где $C = \left(\frac{\epsilon_B}{\epsilon_M} - 1\right) C_{уд}$, ϵ_B – диэлектрическая проницаемость воды, ϵ_M – диэлектрическая проницаемость мембраны, $C_{уд}$ – удельная емкость мембраны, U – приложенное к мембране электрическое напряжение.

Соответственно, среднее время жизни мембраны определялось по закону:

$$\tau = \frac{(kT)^{3/2}}{4\pi c_0 A D \gamma \sqrt{\sigma + C_{уд} \left(\frac{\epsilon_B}{\epsilon_M} - 1\right) \frac{U^2}{2}}} \times \exp\left(\frac{\pi \gamma^2}{kT \left(\sigma + C_{уд} \left(\frac{\epsilon_B}{\epsilon_M} - 1\right) \frac{U^2}{2}\right)}\right), \quad (3)$$

где c_0 – средняя концентрация дефектов на единицу площади мембраны, A – площадь БЛМ, D – коэффициент диффузии пор в пространстве радиусов, k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура.

Плотность вероятности распределения времен жизни мембран $F(t)$ должна иметь вид:

$$F(t) = \frac{n}{\tau} \exp\left(\frac{-nt}{\tau}\right), \quad (4)$$

где n – число пор в мембране. В наших экспериментах для всех исследованных значений напряжения мы получили экспоненциальное распределение времен жизни мембраны, в точном соответствии с уравнением (4). Экспоненциальный вид распределения был оценен по критерию Пир-

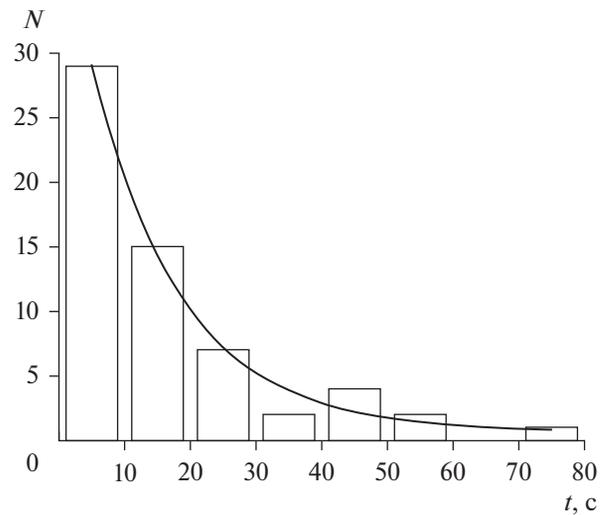


Рис. 1. Гистограмма распределения величин времени жизни мембраны из ДОФХ при трансмембранном напряжении, равном 200 мВ. Экспоненциальный вид распределения проверялся по критерию Пирсона, среднее время жизни мембраны определялось методом максимального правдоподобия, сплошная кривая дана для визуализации экспоненциального вида распределения.

сона, при этом необходимое число экспериментов для выполнения требуемого критерия составило от 15 до 138 при каждом значении напряжения U (суммарно 409 измерений). Этот результат хорошо согласуется с данными, полученными в работе [25]. Более того, мы показали, что наблюдаемое авторами работы отклонение от экспоненциального распределения в области малых времен жизни мембран может быть устранено путем учета конечного времени заряжения мембраны (около 30 мс в нашем случае) [17]. На рис. 1 представлен пример экспоненциального распределения времен жизни мембран для приложенного электрического напряжения 200 мВ. Среднее время жизни мембраны определялось по методу максимального правдоподобия. На рис. 2 показан график распределения среднего времени жизни мембраны от приложенной разности электрических потенциалов в диапазоне от 200 до 375 мВ, а также указаны доверительные интервалы 95% для каждой величины среднего времени жизни. Из представленного графика видно, что в промежутке напряжений от 250 до 275 мВ наблюдается излом зависимости, который не может быть описан уравнением (3). Попытка аппроксимации экспериментальных данных этим уравнением дает величину $R^2 = 0.9786$, при этом видно, что значения в области 250–275 мВ даже с учетом погрешности определения среднего времени жизни не попадают на кривую аппроксимации. Можно предположить, что экспериментально наблюдаемое явление связано с проявлением электрострикции

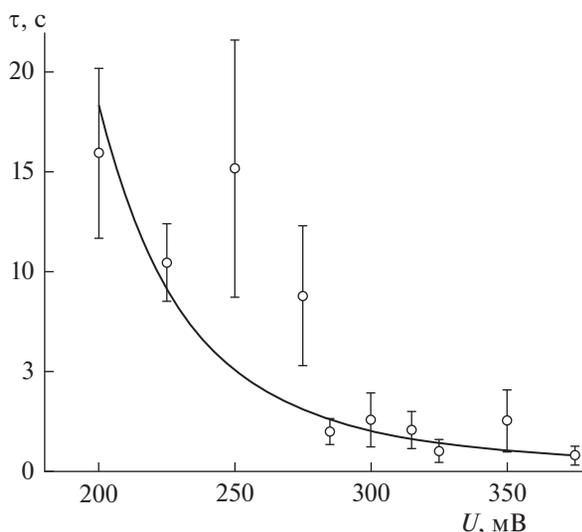


Рис. 2. Зависимость времени жизни мембран из ДОФХ от приложенного напряжения в диапазоне напряжений от 200 до 375 мВ. Каждая точка представляет собой среднее время жизни мембраны при данном значении напряжения, определенное по методу максимального правдоподобия. Для каждой точки на графике указан доверительный интервал 95%. Черная кривая – результат аппроксимации экспериментальных данных уравнением (3) с фиксированными параметрами $\sigma = 1.4$ мН/м и $C_{уд} = 0.27$ мкФ/см² и параметрами аппроксимации $\gamma = 5.4 \pm 1.4$ пН, $c_0AD = (3.4 \pm 0.5) \times 10^{-19}$ м²/с, найденными методом наименьших квадратов с $R^2 = 0.9786$.

мембраны во внешнем электрическом поле [26]. Однако, как указано в работе [26], коэффициент электрострикции для мембран, сформированных по методу Мюллера–Рудина из раствора липидов в декане, составляет примерно 1 В^{-2} . Таким образом, при изменении приложенного к мембране напряжения с 250 до 275 мВ мы будем наблюдать изменение ее электрической емкости менее чем на 1%, что вряд ли может привести к наблюдаемому в эксперименте росту среднего времени жизни мембраны почти в 4 раза.

Вид зависимости среднего времени жизни от напряжения (уравнение 3) был получен в работе [27] и опирается на результат, полученный в [28] при рассмотрении кинетики роста дефекта в мембране в предположении о том, что данную кинетику можно описывать некоторым случайным блужданием (диффузией) в пространстве радиусов дефектов (пор). Данное выражение для величины среднего времени жизни мембраны (уравнение 3) получается только при квадратичной зависимости энергии поры от ее радиуса (уравнение 2). Выражение для $\tau(U)$ представлено в виде произведения экспоненциального множителя (который в основном порядке и определяет вид кривой на рис. 2) и некоторого медленно меняющегося предэкспоненциального параметра перед ним.

Такой вид зависимости эквивалентен уравнению Аррениуса для кинетики химической реакции, т.е. возникает ввиду наличия энергетического барьера при переходе поры из состояния с $r = 0$ в состояние с $r = +\infty$. Однако в работах [13–15] было показано, что зависимость энергии проводящего дефекта E от его радиуса r не является квадратичной, а имеет два выраженных максимума при некоторых радиусах $r = r_1$ и $r = r_2$, $r_1 < r_2$. В обычных условиях (при $U = 0$) $E(r_2) > E(r_1)$, что говорит о том, что основной экспоненциальный вклад в среднее время жизни мембраны определяется энергетическим барьером при $r = r_2$. При приложении внешнего электрического напряжения U положение точек максимумов r_1 и r_2 смещается, а соответствующие энергии $E(r_1)$, $E(r_2)$ уменьшаются. Уменьшение этих энергий приводит к уменьшению времени жизни мембраны. Важно отметить, что поскольку $r_1 < r_2$, то энергия $E(r_2)$ с ростом напряжения уменьшается быстрее, чем $E(r_1)$, т.е. при некотором напряжении U^* будет выполняться, что $E(r_2) = E(r_1)$, и при $U > U^*$ энергия $E(r_1)$ будет определять время жизни мембраны [15]. Таким образом, можно ожидать, что зависимость времени жизни от напряжения будет иметь излом при $U \approx U^*$. В работе [15] в рамках теории упругости жидких кристаллов, адаптированной к липидным мембранам, для используемого в работе липида ДОФХ были произведены расчеты величин энергетических барьеров в зависимости от приложенной разности электрических потенциалов. Эти расчеты показали, что второй барьер (при $r = r_2$) исчезает при напряжении выше 200 мВ, что почти количественно совпадает с наблюдаемой в наших экспериментах областью излома на кривой зависимости среднего времени жизни мембраны от приложенного электрического напряжения.

Таким образом, можно сказать, что в диапазоне напряжений до и после 250–275 мВ значения времени жизни соответствуют разным величинам энергетических барьеров и потому не могут быть описаны единым параметром линейного натяжения кромки поры. В работах [14, 15] было показано, что линейное натяжение кромки поры не является константой, а представляет собой сложную немонотонную функцию радиуса поры и латерального натяжения. В этой связи приближение экспериментальной зависимости времени жизни мембраны от приложенного напряжения, представленной на рис. 2, даже двумя кривыми аппроксимации, описываемыми уравнением (3), с постоянными значениями линейного натяжения, теряет смысл, так как мы говорим о более сложном характере поведения системы, чем предсказанный классической теорией электропорации [24]. Кроме того, значительный разброс значений линейного натяжения, полученных различными мето-

дами в предположении о постоянстве этой величины [20], также подтверждает наш тезис о том, что линейное натяжение кромки поры является сложной функцией радиуса поры и характеристик экспериментальной системы, таких как латеральное натяжение мембраны, приложенная разность электрических потенциалов и т.д. Следовательно, классическая теория в принципе не может описать процесс формирования пор в мембранах вследствие сложной формы зависимости энергии поры от радиуса и, в частности, наличия двух энергетических барьеров в этом процессе. Для адекватного описания порации требуется построение модели, детально учитывающей весь энергетический профиль системы, а не один лишь эффективный постоянный параметр – линейное натяжение кромки поры – характеризующий его.

Благодарности. Авторы выражают благодарность С.А. Акимову и О.В. Кондрашову за помощь в осмыслении теоретической стороны работы.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям (проект “УМНИК-МФТИ-2021”, договор № 17386ГУ/2022).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cunill-Semanat E., Salgado J. 2019. Spontaneous and stress-induced pore formation in membranes: Theory, experiments and simulations. *J. Membrane Biol.* **252**, 241–260.
- Yarmush M.L., Golberg A., Serša G., Kotnik T., Miklavčič D. 2014. Electroporation-based technologies for medicine: Principles, applications, and challenges. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **16**, 295–320.
- Golberg A., Sack M., Teissie J., Pataro G., Pliquett U., Saulis G., Stefan T., Miklavčič D., Vorobiev E., Frey W. 2016. Energy-efficient biomass processing with pulsed electric fields for bioeconomy and sustainable development. *Biotechnol. Biofuels.* **9**, 94.
- Kotnik T., Frey W., Sack M., Haberl Meglič S., Peterka M., Miklavčič D. 2015. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **33**, 480–488.
- Mahnič-Kalamiza S., Vorobiev E., Miklavčič D. 2014. Electroporation in food processing and biorefinery. *J. Membrane Biol.* **247**, 1279–1304.
- Derjaguin B.V. 1989. *Theory of stability of colloids and thin films*. New York, US: Springer, p. 258.
- Молотковский Р.Ю., Акимов С.А. 2009. Расчет линейного натяжения в различных моделях кромки поры в липидном бислое. *Биол. мембраны.* **26**, 149–158.
- Batishchev O.V., Alekseeva A.S., Tretiakova D.S., Galimzyanov T.R., Chernyadyev A.Yu., Onishchenko N.R., Volynsky P.E., Boldyrev I.A. 2020. Cyclopentane rings in hydrophobic chains of a phospholipid enhance the bilayer stability to electric breakdown. *Soft Matter.* **16**, 3216–3223.
- Glaser R.W., Leikin S.L., Chernomordik L.V., Pastushenko V.F., Sokirko A.I. 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: Formation and evolution of pores. *Biochim. Biophys. Acta.* **940**, 275–287.
- May S. 2000. A molecular model for the line tension of lipid membranes. *Eur. Phys. J.* **3**, 37–44.
- Bennett W.F.D., Sapay N., Tieleman D.P. 2014. Atomistic simulations of pore formation and closure in lipid bilayers. *Biophys. J.* **106**, 210–219.
- Awasthi N., Hub J.S. 2016. Simulations of pore formation in lipid membranes: Reaction coordinates, convergence, hysteresis, and finite-size effects. *J. Chem. Theory Comput.* **12**, 3261–3269.
- Akimov S.A., Mukovozov A.A., Voronina G.F., Chizmadzhev Yu.A., Batishchev O.V. 2014. Line tension and structure of through pore edge in lipid bilayer. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A.* **8**, 297–303.
- Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane I: Continuous reversible trajectory from intact bilayer through hydrophobic defect to transversal pore. *Sci. Rep.* **7**, 12152.
- Akimov S.A., Volynsky P.E., Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2017. Pore formation in lipid membrane II: Energy landscape under external stress. *Sci. Rep.* **7**, 12509.
- Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. B.* **6**, 519–528.
- Панов П.В., Акимов С.А., Батищев О.В. 2014. Изопреноидные цепи липидов повышают устойчивость мембран к формированию сквозных пор. *Биол. Мембраны.* **31**, 331–335.
- Batishchev O.V., Indenbom A.V. 2008. Alkylated glass partition allows formation of solvent-free lipid bilayer by Montal–Mueller technique. *Bioelectrochem.* **74**, 22–25.
- Karal M.A.S., Ahamed Md.K., Rahman M., Ahmed M., Shakil Md.M., Siddique-e-Rabbani K. 2019. Effects of electrically-induced constant tension on giant unilamellar vesicles using irreversible electroporation. *Eur. Biophys. J.* **48**, 731–741.
- Portet T., Dimova R. 2010. A new method for measuring edge tensions and stability of lipid bilayers: Effect of membrane composition. *Biophys. J.* **99**, 3264–3273.
- Wu M., Ke Q., Bi J., Li X., Huang S., Liu Z., Ge L. 2022. Substantially improved electrofusion efficiency of hybridoma cells: Based on the combination of nano-

- second and microsecond pulses. *Bioengineering (Basel)*. **9**, 450.
22. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. 1963. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **67**, 534–535.
 23. Абидор И.Г., Айтьян С.Х., Черномордик Л.В., Черный В.В., Чизмаджев Ю.А. 1980. Определение внутримембранного падения потенциала с помощью потенциодинамического метода. *Докл. АН СССР*. **245**, 977–981.
 24. Weaver J.C., Chizmadzhev Yu.A. 1996. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **41**, 135–160.
 25. Lafarge E.J., Muller P., Schroder A.P., Zaitseva E., Behrends J.C., Marques C.M. 2023. Activation energy for pore opening in lipid membranes under an electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **120**, e2213112120.
 26. Alvarez O., Latorre R. 1978. Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers. *Biophys J.* **21**, 1–17.
 27. Pastushenko V.F., Chizmadzhev Yu.A., Arakelyan V.B. 1979. Electric breakdown of bilayer lipid membranes II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **6**, 53–62.
 28. Зельдович Я.Б. К теории образования новой фазы. Кавитация. 1942. *ЖЭТФ*. **12**, 525–538.

Lipid Membrane Electroporation Cannot Be Described by the Constant Line Tension Model of the Pore Edge

P. K. Gifer^{1, 2, *}, O. V. Batichev¹

¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow oblast, 141700 Russia*

**e-mail: gifer.pk@phystech.edu*

We have studied the process of electroporation of bilayer lipid membranes (BLMs) from dioleoylphosphatidylcholine (DOPC). We obtained experimental data on the average lifetime of the membrane as a function of applied voltage in the range of 200–375 mV. The analysis of the data obtained showed that the dependence is nonmonotonic and cannot be described in terms of the classical theory of electroporation. These results are consistent with modern models of the process of through conductive pores formation in a membrane. The above models imply a complex pore energy profile and its dependence on membrane tension and external electric field. Thus, we have shown that the classical theory of electroporation does not satisfy the experimentally observed dependencies of the average membrane lifetime on the applied potential difference and requires further refinement.

Keywords: lipid membrane, BLM, electroporation, line tension, dioleoylphosphatidylcholine, pore energy

УДК 577.352.4

ПРОИЗВОДНОЕ БЕНЗИМИДАЗОЛА NS1619 ПОДАВЛЯЕТ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МЫШЕЙ

© 2023 г. М. В. Дубинин^{a, *}, А. Д. Игошкина^a, А. А. Семенова^a,
Н. В. Микина^a, Е. И. Хорошавина^a, К. Н. Белослудцев^{a, b}

^aМарийский государственный университет,
Йошкар-Ола, Республика Марий Эл, 424000 Россия

^bИнститут теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

Поступила в редакцию 16.01.2023 г.

После доработки 25.01.2023 г.

Принята к публикации 27.01.2023 г.

Известно, что активатор Ca^{2+} -чувствительного калиевого канала большой проводимости (BK_{Ca}) NS1619 обладает плеiotропным действием и способен также оказывать влияние на функционирование других транспортных систем клетки и ее органелл. В настоящей работе нами изучено влияние этого производного бензимидазола на функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышей. Показано, что NS1619 дозозависимо подавляет дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий скелетных мышц мышей, энергизованных как в присутствии глутамат/малата (субстраты комплекса I дыхательной цепи), так и сукцината (субстрат комплекса II дыхательной цепи). Такое действие NS1619 обусловлено ингибированием активности комплексов I, III и IV дыхательной цепи органелл, а также АТФ-синтазы и сопровождается дозозависимым снижением мембранного потенциала органелл, энергизованных субстратами или АТФ. Кроме того, NS1619 существенно снижает способность митохондрий поглощать и аккумулировать ионы кальция в матриксе. В то же время, мы отметили антиоксидантный эффект NS1619, который проявляется в снижении продукции перекиси водорода митохондриями скелетных мышц, энергизованными глутаматом и малатом. В работе обсуждаются механизмы возможного токсического действия NS1619 на функционирование митохондрий скелетных мышц и его вклад в побочные эффекты, наблюдаемые при *in vivo* терапии мышечных патологий.

Ключевые слова: митохондрии скелетных мышц, NS1619, окислительное фосфорилирование, дыхательная цепь, кальций, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S0233475523030064, **EDN:** FBVKVF

ВВЕДЕНИЕ

Модуляторы специфических ионных каналов являются важными фармакологическими инструментами, позволяющими характеризовать функциональные свойства ионных каналов и их влияние на функцию клеток и их органелл. Одним из актуальных направлений современной биологии и фармакологии является поиск модуляторов Ca^{2+} -чувствительного калиевого канала большой проводимости (BK_{Ca}), обнаруженного в плазматической мембране разных типов клеток, наружной мембране ядра, а также внутренней митохондриальной мембране (мито BK_{Ca}). Активность этого канала регулируется внутриклеточной концентрацией ионов кальция и мембранным потенциалом [1].

Известно, что BK_{Ca} -канал кодируется геном *Kcnn1*, который при транскрибировании подвергается альтернативному сплайсингу, что приводит к появлению нескольких изоформ BK_{Ca} и в том числе митохондриального варианта [2]. Митохондриальный BK_{Ca} , наряду с АТФ-зависимым калиевым каналом, также локализованным во внутренней мембране органелл, обеспечивает транспорт ионов калия в матрикс митохондрий [3, 4]. Известно, что активность транспорта калия в митохондриях, в том числе опосредованного BK_{Ca} , тесно связана с регуляцией активности дыхательной цепи митохондрий, продукцией ими активных форм кислорода (АФК) и индукцией клеточной гибели [1]. Предполагается, что это может быть обусловлено мягким разобщающим

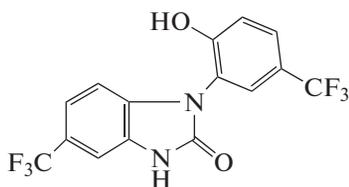


Рис. 1. Структура NS1619.

влиянием транспорта калия, приводящим к снижению мембранного потенциала органелл, и как следствие, к снижению продукции АФК митохондриями [5–7]. Действительно, показано, что VK_{Ca} играет важную цитопротекторную роль при ишемии сердца и мозга [8, 9]. При этом защитный эффект достигается путем фармакологической активации VK_{Ca} и, напротив, снимается в присутствии ингибиторов этого канала. Одним из активаторов VK_{Ca} , оказывающих цитопротекторное влияние, является производное бензимидазола NS1619 (1,3-дигидро-1-[2-гидрокси-5-(трифторметил)фенил]-5-(трифторметил)-2Н-бензимидазол-2-он) (рис. 1). Ранее было показано, что NS1619 защищает клетки сердца при ишемии/реперфузии, а также обладает нейропротекторным действием [8, 9]. Наряду с этим уже в ранних работах была выявлена плейотропность действия NS1619, которая проявлялась в его способности в высоких концентрациях подавлять функционирование комплексов дыхательной цепи митохондрий [10–12], Ca^{2+} -АТФ-азы сарко/эндоплазматического ретикулума [12], а также кальциевых каналов L-типа плазматических мембран [13].

Недавно нами показано, что в условиях *in vivo* NS1619 нормализует размер и функциональную активность митохондрий скелетных мышц и смягчать развитие деструктивных процессов в мышцах дистрофин-дефицитных *mdx* мышцей, моделирующих тяжелую генетическую патологию – мышечную дистрофию Дюшенна [14]. Применение NS1619 обнаружило классическую для этого агента картину и, наряду с активацией транспорта ионов калия через внутреннюю мембрану митохондрий скелетных мышц, сопровождалось снижением продукции АФК митохондриями, увеличением кальциевой емкости органелл, а также нормализацией их размера. С другой стороны, в этих экспериментах нами было выявлено снижение параметров дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий скелетных мышц животных, получавших NS1619. При этом такой эффект NS1619 был более выражен в случае контрольных животных дикого типа, демонстрирующих высокие показатели функциональной активности органелл, и в этом случае также сопровождался увеличением периметра органелл [14].

С целью выяснения механизмов, лежащих в основе выявленных ранее побочных эффектов NS1619, в настоящей работе нами оценено влияние этого агента на функционирование изолированных митохондрий скелетных мышц мышцей линии C57BL/10. Установлено, что в условиях *in vitro* этот агент дозозависимо снижает параметр дыхательного контроля митохондрий и соотношение ADP/O, что обусловлено как возможным разобщающим влиянием транспорта ионов калия, так и ингибированием активности комплексов дыхательной цепи органелл и АТФ-синтазы. Это сопровождается снижением мембранного потенциала органелл, а также подавлением способности митохондрий поглощать и аккумулировать ионы кальция в матриксе. С другой стороны, нами отмечено снижение продукции перекиси водорода митохондриями скелетных мышц в присутствии NS1619.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий из скелетных мышц мышцей. Митохондрии из скелетных мышц мышцей линии C57BL/10 (вес животных 25–28 г) выделяли методом дифференциального центрифугирования в соответствии с описанной ранее методикой [15], за исключением этапа трипсинизации ткани. Концентрацию белка митохондрий определяли методом Бредфорд, в качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА). Во время проведения эксперимента суспензию митохондрий (20–30 мг митохондриального белка в 1 мл) хранили на льду.

Оценка дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий скелетных мышц мышцей. Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25°C в ячейке объемом 0.3 мл с помощью электрода Кларка и установки Oxygraph Plus (Hansatech Instruments, Великобритания) [16]. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ KCl, 5 мМ KH_2PO_4 , 0.5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES – KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 0.2 мМ ADP, 50 мкМ 2,4-динитрофенол и 1 мкМ ротенон. Оценивали дыхание митохондрий в основном метаболическом состоянии (т.е. в присутствии экзогенных субстратов или состояние 2), в состоянии 3 (в присутствии экзогенных субстратов и ADP), в состоянии 4 (после того, как весь добавленный ADP был израсходован в процессе синтеза АТФ), скорость дыхания митохондрий в состоянии 3 $\text{U}_{\text{днф}}$ (в присутствии протонифорного разобщителя 2,4-динитрофенола в концентрации 50 мкМ, вызывающей максимальную стимуляцию дыхания). Скорость окисления субстратов выражена в нмоль O_2 мин⁻¹ мг⁻¹ белка митохондрий. Коэф-

фициент дыхательного контроля (ДК = состояние 3/состояние 4). ADP/O – стехиометрический коэффициент, показывающий эффективность окислительного фосфорилирования. Значение коэффициента ADP/O определяли пульсовым методом [17]. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.5 мг/мл.

Оценка активности комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышей. Влияние NS1619 на активность комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышей оценивали спектрофотометрически согласно общепринятым протоколам [18–20] с использованием планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, США). Для разрушения митохондрий, освобождения индивидуальных комплексов дыхательной цепи и достижения их максимальной ферментативной активности изолированные митохондрии (10 мг/мл митохондриального белка) предварительно подвергали трехкратной процедуре замораживания/оттаивания при $-20/+30^{\circ}\text{C}$ в гипотоническом буфере, содержащем 10 мМ Tris–HCl, pH 7.6. Состав буферов, использованных для анализа активности индивидуальных комплексов дыхательной цепи, приведен в работах [18–20]. Активность комплекса I оценивалась при 25°C по эффективности восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола разрушенными митохондриями (50 мкг митохондриального белка/мл), которое оценивалось по скорости уменьшения оптической плотности при 600 нм после внесения 100 мкМ NADH [18]. Активность комплекса II дыхательной цепи оценивали при 37°C по эффективности восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия суспензией разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл) в присутствии субстрата окисления сукцината, которое определялось по снижению светопоглощения суспензии при длине волны 600 нм после внесения 50 мкМ дециллубихинона. Активность комплекса III дыхательной цепи оценивали при 25°C по эффективности восстановления добавленного цитохрома *c* суспензией разрушенных митохондрий (25 мкг митохондриального белка/мл), которое определялось по снижению оптической плотности суспензии при длине волны 550 нм после внесения 100 мкМ дециллубихинола. Активность комплекса IV дыхательной цепи оценивали при 25°C по эффективности окисления добавленного цитохрома *c* (восстановленного в соответствии с [19]) суспензией разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл), которое определялось по снижению оптической плотности суспензии при длине волны 550 нм после внесения суспензии разрушенных органелл. Анализ активности комплекса V был основан на связи его АТФ-азной активности и окисления NADH посредством реакций превращения фосфоенолпирувата в пируват под действием пиру-

ваткиназы, а затем пирувата в лактат под действием лактатдегидрогеназы [20]. В этом случае реакцию проводили при 25°C и запускали путем внесения суспензии разрушенных митохондрий (50 мкг митохондриального белка/мл), после чего оценивали снижение оптической плотности при длине волны 340 нм, отражающее окисление NADH. Активность комплексов дыхательной цепи оценивали в течение первых 2–3 мин с начала редокс-реакции (нмоль/мин на 1 мг белка). Влияние NS1619 на активность комплексов дыхательной цепи выражали в процентах от средней активности, регистрируемой в серии контрольных экспериментов.

Оценка разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий. Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению флуоресцентного зонда сафранина O через внутреннюю мембрану с помощью планшетного спектрофлуориметра Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) [21]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ EGTA, 10 мМ HEPES –KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ FCCP и 1 мкМ ротенон. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.5 мг/мл.

Оценка кальциевой емкости митохондрий скелетных мышц мышей. Транспорт Ca^{2+} через внутреннюю митохондриальную мембрану оценивали спектрофотометрически с помощью индикатора арсеназо III (3,6-бис-[(2-арсонофенил)азо]-4,5-дигидрокси-2,7-нафталиндисульфокислота) индикатора при 675–685 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan GO (Thermo) при 25°C и постоянном перемешивании [22]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 50 мкМ арсеназо III, 10 мкМ EGTA, 10 мМ HEPES–KOH, pH 7.4. Применяли следующие концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон. Концентрация митохондриального белка в ячейке составляла 0.3 мг/мл. Для определения способности митохондрий удерживать Ca^{2+} , 20 мкМ CaCl_2 последовательно добавлялись в реакционную среду. После нескольких добавлений происходило увеличение внешнего $[\text{Ca}^{2+}]$, что указывало на массивное высвобождение иона из органелл вследствие открытия кальций-зависимой МРТ-поры. Способность Ca^{2+} индуцировать открытие поры в митохондриях выражалась количественно как кальциевая емкость (КЕ) митохондрий, т.е. то максимальное количество Ca^{2+} ,

которое может быть аккумулировано в матриксе без последующего открытия поры.

Оценка скорости образования H_2O_2 митохондриями скелетных мышц мышей. Скорость образования H_2O_2 измеряли с помощью тест-системы, включающей в себя флуоресцентный индикатор Amplex Red и пероксидазу хрена на планшетном флуориметре Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) при длине волны возбуждения 560 нм и длине волны излучения 590 нм [21]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннитол, 70 мМ сахарозу, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ EGTA, 10 мМ HEPES-KOH (pH 7.4), 10 мкМ Amplex Red и пероксидазу хрена (акт. 1 ед/мл). Концентрации субстратов и других реагентов: 2.5 мМ малат калия, 2.5 мМ глутамат калия, 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ ротенон. Концентрация митохондриального белка составляла 0.15 мг/мл. Измерения проводились при 37°C и постоянном перемешивании. Количество образованной перекиси водорода рассчитывалось по калибровочной кривой. Стандартный раствор H_2O_2 был приготовлен непосредственно в день проведения эксперимента; его концентрацию определяли с использованием коэффициента молярной экстинкции $E_{240} = 43.6 M^{-1} cm^{-1}$.

Статистическая обработка результатов. Данные были проанализированы с использованием программ Graph Pad Prism 8 и Microsoft Excel и представлены как среднее \pm стандартная ошибка средней. Полученные данные были обработаны статистически с использованием *t*-критерия. Для оценки значимости различий использовался уровень вероятности $p < 0.05$.

Материалы. NS1619 и другие реактивы, используемые в работе, были приобретены в Sigma-Aldrich (США). NS1619 растворяли в ДМСО (2 мМ сток-раствор). В контрольных пробах к митохондриям добавляли ДМСО в том же объеме, как в добавках NS1619. Во всех случаях ДМСО не влиял на исследуемые параметры митохондрий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Недавно мы продемонстрировали, что в условиях *in vivo* производное бензимидазола NS1619, наряду с улучшением активности транспорта ионов калия в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных *mdx* мышей, подавляет параметры окислительного фосфорилирования органелл [14]. Для выяснения механизмов, лежащих в основе такого побочного действия NS1619, мы оценили влияние этого агента на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий скелетных мышц мышей. В табл. 1 представлены результаты, описывающие эффект NS1619 на дыхание митохондрий скелетных мышц мышей в разных функциональных состояниях в присутствии глутамата и

малата (субстраты комплекса I дыхательной цепи) или сукцината (субстрат комплекса II дыхательной цепи) в присутствии ротенона. Можно видеть, что NS1619 в концентрациях 10 и 20 мкМ дозозависимо повышает скорость дыхания митохондрий в состоянии 2 и состоянии 4 и, напротив, снижает скорость дыхания органелл в состояниях 3 и 3U_{днф}. Такое действие NS1619 сопровождается снижением параметра дыхательного контроля (ДК) и эффективности синтеза АТФ, что оценивалось по коэффициенту *ADP/O*. Подобные результаты получены и при энергизации органелл сукцинатом. В этом случае можно отметить, что увеличение скорости дыхания в состоянии 4 выражено лишь при 10 мкМ NS1619 и эффект снижается в случае добавления 20 мкМ этого агента. При этом можно видеть, что действие NS1619 сопровождается снижением параметра дыхательного контроля, отражающего степень сопряжения окислительного фосфорилирования, при концентрации NS1619 20 мкМ мы отметили снижение параметра в среднем в 1.67 раза в условиях энергизации органелл глутамат/малатом, тогда как при энергизации органелл сукцинатом мы отметили снижение этого параметра лишь в 1.39 раза. В то же время снижение параметра *ADP/O*, характеризующего эффективность окислительного синтеза АТФ, было более выражено в случае энергизации митохондрий сукцинатом – параметр снижался в среднем в 1.67 раза, при использовании глутамат/малата снижение составило в среднем 1.37 раза. Это может отражать вклад различных систем в снижение эффективности окислительного фосфорилирования, индуцированное NS1619 в условиях энергизации митохондрий субстратами комплекса I или комплекса II дыхательной цепи органелл.

Необходимо также отметить, что снижение дыхательного контроля митохондрий скелетных мышц, индуцированное NS1619, было обусловлено различными факторами и зависело от используемого субстрата. Из табл. 1 видно, что NS1619-индуцированное увеличение скорости дыхания митохондрий скелетных мышц в состояниях 2 и 4 более выражено при энергизации митохондрий субстратами комплекса I дыхательной цепи. В этом случае эффект NS1619 можно было бы объяснить его возможным протонотропным действием. Однако ранее было установлено, что NS1619, несмотря на наличие гидроксильной группы в ароматическом кольце (рис. 1), не оказывает влияния на протонную проницаемость бислоевых липидных мембран [10], что исключает этот механизм влияния на митохондрии. Ранее активация дыхания в состояниях 2 и 4, индуцированная NS1619, была выявлена на митохондриях сердца морской свинки и устранялась ингибитором митохондриальных калиевых каналов паксиллином [23]. Это позволяет предположить, что в этом

Таблица 1. Влияние NS1619 на дыхание митохондрий скелетных мышц в разных функциональных состояниях в присутствии глутамат/малата или сукцината

NS1619, мкМ	Состояние 2	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{днф}	ДК	ADP/O
	V дыхания, нмоль O ₂ /мин/мг белка митохондрий				отн. ед.	
2.5 мМ глутамат + 2.5 мМ малат						
0	6.48 ± 0.05	53.58 ± 1.90	18.62 ± 0.08	55.69 ± 0.29	2.88 ± 0.11	2.63 ± 0.07
10	9.31 ± 0.25*	47.90 ± 1.06*	19.74 ± 0.10*	51.47 ± 1.20*	2.43 ± 0.07*	2.23 ± 0.02*
20	14.93 ± 0.32*#	41.04 ± 1.62*#	23.83 ± 0.58*#	46.62 ± 1.84*#	1.72 ± 0.09*#	1.92 ± 0.03*#
+ Олиго			17.91 ± 0.34 ^γ			
5 мМ сукцинат						
0	19.17 ± 0.55	61.41 ± 0.89	37.31 ± 0.26	53.47 ± 0.81	1.65 ± 0.02	1.44 ± 0.01
10	26.73 ± 0.36*	57.48 ± 0.81*	40.77 ± 0.28*	47.05 ± 0.67*	1.41 ± 0.01*	1.12 ± 0.05*
20	29.25 ± 0.46*#	45.67 ± 0.91*#	38.35 ± 0.60 [#]	37.13 ± 0.97*#	1.19 ± 0.02*#	0.86 ± 0.05*#

Примечание. Дыхание митохондрий в состоянии 3 индуцировали добавлением 200 мкМ ADP. Скорость разобшенного дыхания измеряли в присутствии 50 мкМ ДНФ (состояние 3U_{днф}). Дыхательный контроль (ДК) рассчитан как отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 4). 1 мкг/мл олигомицина (Олиго) добавлено к митохондриям в состоянии 4. * p < 0.05 против контроля (отсутствие NS1619), # p < 0.05 против 10 мкМ NS1619, ^γp < 0.05 против скорости дыхания в отсутствие олигомицина.

Таблица 2. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мыши в присутствии NS1619 (в % от контроля)

Добавки NS1619	Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV	АТФ-синтаза
10 мкМ	97.0 ± 3.2	105.7 ± 1.1	96.3 ± 0.2	98.5 ± 4.1	97.2 ± 2.1
20 мкМ	83.2 ± 3.1*	103.7 ± 1.0	90.3 ± 1.3*	89.0 ± 1.2*	88.0 ± 1.2*

Примечание. Активность комплексов в отсутствие NS1619 принята за 100%. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 4). * p < 0.05 против контроля (отсутствие NS1619).

случае разобщающий эффект NS1619 может быть также обусловлен активацией транспорта ионов калия в митохондрии, и этот эффект более выражен при энергизации органелл глутамат/малатом. Наряду с этим, можно видеть, что в условиях энергизации органелл глутамат/малатом увеличение скорости дыхания митохондрий скелетных мышц в состоянии 4 частично устраняется внесением ингибитора F1Fo-АТФ-азы олигомицина (табл. 1). Это может свидетельствовать о способности NS1619 нарушать процесс фосфорилирования ADP за счет снижения активности комплексов дыхательной цепи и/или обращения активности АТФ-синтазы. В этом случае ADP, остающийся в системе, может некоторое время поддерживать достаточно высокую скорость дыхания органелл в состоянии 4 [24]. Об ингибировании активности комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышцей под действием NS1619 также может свидетельствовать наблюдаемое снижение потребления кислорода митохондриями в ADP-стимулированном состоянии и состоянии 3U_{днф} в условиях максимальной стимуляции дыхания протонофорным разоб-

щителем 2,4-динитрофенолом. Необходимо отметить, что в последнем случае снижение скорости потребления кислорода было более выражено при энергизации органелл сукцинатом, чем глутамат/малатом – скорость дыхания в состоянии 3U_{днф} снижалась в присутствии 20 мкМ NS1619 в 1.44 и 1.19 раза соответственно. Это может свидетельствовать о способности NS1619 более активно подавлять работу комплексов дыхательной цепи (без учета работы АТФ-синтазы и транспорта ADP) в режиме энергизации митохондрий через комплекс II.

В следующей части работы мы оценили влияние NS1619 на активность индивидуальных комплексов дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышцей, а также АТФ-синтазы. Из данных табл. 2 видно, что NS1619 в концентрации 20 мкМ вызывает достоверное снижение активности комплекса I на 17%. Ингибирование комплекса I митохондрий, вызванное NS1619, отмечено и в целом ряде других литературных источников и обнаруживалось на изолированных митохондриях сердца крысы [11], а также клетках глиомы человека линии LN229 [10] и эндотели-

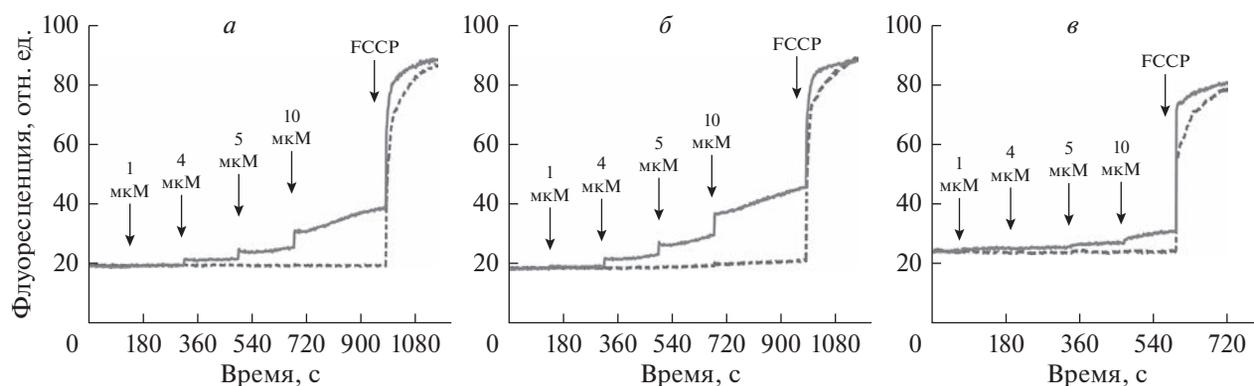


Рис. 2. Дозозависимое влияние NS1619 на мембранный потенциал митохондрий скелетных мышц мыши, энергизованных глутамат/малатом (а), сукцинатом (б) и АТФ (в). Субстраты и реагенты: 2,5 мМ малат калия, 2,5 мМ глутамат калия (а), 5 мМ янтарная кислота, 1 мМ ротенон (б), 2 мМ АТФ (в), 1 мМ FCCP (а, б, в). На каждом из рисунков представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

альных клетках линии EA.hy926 [12]. Наряду с этим мы также обнаружили, что NS1619 подавляет активность комплексов III и IV дыхательной цепи митохондрий скелетных мышц мышей. В этом случае эффект был менее выражен по сравнению с влиянием на активность комплекса I — 20 мМ NS1619 снижал активность комплекса III в среднем на 10% и комплекса IV на 11% (табл. 2). Как и предполагалось выше, NS1619 также снижал активность АТФ-синтазы митохондрий, 20 мМ этого агента вызывало 12% ингибирование активности этого комплекса. Ранее подобный эффект NS1619 был показан и на субмитохондриальных частицах сердца быка и было предположено, что этот агент влияет на Fo-субъединицу АТФ-синтазы [12].

Можно предполагать, что выявленное нами ингибирующее влияние NS1619 на активность комплексов дыхательной цепи, наряду с возможным разобщающим влиянием калиевого транспорта, препятствует синтезу АТФ митохондриями скелетных мышц, который необходим для поддержания нормального мышечного сокращения и функциональной активности мускулатуры. Действительно, ранее в эксперименте *in vivo*, несмотря на общее положительное влияние NS1619 на состояние митохондрий и снижение деструктивных процессов в ткани скелетной мускулатуры *mdx* мышей, мы не отметили влияния этого агента на мышечную силу и выносливость дистрофичных животных. Более того, нами была отмечена тенденция к снижению мышечной силы здоровых мышей дикого типа, получавших NS1619 [14].

Известно, что разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях зачастую сопровождается снижением мембранного потенциала ($\Delta\psi$) органелл. Из рис. 2 можно видеть, что в кон-

центрации 1 мМ NS1619 не оказывает существенного влияния на $\Delta\psi$ митохондрий, однако увеличение его концентрации суммарно до 5 мМ сопровождается выходом потенциал-зависимого флуоресцентного зонда сафранина О из митохондрий, что свидетельствует о снижении мембранного потенциала органелл, и этот эффект усиливается с увеличением концентрации NS1619. Данный эффект проявляется как в случае энергизации митохондрий глутамат/малатом (рис. 2а), так и сукцинатом (рис. 2б), а также в условиях гидролиза добавленного АТФ (рис. 2в). В последнем случае можно полагать, что дозозависимое снижение $\Delta\psi$ обусловлено показанным выше ингибированием NS1619 активности АТФ-синтазы. Полученные результаты во многом соответствуют известным данным, свидетельствующим о снижении мембранного потенциала митохондрий под действием ингибирующего влияния NS1619 [10–12].

Митохондрии являются одними из основных продуцентов АФК в клетках [25, 26]. При этом ингибирование комплексов дыхательной цепи, равно как и разобщение окислительного фосфорилирования, реализуемое посредством различных механизмов, оказывает существенное влияние на интенсивность генерации АФК. Известно, что NS1619-индуцированная активация митохондриального VK_{Ca} -канала сопровождается снижением продукции АФК в клетке и в том числе в митохондриях [5–7]. В нашей недавней работе было показано, что терапевтический эффект NS1619 в скелетных мышцах дистрофин-дефицитных *mdx* мышей также может быть обусловлен снижением продукции АФК и смягчением интенсивности окислительного стресса [14]. Можно видеть, что в условиях *in vitro* NS1619 также дозозависимо снижает продукцию перекиси водорода изолированными митохондриями скелетных мышц, хотя

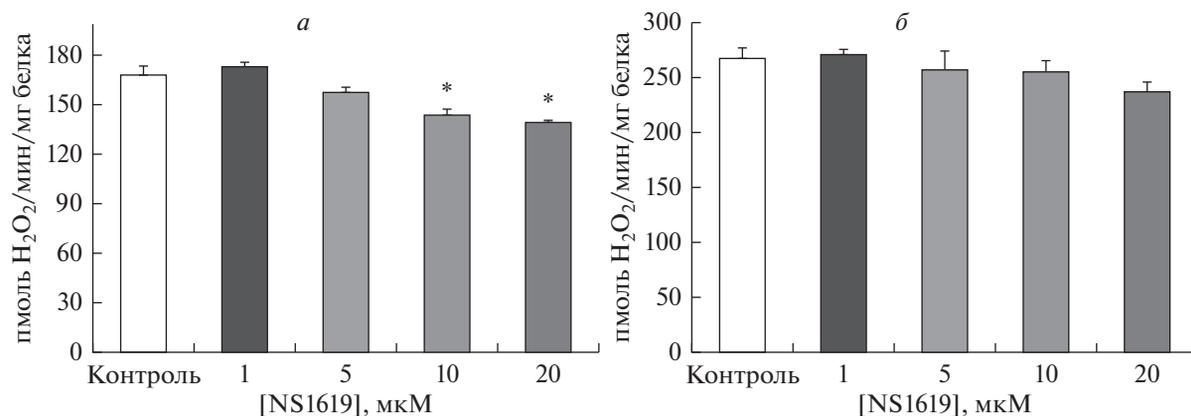


Рис. 3. Влияние NS1619 в различных дозах на продукцию H_2O_2 митохондриями скелетных мышц мыши, энергизованными глутамат/малатом (а) или сукцинатом (б). Приведены средние \pm ошибка среднего ($n = 4$). * – различия между данными опытов (присутствие NS1619 в указанных концентрациях) и контролем (отсутствие NS1619) статистически значимы, $p < 0.05$.

достоверный эффект нами выявлен только в условиях энергизации органелл субстратами комплекса I дыхательной цепи (рис. 3а), что, возможно, обусловлено более выраженной активацией дыхания в состоянии 2 и 4, индуцированной NS1619 (табл. 1). Это, как известно, способствует снижению продукции АФК митохондриями [25].

Общепризнано, что митохондрии не только обеспечивают клетку АТФ и теплом, но играют ведущую роль в процессах регуляции ее функций при участии свободного Ca^{2+} [27–29]. Известно, что изолированные митохондрии из различных органов и тканей животных в энергизованном состоянии обладают способностью аккумулировать и удерживать Ca^{2+} в матриксе [29]. Однако при критической перегрузке матрикса органелл ионами кальция наблюдается индукция неспецифической проницаемости внутренней мембраны для ионов и растворимых в воде веществ с молекулярной массой до 1500 Да по их градиенту концентрации (или открытие митохондриальной поры) [29]. Образование такой поры приводит к нарушению энергетических функций митохондрий, прежде всего синтеза АТФ, а также может вызвать набухание матрикса митохондрий, разрыв внешней мембраны и, как следствие, выход находящихся в межмембранном пространстве цитохрома *c* и других, так называемых апоптогенных белков [29]. В связи с этим индукция поры во внутренней мембране митохондрий рассматривается как один из факторов гибели клеток при различных патологических состояниях [29].

Известно, что регуляция митохондриального VK_{Ca} -канала тесно связана с индукцией МРТ-поры. Действительно, ранее было показано, что фармакологическая активация канала с помощью NS1619 увеличивает количество добавок Ca^{2+} , не-

обходимых для индукции МРТ-поры в митохондриях сердца в условиях ишемии/реперфузии, что также рассматривалось в качестве кардиопротекторного эффекта этого агента [2]. Подобное действие NS1619 показано и в нашей предыдущей работе и сопровождалось увеличением кальциевой емкости митохондрий скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей. С другой стороны, мы, напротив, отметили снижение способности аккумулировать ионы кальция митохондриями скелетных мышц здоровых мышей дикого типа, получавших NS1619 [14]. В настоящей работе мы также оценили *in vitro* влияние NS1619 на способность митохондрий скелетных мышц мышей поглощать и удерживать ионы кальция в матриксе органелл. На рис. 4 представлены результаты сравнительного изучения кинетики поглощения Ca^{2+} митохондриями скелетных мышц мыши, энергизованными глутамат/малатом или сукцинатом и инкубируемыми в отсутствие и в присутствии NS1619. Можно видеть, что предварительная инкубация митохондрий с NS1619 приводит к существенному снижению количества поглощаемых ими добавок кальция (рис. 4а, 4б), что количественно выражается в снижении кальциевой емкости органелл и свидетельствует о более эффективной индукции МРТ-поры.

Суммируя полученные данные, можно полагать, что действие NS1619 в скелетных мышцах, с одной стороны, может быть реализовано через активацию VK_{Ca} -канала, в том числе и его митохондриальной изоформы. С другой стороны, это производное бензимидазола подавляет функционирование комплексов дыхательной цепи митохондрий и АТФ-синтазы, что оказывает существенное влияние на способность органелл синтезировать АТФ, необходимого прежде всего для

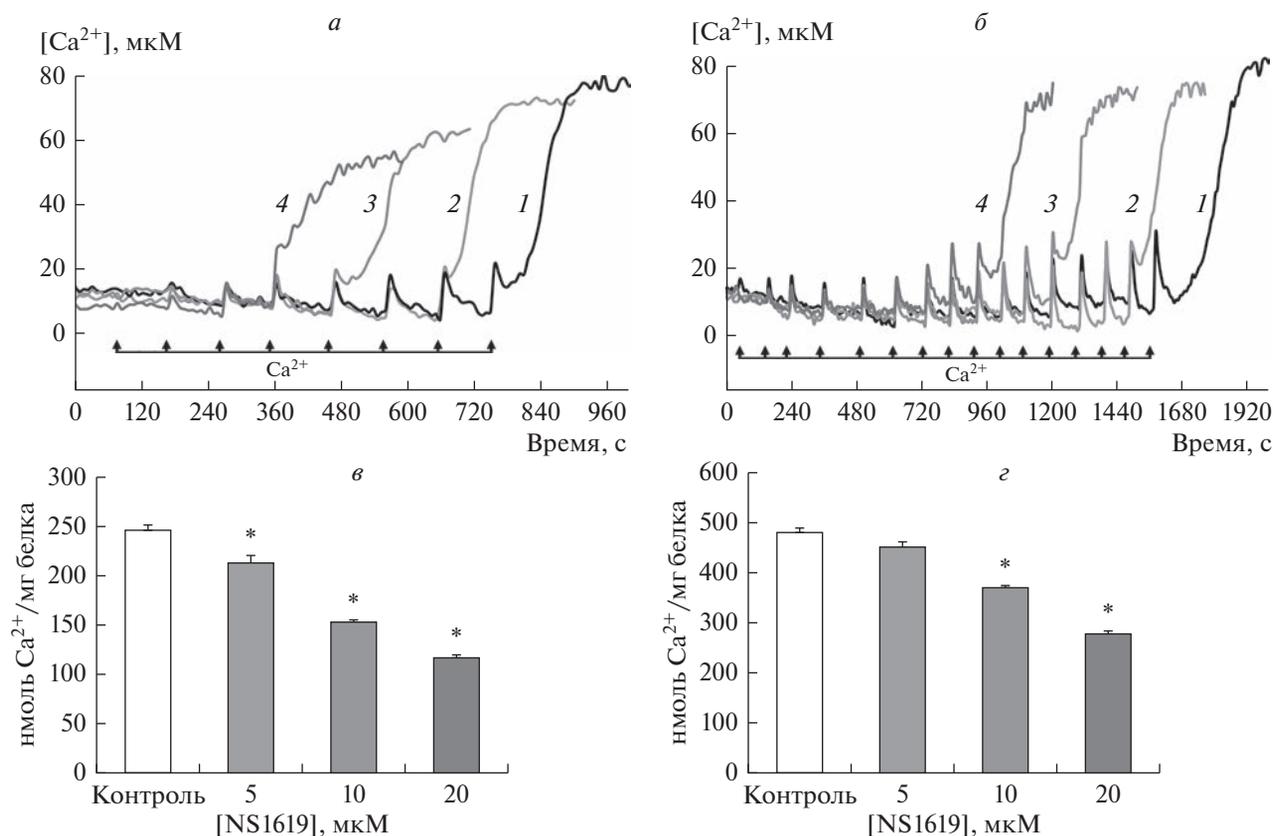


Рис. 4. Влияние NS1619 на транспорт кальция в митохондриях скелетных мышц мыши. *а* – Поглощение добавок Ca^{2+} (пульсы по 20 мкМ) митохондриями скелетных мышц, энергизованными глутамат/малатом, в отсутствие добавок (1) и в присутствии 5 (2), 10 (3) и 20 мкМ (4) NS1619. *б* – Поглощение добавок Ca^{2+} (пульсы по 20 мкМ) митохондриями скелетных мышц, энергизованными сукцинатом, в отсутствие добавок (1) и в присутствии 5 (2), 10 (3) и 20 мкМ (4) NS1619. *в* – Кальциевая емкость митохондрий скелетных мышц, энергизованных глутамат/малатом, в отсутствие (контроль) и в присутствии различных концентраций NS1619. *г* – Кальциевая емкость митохондрий скелетных мышц мышей, энергизованных сукцинатом, в отсутствие (контроль) и в присутствии различных концентраций NS1619. Субстраты и реагенты: 2,5 мМ малат калия, 2,5 мМ глутамат калия (*а*), 5 мМ янтарная кислота, 1 мкМ рогенон (*б*). Концентрация митохондриального белка в кювете – 0,3 мг/мл. На панелях *а* и *б* представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в трех независимых экспериментах. Панели *в* и *г* – приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$). * – различия между данными опытов (присутствие NS1619 в указанных концентрациях) и контролем (отсутствие NS1619) статистически значимы, $p < 0,05$.

сокращения скелетной мускулатуры. Кроме того, это сопровождается снижением мембранного потенциала митохондрий, изменением продукции АФК, а также угнетением способности органелл аккумулировать ионы кальция, что также необходимо для корректной регуляции циклов сокращения и расслабления мышц. При этом важно отметить, что полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) NS1619 как активатора VK_{Ca} -каналов составляет порядка 3 мкМ [30], в то время как способность подавлять функцию митохондрий проявляется при более высоких концентрациях, в частности, в нашем случае концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) при оценке влияния NS1619 на параметр кальциевой емкости органелл, энергизованных глутамат/малатом, составила около 20 мкМ (рис. 4*а*, 4*в*).

Как можно видеть из нашей предыдущей работы, NS1619 ослабляет развитие митохондриальной дисфункции скелетных мышц при дистрофии Дюшенна. В то же время этот агент оказывает скорее негативное влияние на функцию митохондрий здоровых скелетных мышц. Исходя из результатов этой работы, наших предыдущих и литературных данных, можно сделать вывод, что *in vivo* эффект NS1619 обусловлен суммарным действием этого агента на различные митохондриальные и клеточные системы и во многом зависит от особенностей функционирования этих систем в норме и патологии. Это требует тщательного подбора терапевтических концентраций NS1619 и условий его введения в организм.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов ин-

тересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда, № 20-75-10006.

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- González-Sanabria N., Echeverría F., Segura I., Alvarado-Sánchez R., Latorre R. 2021. BK in double-membrane organelles: A biophysical, pharmacological, and functional survey. *Front. Physiol.* **12**, 761474.
- Singh H., Rong L., Bopassa J., Meredith A., Stefani E., Toro L. 2013. MitoBK-Ca is encoded by the KCNMA1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 10836–10841.
- Wrzosek A., Augustynek B., Żochowska M., Szewczyk A. 2021. mitochondrial potassium channels as druggable targets. *Biomolecules.* **10** (8), 1200.
- Checchetto V., Leanza L., De Stefani D., Rizzuto R., Gulbins E., Szabo I. 2021. Mitochondrial K⁺ channels and their implications for disease mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **227**, 107874.
- Xu W., Liu Y., Wang S., McDonald T., Van Eyk J.E., Sidor A., O'Rourke B. 2002. Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science.* **298**, 1029–1033.
- Kulawiak B., Kudin A.P., Szewczyk A., Kunz W.S. 2008. BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria. *Exp. Neurol.* **212**, 543–547.
- Heinen A., Aldakkak M., Stowe D.F., Rhodes S.S., Riess M.L., Varadarajan S.G., Camara A.K. 2007. Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1400–H1407.
- Wang X., Yin C., Xi L., Kukreja R.C. 2004. Opening of Ca²⁺-activated K⁺ channels triggers early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H2070–H2077.
- Du X., Carvalho-De-Souza J.L., Wei C., Carrasquel-Ursulaez W., Lorenzo Y., Gonzalez N., Kubota T., Staisch J., Hain T., Petrossian N., Xu M., Latorre R., Bezanilla F., Gomez C.M. 2020. Loss-of-function BK channel mutation causes impaired mitochondria and progressive cerebellar ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 6023–6034.
- Debska G., Kicinska A., Dobrucki J., Dworakowska B., Nurowska E., Skalska J., Dolowy K., Szewczyk A. 2003. Large-conductance K⁺ channel openers NS1619 and NS004 as inhibitors of mitochondrial function in glioma cells. *Biochem. Pharmacol.* **65** (11), 1827–1834.
- Kicinska A., Szewczyk A. 2004. Large-conductance potassium cation channel opener NS1619 inhibits cardiac mitochondria respiratory chain. *Toxicol. Mech. Methods.* **14** (1–2), 59–61.
- Łukasiak A., Skup A., Chlopicki S., Łomnicka M., Kaczara P., Proniewski B., Szewczyk A., Wrzosek A. 2016. SERCA, complex I of the respiratory chain and ATP-synthase inhibition are involved in pleiotropic effects of NS1619 on endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **786**, 137–147.
- Park W.S., Kang S.H., Son Y.K., Kim N., Ko J.H., Kim H.K., Ko E.A., Kim C.D., Han J. 2007. The mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channel activator, NS 1619 inhibits L-type Ca²⁺ channels in rat ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362** (1), 31–36.
- Dubinina M.V., Starinets V.S., Belosludtseva N.V., Mikheeva I.B., Chelyadnikova Y.A., Igoshkina A.D., Vafina A.B., Vedernikov A.A., Belosludtsev K.N. 2022. BK_{Ca} activator ns1619 improves the structure and function of skeletal muscle mitochondria in duchenne dystrophy. *Pharmaceutics.* **14**, 2336.
- Dubinina M.V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Sharapov M.G., Belosludtsev K.N. 2020. Duchenne muscular dystrophy is associated with the inhibition of calcium uniport in mitochondria and an increased sensitivity of the organelles to the calcium-induced permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1866** (5), 165674.
- Dubinina M.V., Svinin A.O., Vedernikov A.A., Starinets V.S., Tenkov K.S., Belosludtsev K.N., Samartsev V.N. 2019. Effect of hypothermia on the functional activity of liver mitochondria of grass snake (*Natrixnatrix*): Inhibition of succinate-fueled respiration and K⁺ transport, ROS-induced activation of mitochondrial permeability transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* **51** (3), 219–229.
- Chance B., Williams G.R. 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* **217** (1), 383–393.
- Pollard A.K., Craig E.L., Chakrabarti L. 2016. Mitochondrial complex I activity measured by spectrophotometry is reduced across all brain regions in ageing and more specifically in neurodegeneration. *PLoS One.* **11**(6), e0157405.
- Spinazzi M., Casarin A., Pertegato V., Salviati L., Angelini C. 2012. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* **7** (6), 1235–1246.
- Venediktova N., Solomadin I., Nikiforova A., Starinets V., Mironova G. 2021. functional state of rat heart mitochondria in experimental hyperthyroidism. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11744.
- Dubinina M.V., Sharapov V.A., Ilzorkina A.I., Efimov S.V., Klochkov V.V., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. 2022. Comparison of structural properties of cyclosporin A and its analogue alisporivir and their effects on mitochondrial bioenergetics and membrane behavior. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1864** (9), 183972.

22. Dubinin M.V., Starinets V.S., Talanov E.Y., Mikheeva I.B., Belosludtseva N.V., Belosludtsev K.N. 2021. Alisporivir improves mitochondrial function in skeletal muscle of *mdx* mice but suppresses mitochondrial dynamics and biogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9780.
23. Heinen A., Camara A.K., Aldakkak M., Rhodes S.S., Riess M.L., Stowe D.F. 2007. Mitochondrial Ca²⁺-induced K⁺ influx increases respiration and enhances ROS production while maintaining membrane potential. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292** (1), C148–C156.
24. Bosetti F., Baracca A., Lenaz G., Solaini, G. 2004. Increased state 4 mitochondrial respiration and swelling in early post-ischemic reperfusion of rat heart. *FEBS Lett.* **563** (1–3), 161–164.
25. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S. J. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* **94** (3), 909–950.
26. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Мерфи Э.Н., Старков А.А. 2015 Митохондриальный метаболизм активных форм кислорода: десять лет спустя. *Биохимия.* **5** (80), 612–630.
27. Rasola A., Bernardi P. 2011. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* **50**, 222–233.
28. Дубинин М.В., Белослудцев К.Н. 2019. Таксономические особенности механизмов специфического транспорта Ca²⁺ в митохондриях. *Биол. мембраны.* **36** (4), 231–241.
29. Белослудцев К.Н., Дубинин М.В., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. 2019. Транспорт ионов Ca²⁺ митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки. *Биохимия.* **6** (84), 759–775.
30. Olesen S. P., Munch E., Moldt P., Drejer J. 1994. Selective activation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels by novel benzimidazolone. *Eur. J. Pharmacol.* **251** (1), 53–59.

Benzimidazole Derivative NS1619 Inhibits Functioning of Mitochondria Isolated from Mouse Skeletal Muscle

M. V. Dubinin^{1,*}, A. D. Igoshkina¹, A. A. Semenova¹, N. V. Mikina¹,
E. I. Khoroshavina¹, K. N. Belosludtsev^{1,2}

¹Mari State University, Yoshkar-Ola, 424000 Russia

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

The activator of the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (BK_{Ca}) NS1619 is known to have a pleiotropic action and is able to affect the functioning of other transport systems of the cell and its organelles. In this work, we have studied the effect of this benzimidazole derivative on the functioning of isolated mouse skeletal muscle mitochondria. NS1619 has been shown to dose-dependently inhibit respiration and oxidative phosphorylation of mouse skeletal muscle mitochondria fueled by glutamate/malate (complex I substrates) or succinate (complex II substrate). This action of NS1619 is based on the inhibition of the activity of complexes I, III, and IV of the respiratory chain of organelles, as well as ATP synthase and is accompanied by a dose-dependent decrease in the membrane potential of organelles fueled by the above substrates or ATP. In addition, NS1619 significantly reduces the ability of mitochondria to uptake and retain calcium ions in the matrix. At the same time, we noted the antioxidant effect of NS1619 expressed in a decrease in the production of hydrogen peroxide by skeletal muscle mitochondria fueled by glutamate and malate. The mechanisms of the possible toxic effects of NS1619 on skeletal muscle mitochondrial function and its contribution to the side effects observed in the treatment of muscle pathologies *in vivo* are discussed.

Keywords: skeletal muscle mitochondria, NS1619, oxidative phosphorylation, respiratory chain, calcium, reactive oxygen species

УДК 577.32

СИЛОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Yersinia pestis* С РЕЦЕПТОРАМИ TLR4 И CD14 МАКРОФАГОВ J774: АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

© 2023 г. В. С. Белозёров^{a, b}, Б. А. Ананченко^a, И. В. Коньшев^{a, b}, Л. Г. Дудина^{a, b},
С. А. Коннова^c, Э. В. Рожина^c, Р. Ф. Фахруллин^c, А. А. Бывалов^{a, b, *}

^aВятский государственный университет,
г. Киров, 610000 Российская Федерация

^bИнститут физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
г. Сыктывкар, Республика Коми, 167982 Россия

^cИнститут фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,
Приволжский федеральный округ, Республика Татарстан, 420008 Россия

*e-mail: byvalov@nextmail.ru

Поступила в редакцию 04.02.2023 г.

После доработки 09.03.2023 г.

Принята к публикации 12.03.2023 г.

Одной из основных стадий инфекционного процесса, которая во многом определяет течение и исход заболевания, является первичный контакт возбудителя с клетками хозяина. Ключевую роль в таком взаимодействии грамотрицательных бактерий с иммунокомпетентными клетками макроорганизма играет липополисахарид наружной мембраны, инициирующий запуск и развитие иммунных реакций путем взаимодействия с рядом специфических рецепторов, в первую очередь CD14 и TLR4. Цель настоящей работы состояла в количественном определении методом атомно-силовой микроскопии силовых характеристик взаимодействия липополисахарида *Yersinia pestis* вакцинного штамма EV с рецепторами CD14 и TLR4 на поверхности мышечных макрофагов J774. Препарат липополисахарида выделяли из клеток *Y. pestis* вакцинного штамма EV, выращенных при 27°C. Для оценки экспрессии рецепторов на поверхности клеток применяли метод флуоресцентной и конфокальной микроскопии. С использованием моноклональных антител к рецепторам CD14 и TLR4 методом силовой спектроскопии оценивали силовые характеристики взаимодействия липополисахарида на поверхности зонда (иглы) кантилевера с клетками макрофагов J774. В работе были подобраны условия иммобилизации на стекле мышечных макрофагов линии J774, позволяющие проводить сканирование их поверхности и оценивать силу адгезии к клеткам целевых антигенов методом атомно-силовой микроскопии. Инкубация иммобилизованных макрофагов в растворах с моноклональными антителами к рецепторам CD14 и TLR4 вызывала снижение основных силовых характеристик взаимодействия в системе макрофаг J774 – липополисахарид *Y. pestis* по сравнению с интактными, необработанными клетками. Аналогичный эффект зарегистрирован после предварительной обработки клеток раствором того же препарата липополисахарида без моноклональных антител. Полученные результаты свидетельствуют о способности липополисахарида, химически связанного с зондом, взаимодействовать с рецепторами CD14 и TLR4 на поверхности макрофагов.

Ключевые слова: липополисахарид, *Yersinia pestis*, рецепторы CD14 и TLR4, макрофаги J774, атомно-силовая микроскопия

DOI: 10.31857/S0233475523040035, **EDN:** OJPGSD

ВВЕДЕНИЕ

Клиническая картина и исход бактериальных инфекций во многом определяются результатом первичного взаимодействия патогена с клетками хозяина, в первую очередь эпителиальными и иммунокомпетентными. Указанное взаимодействие опосредуется поверхностными антигенами возбудителя, связанными с телом клетки или нахо-

дящимися в межклеточном пространстве. Одним из таких антигенов грамотрицательных бактерий является липополисахарид (ЛПС), основной структурный компонент наружной мембраны, способный выделяться в окружающую микробную клетку среду. Этот антиген участвует в реализации многих важных функций бактерий в организме хозяина, в том числе индуцируя развитие процессов врожденного и приобретенного иммунитета [1].

Клетки млекопитающих способны продуцировать молекулы, которые с той или иной степенью специфичности могут связываться с определенными объектами внешней среды биотической и абиотической природы. Среди таких молекул есть белки, играющие ключевую роль во взаимодействии с патогенными микроорганизмами и клетками индигенной микрофлоры. Установлена способность клеток *Yersinia pestis* связываться с поверхностью эукариотических клеток или компонентами внеклеточного матрикса посредством таких адгезинов, как Pla, Psa, YadBC, Ail [2]. Показана способность аутотранспортёра YapF *Y. pestis*, иммобилизованного на поверхности полистирольных микросфер, связываться с макрофагами J774 [3].

На начальных этапах проникновения грамотрицательных бактерий в организм хозяина особое значение имеют рецепторы CD14 и TLR4 иммунокомпетентных клеток. Показано, что при инфицировании макроорганизма минимальные количества ЛПС в не связанной с микробной клеткой форме попадают в кровь, где в комплексе с липополисахарид-связывающим белком ЛПС может связываться с рецептором CD14, который находится в растворимом виде или связан с поверхностью макрофагов. Белок CD14 расщепляет агрегаты ЛПС до субъединичных молекул, которые взаимодействуют с TLR4-MD2, что приводит к активации ряда сигнальных молекул, в том числе провоспалительных цитокинов [4, 5]. Это способствует элиминации патогена из инфицированного организма. Вместе с тем такого механизма защитной реакции может оказаться недостаточно, что может привести к генерализации инфекционного процесса, в том числе к септическому шоку, опосредуемому и эндотоксином возбудителя. Японскими авторами установлено, что ЛПС *Y. pestis* как в водорастворимой форме, так и в связанном с клеткой виде может и напрямую взаимодействовать с рецептором TLR4 на поверхности макрофагов человека U937, причем клетки культур, выращенных при 27°C и 37°C, а также препараты ЛПС, выделенные из этих культур (ЛПС-27 и ЛПС-37 соответственно), вызывали различные эффекты. Так, водорастворимый ЛПС-27, равно как и инактивированные формалином бактерии, выращенные при 27°C, за счет связанного с клеткой ЛПС-27 стимулируют воспалительную реакцию, опосредованную рецептором TLR4. ЛПС-37, напротив, проявлял выраженную антагонистическую активность в отношении TLR4-опосредованного воспалительного ответа. Иные результаты были получены при использовании макрофагов мыши линии RAW264.7: оба препарата ЛПС оказывали провоспалительное действие, но обработка клеток препаратом ЛПС-27 вызывала на три порядка более сильную продукцию провоспалительных цитокинов [6]. Помимо указанных ме-

ханизмов взаимодействия ЛПС с иммунокомпетентными клетками, характерного для многих грамотрицательных бактерий, *Y. pestis* может связываться посредством кора ЛПС с рецептором SIGNR1 (CD209b) антиген-презентирующих клеток, что способствует быстрому распространению-патогена в организме хозяина [7].

Несмотря на то, что многие стороны взаимодействия бактерий *Y. pestis* с клетками макроорганизма исследованы достаточно глубоко, отдельные особенности первичного контакта про- и эукариотической клетки нуждаются в дополнительном изучении, в том числе биофизическими методами. Представляет несомненный интерес, в частности, количественная оценка силы связи между иммунокомпетентными клетками хозяина и микробной клеткой или ее поверхностными антигенами, значимость которых в качестве лигандов возбудителя, взаимодействующих с рецепторами эукариотической клетки, экспериментально установлена или предполагается. Цель работы состояла в определении методом атомно-силовой микроскопии участия рецепторов CD14 и TLR4 во взаимодействии ЛПС *Y. pestis* с макрофагами J774.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с клеточными культурами. Мышиные макрофаги линии J774 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН) выращивали в культуральных флаконах 25 см² (Jet Biofil, Китай) с жидкой питательной средой DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (БиолоТ, Россия) в СО₂-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере углекислого газа (5%). С использованием раствора Версена клетки переносили в полистироловые чашки, на дно которых были помещены покровные стекла, и культивировали при описанных выше условиях в течение 18–22 ч.

Для проведения экспериментов по силовой спектроскопии клетки J774 после инкубации на покровных стеклах трехкратно промывали питательной средой DMEM и к клеткам добавляли питательную среду, в которой содержались мышиные моноклональные антитела к рецепторам TLR4 или CD14 (Novus Biologicals, США) в концентрации 1 мкг/мл или препарат ЛПС *Y. pestis* EV в концентрации 100 мкг/мл. В качестве контроля использовали клетки, которые инкубировали в питательной среде без добавления антител. Далее чашки с клетками 30 мин инкубировали в СО₂-инкубаторе (37°C, 5% СО₂). Затем клетки трижды промывали фосфатным буферным раствором (ФБР) для удаления не связавшихся антител или ЛПС, после чего клетки фиксировали 0.1% раствором глutarового альдегида в ФБР в течение 30 мин и трижды промывали ФБР.

Для проведения конфокальной и флуоресцентной микроскопии клетки обрабатывали таким же образом, за одним исключением. Вместо стадии инкубации клеток с моноклональными антителами или ЛПС клетки при тех же условиях инкубации обрабатывали конъюгатом моноклональных антител крысы к рецептору TLR4 (или CD14) с ФИТЦ (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 1 мкг/мл. В качестве контрольной культуры использовали клетки перевиваемой линии KB, полученной из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН.

Конфокальная и флуоресцентная микроскопия. Покровное стекло с фиксированными клетками помещали на предметное стекло с каплей монтирующей среды Eukitt (Sigma, США). Визуализацию клеточных рецепторов проводили с помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Флуоресцентные изображения были получены в режиме проходящего света с использованием микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Токио, Япония), оснащенного источником возбуждающего света X-cite 120Q (Excelitas Technologies) и двухрежимной флуоресцентной системой CytoViva® (Triple Pass). Конфокальные изображения были получены с помощью сканирующего лазерного конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия) с использованием аргонового лазера (480 нм).

Функционализация кантилевера. В работе использовали кантилеверы серии PNP-DB (NanoWorld, Швейцария). Функционализация кантилевера проходила в два этапа: модификация минеральной поверхности аминогруппами и последующая сенсibilизация препаратом ЛПС, который выделяли из культуры вакцинного штамма *Y. pestis* EV, выращенной при температуре 27°C, по Вестфалю [8]. Непосредственно перед проведением модификации кантилеверы облучали ультрафиолетом в течение 15 мин для деконтаминации поверхности и затем помещали в эксикатор, заполненный аргоном. В среду аргона вносили две емкости, содержащие 10 мкл триэтиламина (Reachem, Россия) и 30 мкл (3-аминопропил)триэтоксисилана (APTES) (Sigma-Aldrich, США), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1.5 ч. Удаление не связавшихся с минеральной поверхностью кантилевера молекул APTES проводили путем термической обработки при температуре 60°C в течение 1 ч. Сенсibilизацию кантилевера препаратом ЛПС производили с использованием бифункционального полиэтиленгликоля (ПЭГ) по методике, описанной в работе [9]. Модифицированный кантилевер помещали в 0.5 мл хлороформа, содержащего 30 мкл триэтиламина и 1 мг Acetal-PEG-NHS, предоставленного доктором Н. Gruber (Institute for Biophysics, Johannes Kepler University of Linz, Linz, Austria). По истечении 2 ч

инкубирования кантилевер трижды отмывали путем погружения в хлороформ на 5 мин. Кантилевер помещали в свежеприготовленный, профильтрованный через насадку Millipore (0.22 мкм), 1% раствор лимонной кислоты на 10 мин для перевода ацетильной группы ПЭГ в альдегидную с последующей промывкой деионизированной водой (3 раза по 5 мин). Отмытый кантилевер помещали на 1 ч в 100 мкл раствора, содержащего ЛПС в концентрации 50–100 мкг/мл и 20 мМ NaCNBH₃ (Sigma-Aldrich, США). Перед проведением данного этапа функционализации препарат липополисахарида центрифугировали (13000 g, 15 мин) для избавления от высокомолекулярных агрегатов и затем фильтровали через насадку Millipore (0.22 мкм). Альдегидные группы, не связавшиеся с ЛПС, блокировали путем добавления 5 мкл 1 М моноэтаноламина в реакционную смесь с последующей инкубацией в течение 10 мин. На завершающем этапе функционализации кантилевер промывали деионизированной водой трижды по 5 мин и осушали с помощью фильтровальной бумаги.

Силовая спектроскопия. Сканирование клеточной поверхности и определение силы межмолекулярного связывания производили с использованием атомно-силового микроскопа Ntegra Prima (NT-MDT, Россия). Перед проведением силовой спектроскопии выбирали клетку, прочно закрепленную на поверхности покровного стекла. Устанавливали область сканирования 30 × 30 мкм и производили сканирование клеточной поверхности в контактном режиме при частоте развертки 1 Гц. Разрешение полученных изображений 256 × 256 пикселей. Затем изучаемую клетку подводили к зонду кантилевера до момента контакта, после 1-с паузы образец отводили от зонда. Во время данного процесса производилась запись силовой кривой – зависимости сигнала отклонения консоли кантилевера от координаты пьезостолика с образцом. Определение коэффициента пропорциональности между сигналом фотодетектора и отклонением кантилевера для преобразования сигнала фотодетектора в значения силы производили с использованием калибровочных силовых кривых подведения чистого стекла к кантилеверу. Пример хронограмм сигнала отведения клетки от зонда в координатах “сила–расстояние” приведен на рис. 1. Последующая обработка полученных силовых кривых позволяет извлечь информацию о силе связывания между сенсibilизированным зондом и клеткой. Сканирование клеток и силовую спектроскопию производили с использованием кантилеверов серии PNP-DB (NanoWorld, Швейцария) с радиусом закругления иглы 10 нм и жесткостью консоли 0.06 нН/нм. Скорость нагружения межмолекулярной связи 60 нН/с. Все исследования с использо-

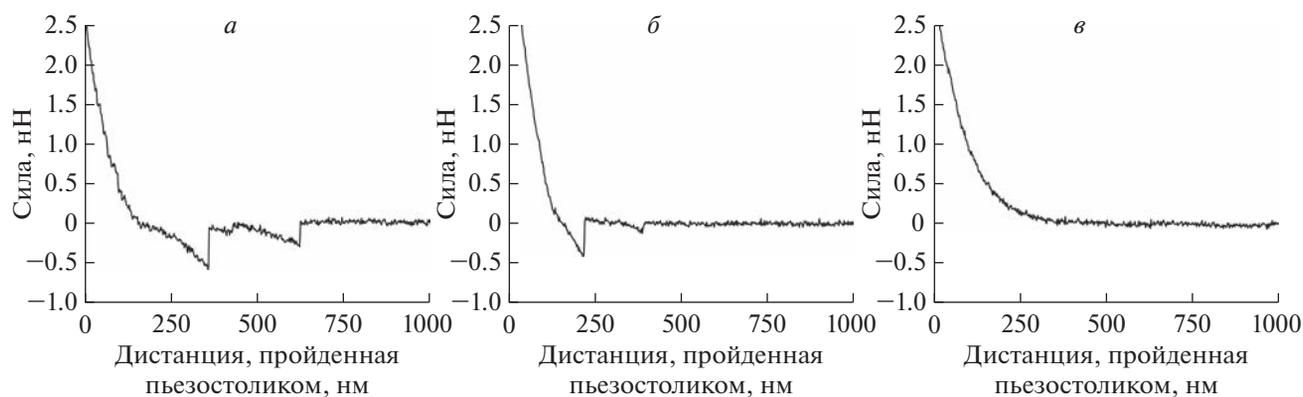


Рис. 1. Пример силовых кривых взаимодействия ЛПС-кантилевера с поверхностью интактной клетки J774 (а) и поверхностью клетки J774, обработанной моноклональными антителами к рецептору TLR4 (б), а также силовой кривой, описывающей отсутствие взаимодействия (в).

ванием атомно-силового микроскопа были выполнены в ФБР.

Статистическая обработка данных. Выбравку силовых кривых и определение силовых характеристик взаимодействия производили с использованием разработанного авторами программного обеспечения. Расчет средних значений, доверительных интервалов и достоверности различий производили с использованием программных пакетов LibreOffice Calc 6.1.5 (The Document Foundation) и Microsoft Excel 2013 (Microsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Считается, что фиксация и дегидратация образцов клеток для исследования с помощью АСМ значительно менее деструктивны, чем пробоподготовка образцов для трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии [10]. Согласно литературным данным [11], ранее уже был использован “мягкий метод” фиксации клеток глутаровым альдегидом (0.5% в течение 60 мин), который может повысить визуализацию клеточных структур и приводит примерно к трехкратному увеличению модуля упругости исследованных клеток RDX2C2.

В предварительных исследованиях мы оценивали условия иммобилизации макрофагов на поверхности стекла, позволяющие достаточно надежно и вместе с тем мягко фиксировать клетки J774 для последующих операций по сканированию ее поверхности и измерению сил связи. Оценку условий фиксации проводили, варьируя концентрацию глутарового альдегида и время экспозиции. В результате этих экспериментов было показано, что для достижения указанной цели оказалась достаточной 30-мин экспозиция покровного стекла в 0.1% растворе глутарового альдегида. Изображение сканированной типичной клетки после такой обработки культуры макрофагов J774 представлено на рис. 2.

Известно, что рецептор TLR4 продуцируется главным образом моноцитами, макрофагами и дендритными клетками, а также некоторыми неиммунными, например эндотелиальными клетками [12]. Рецептор CD14 экспрессируется в связанном с плазматической мембраной виде также большинством клеток миелоидного происхождения [13, 14]. В настоящей работе в качестве объекта исследования была использована культура клеток мышинных макрофагов J774, которые, по данным литературы, экспрессируют рецепторы TLR4 [15] и CD14 [16]. Наличие на поверхности макрофагов рецепторов TLR4 и CD14 подтверждали методом флуоресцентной и конфокальной микроскопии интактных клеток, а также клеток после их обработки конъюгатом на основе моноклональных антител к тому или иному рецептору. Контролем служили клетки эпителия ротовой полости КВ, о способности которых экспрессировать указанные рецепторы литературных данных нет.

Как показано на рис. 3, клетки J774, в отличие от клеток КВ, характеризуются значительной экспрессией клеточных рецепторов CD14 и TLR4. Это подтверждается также результатами проведенной оценки количественной флуоресценции соответствующих образцов (данные не приведены). Аналогичные данные были получены при исследовании методом конфокальной микроскопии. Так, представленные на рис. 4 микрофотографии клеток, обработанных конъюгатом с FITC моноклональных антител к CD14, свидетельствуют о существенной экспрессии этих рецепторов на поверхности клеток J774, но не КВ.

Для проверки специфичности взаимодействия рецепторов CD14 и TLR4 клеток J774 именно с ЛПС *Y. pestis* измерения силы взаимодействия ЛПС с клетками J774 методом атомно-силовой микроскопии проводили также при добавлении в среду ЛПС или моноклональных антител против рецепторов CD14 и TLR4.

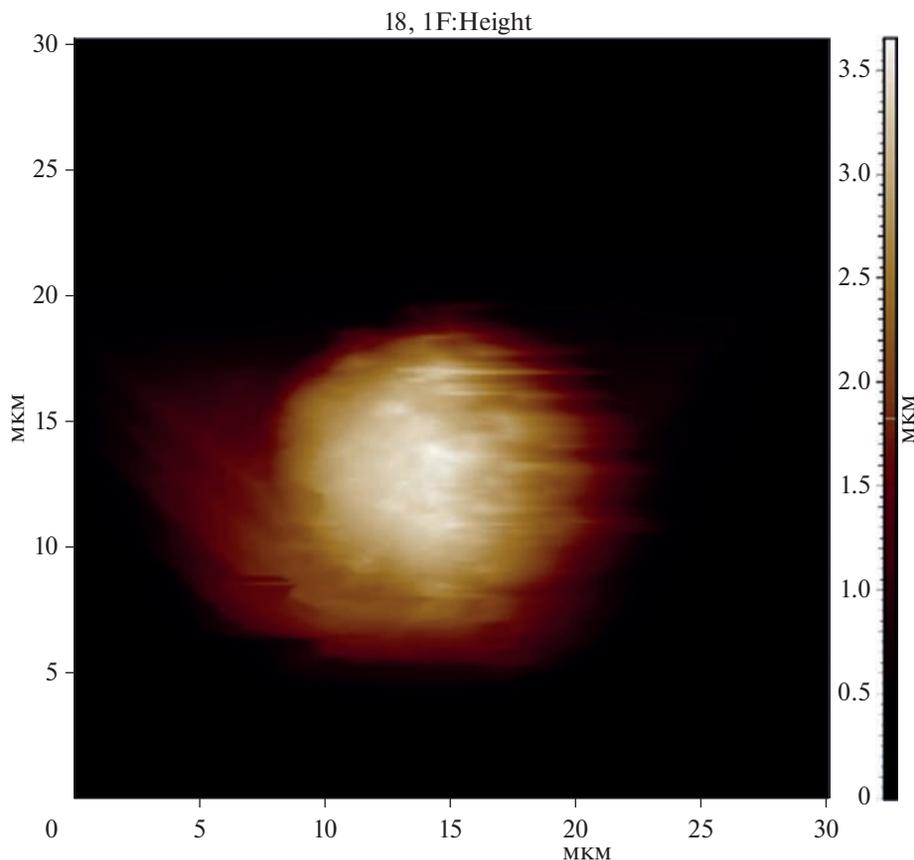


Рис. 2. АСМ-изображение поверхности макрофага J774 после обработки клеток 0.1% глутаровым альдегидом в течение 30 мин. Цветовая шкала отражает высоту объекта.

Оценка силовых характеристик взаимодействия ЛПС с поверхностью иммобилизованных макрофагов J774 методом атомно-силовой микроскопии осуществлялась с использованием следующих критериев оценки регистрируемых хронограмм сигнала фотодетектора: средняя сила разрыва последней связи; работа сил адгезии; средняя сила разрыва всех связей; средняя сила разрыва первой связи; длина ассоциата, под которой понимается расстояние от поверхности клетки до зонда (острия) кантилевера в момент разрыва последней связи; количество разрывов связей на одну силовую кривую; количество силовых кривых, имеющих как минимум один разрыв связей. Как считается, первые три критерия являются наиболее информативными при оценке силовых характеристик связи между молекулами. Разрыв последней связи характеризует межмолекулярное взаимодействие, в котором минимизировано влияние минеральной поверхности зонда или линкера на регистрируемую силу. Работа сил адгезии и средняя сила разрыва всех связей отражают интегральную характеристику взаимодействия и учитывают все образовавшиеся специфические и неспецифические связи. Схема экспериментальной установки, подробное описание методик выбра-

ковки хронограмм и обработки силовых кривых, а также описание критериев оценки силовых характеристик для системы взаимодействующих молекул приведены в работе [17]. Ключевым отличием процедуры выбраковки силовых кривых, полученных при работе с клетками, является отсутствие требования к линейности силовой кривой на участке от начала отведения до момента пересечения базисной линии, по которому определяется коэффициент пропорциональности β между сигналом фотодетектора и отклонением кантилевера. Это обусловлено сложностью поверхности клеток и их реологическими свойствами, что может приводить к значительному числу артефактов и нелинейности хронограммы сигнала на начальном этапе отведения. В этой связи для определения коэффициента пропорциональности использовали калибровочные силовые кривые взаимодействия кантилевера с чистым стеклом. В работе [17] было показано, что определенные силы чисто специфического взаимодействия даже на примере относительно простой системы “антиген–антитело” является трудновыполнимой задачей вследствие большого вклада неспецифического компонента в регистрируемое взаимодействие. Следует отметить, что взаимодействие

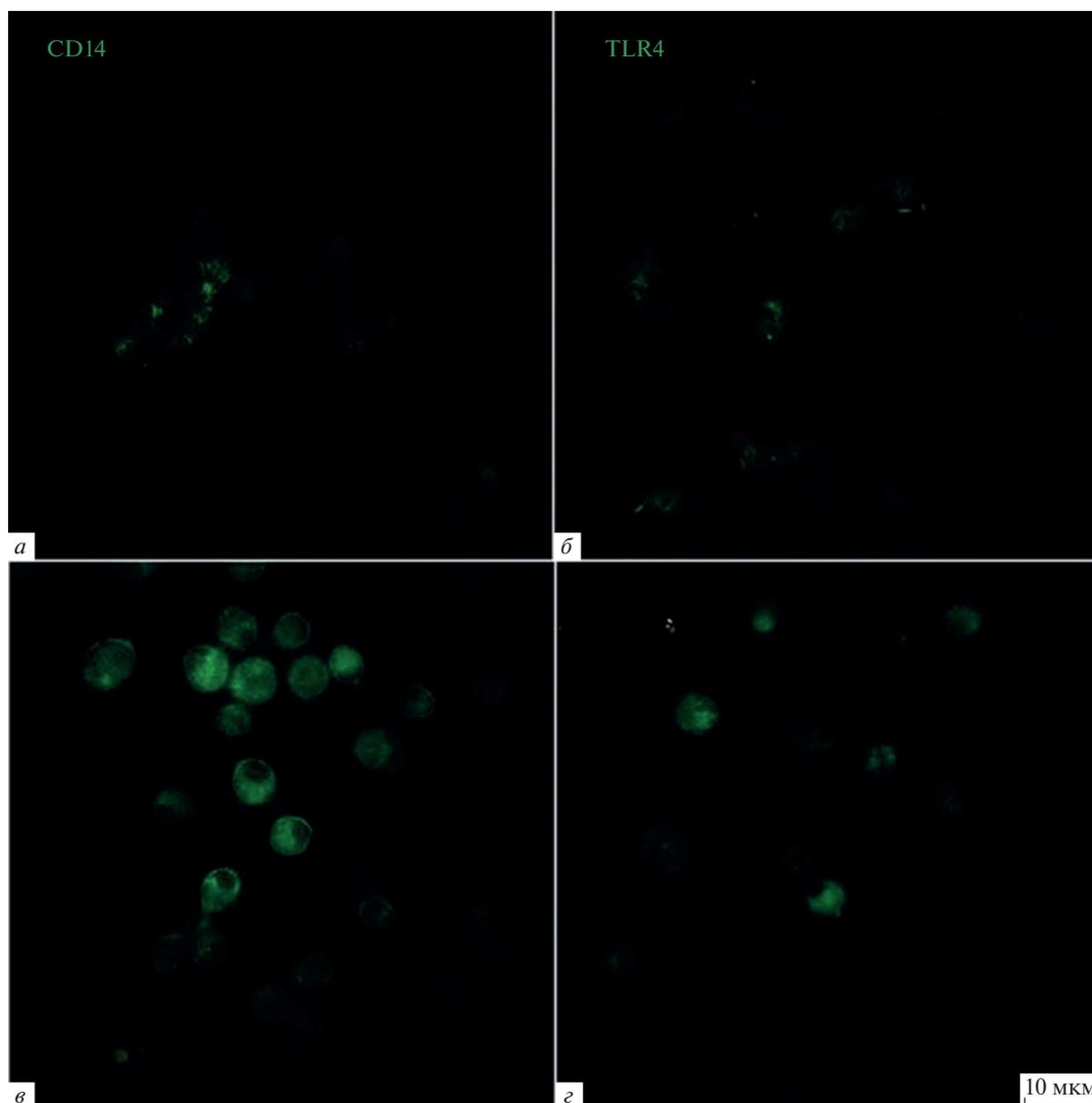


Рис. 3. Визуализация клеток KB (*а, б*) и J774 (*в, з*), обработанных моноклональными антителами к CD14 (*а, в*) и TLR4 (*б, з*), с помощью флуоресцентной микроскопии.

липополисахарида с клеточной поверхностью является более сложным, комплексным в сравнении с межмолекулярным взаимодействием “ЛПС—антитела”, описанным в статье [17], что отражается в усложнении сигнала, регистрируемого на силовой кривой.

Как известно, сила межмолекулярных связей в системах “антиген—антитело”, оцениваемая биофизическими методами, не превышает нескольких сотен пиконьютон [18]. В ходе проведения экспериментов были получены в том числе и значения силы взаимодействия в несколько наноньютон. Это, очевидно, объясняется множественностью формируемых связей между поверх-

ностью клетки и липополисахаридом, иммобилизованным на зонде. Как известно, препараты ЛПС в растворе представляют собой смесь структур различной молекулярной массы — от субъединиц этого антигена до крупномолекулярных агрегатов. Форма и размер последних зависят как от концентрации и свойств препарата ЛПС, так и от параметров среды, таких как pH, температура, наличие катионов и др. [19–21]. Даже центрифугирование и микрофильтрация препарата ЛПС, проведенные непосредственно перед процедурой сенсibilизации кантилевера, не исключают присутствия в растворе относительно крупномолекулярных агрегатов ЛПС. Регист-

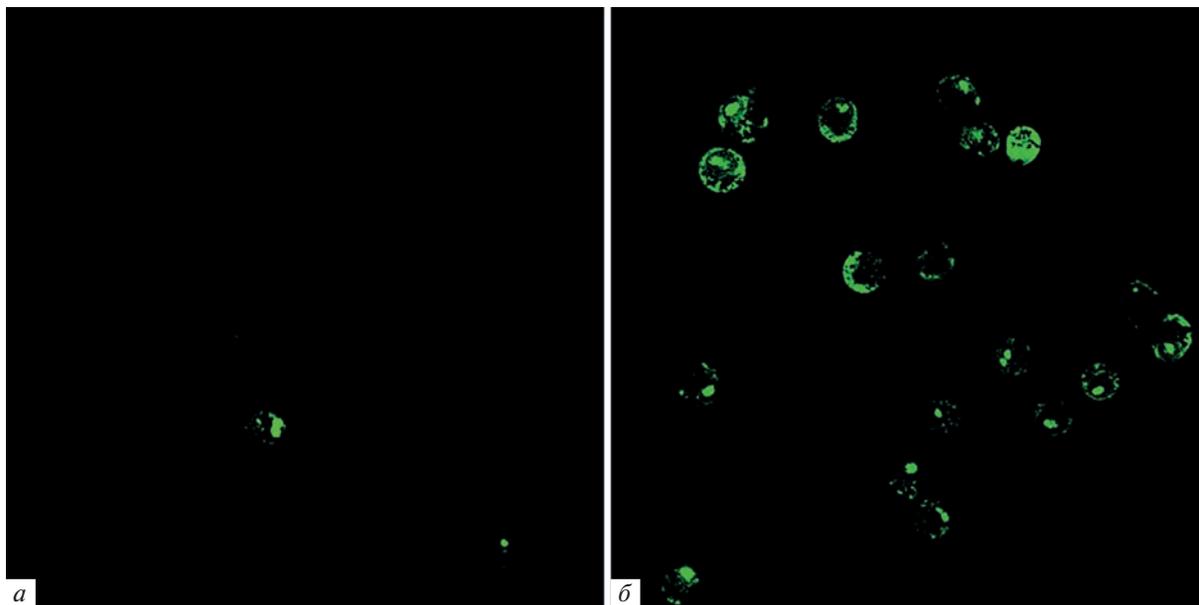


Рис. 4. Визуализация клеток KB (а) и J774 (б), обработанных моноклональными антителами к CD14, с помощью конфокальной микроскопии. Масштаб изображений тот же, что и на рис. 3.

страция высокоамплитудных отрывов определяется также и эластичностью клеточной стенки. Вышеназванные причины обуславливают формирование выраженной площади контакта между взаимодействующими объектами, вызывающее появление многочисленных специфических и неспецифических связей, которые и объясняют регистрацию значительных сил отрывов. К числу неспецифических компонентов исследуемого взаимодействия можно отнести силы, прилагаемые для “расплетания” крупномолекулярных агрегатов ЛПС. Неспецифическое связывание может определяться также вполне вероятным взаимодействием гидрофобного ЛПС с неидентифицированными гидрофобными структурами поверхности макрофага, а также электростатическим взаимодействием ЛПС с положительно заряженными участками клеточной мембраны или внеклеточного матрикса. Кроме того, возможное наличие незаблокированных аминогрупп APTEC на зонде и альдегидных групп глутарового альдегида на поверхности макрофага может вносить значительный вклад в регистрируемые силы связи. Чтобы минимизировать вклад неспецифических связей и, предположительно, множественных специфических связей ЛПС с рецепторами макрофага, силовые кривые, содержащие силы отрыва выше 1 нН, были исключены из числа подлежащих статистической обработке с помощью специально разработанной авторами программы. Данные после указанной выбраковки представлены в табл. 1.

Блокировка рецепторов TLR4 на поверхности иммобилизованных клеток J774 специфическими моноклональными антителами привела к суще-

ственному ($p < 0.01$) снижению значений силовых характеристик, в частности силы первого и последнего отрывов, средней силы всех отрывов, а также работы сил адгезии, в сравнении с интактными клетками. В целом, аналогичное, но немногим менее выраженное ослабление сил связи по оцениваемым параметрам зарегистрировано для клеток J774 с заблокированным моноклональными антителами рецептором CD14, за исключением амплитуды первого и последнего отрывов. Для указанных параметров различия между заблокированными и интактными клетками достоверны с меньшей и приблизительно одинаковой вероятностью ($p \sim 0.05$). Роль рецепторов в связывании липополисахарида косвенно подтверждается их блокировкой препаратом ЛПС *Y. pestis* EV. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными [6], свидетельствующими о способности ЛПС взаимодействовать с рецептором TLR4 в составе плазматической мембраны макрофагов без предварительного связывания с рецептором CD14. Представленные в табл. 1 данные указывают на то, что взаимодействие ЛПС *Y. pestis* с рецептором CD14 может происходить и без участия липополисахарид-связывающего белка. Вполне вероятно также, что водорастворимый ЛПС может связываться с рецептором CD209b макрофагов линии J774 и рецептором CD207 клеток Лангерганса, препятствуя взаимодействию с ним ЛПС, иммобилизованного на зонде, что, в целом, приводит к снижению силовых характеристик. Такое предположение согласуется с данными К. Yang и соавт., показавших, что чумной микроб за счет коровой области ЛПС может связываться с этими рецепторами у антигенпрезен-

Таблица 1. Силовые характеристики взаимодействия ЛПС с поверхностью клеток J774

Показатель	Значение показателя ($X_{\text{mean}} \pm I_{99}$) для клеток			
	J774 (контроль, не обработаны)	J774 + anti-TLR4	J774 + anti-CD14	J774 + ЛПС
Сила последнего отрыва, нН	0.216 ± 0.031	0.164 ± 0.029	0.183 ± 0.033	0.189 ± 0.043
Работа сил адгезии, Дж × 10 ⁻¹⁵	0.31 ± 0.06	0.20 ± 0.06	0.19 ± 0.05	0.17 ± 0.07
Средняя сила всех отрывов, нН	0.253 ± 0.020	0.190 ± 0.020	0.210 ± 0.018	0.187 ± 0.029
Сила первого отрыва, нН	0.254 ± 0.033	0.203 ± 0.031	0.218 ± 0.031	0.201 ± 0.041
Длина ассоциата, нм	396.5 ± 61.6	486.8 ± 83.0	425.1 ± 72.0	428.5 ± 95.9
Количество отрывов	2.13 ± 0.20	2.06 ± 0.27	2.14 ± 0.19	1.67 ± 0.25
Количество отведений с отрывами, %	57.0	47.9	44.2	31.1
Количество опытов	325	277	282	183

тирующих клеток [7, 22]. Следует отметить, что каждый из трех вариантов блокировки (с помощью ЛПС или моноклональных антител к CD14 и TLR4) снижает вероятность связывания липополисахарида, иммобилизованного на кантелевере, с клеточной поверхностью, на что указывает сокращение “количества отведений с отрывами” (табл. 1).

Таким образом, в ходе проведенных исследований методом атомно-силовой микроскопии с использованием комплементарных моноклональных антител к рецепторам CD14 и TLR4 показано взаимодействие липополисахарида *Y. pestis* с рецепторами CD14 и TLR4 на поверхности макрофагов J774. Разработанная экспериментальная модель может использоваться в дальнейшем для исследований эффективности препаратов, модулирующих взаимодействие липополисахарида *Y. pestis* с рецепторами CD14 и TLR4 и влияющих на эффективность заражения клеток патогеном.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (исследования по конфокальной и флуоресцентной микроскопии выполнены за счет средств проекта № 21-74-10034) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90013).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Книрель Ю.А., Анисимов А.П. 2012. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства. *Acta Naturae*. **4** (3), 49–61.
- Leo J.C., Skurnik M. 2011. Adhesins of human pathogens from the genus *Yersinia*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 1–15.
- Конышев И.В., Иванов С.А., Копылов П.Х., Анисимов А.П., Дентовская С.В., Бывалов А.А. 2022. Роль антигенов *Yersinia pestis* в адгезии к макрофагам J774. *Прикладная биохимия и микробиология*. **58** (4), 352–359.
- Park B.S., Lee J.O. 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* **45** (12), e66.
- Kim S.J., Kim H.M. 2017. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. *BMB Rep.* **50** (2), 55–57.
- Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H., Saito S., Kawahara K. 2010. Immunomodulatory effects of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. *Clin. Vaccine Immunol.* **17** (1), 49–55.
- Yang K., He Y., Park C.G., Kang Y.S., Zhang P., Han Y., Cui Y., Bulgheresi S., Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Ying X., Jiang L., Ding H., Njiri O.A., Zhang S., Zheng G., Xia L., Kan B., Wang X., Jing H., Yan M., Li W., Wang Y., Xiamu X., Chen G., Ma D., Bartra S.S., Plano G.V., Klena J.D., Yang R., Skurnik M., Chen T. 2019. *Yersinia pestis* interacts with SIGNR1 (CD209b) for promoting host dissemination and infection. *Front Immunol.* **10**, 96.
- Westphal O., Jann K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenolwater and further applications of the procedure. *Methodes Carbohydr. Chem.* **5**, 83–91.
- Ebner A., Wildling L., Gruber H.J. 2019. Functionalization of AFM tips and supports for molecular recognition force spectroscopy and recognition imaging. *Methods Mol. Biol.* **1886**, 117–151.
- Pi J., Cai J. 2019. Cell topography and its quantitative imaging by AFM. In: *Atomic Force Microscopy: Methods and Protocols*. Eds Santos N.C., Carvalho F.A. New York: Humana New York, p. 99–113.
- Hutter J.L., Chen J., Wan W.K., Uniyal S., Leabu M., Chan B.M.C. 2005. Atomic force microscopy investigation of the dependence of cellular elastic moduli on glutaraldehyde fixation. *J. Microscopy*. **219** (2), 61–68.
- Vaure C., Liu Y. 2014. A comparative review of Toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.* **5**, 316.
- Mahnke K., Becher E., Ricciardi-Castagnoli P., Luger T.A., Schwarz T., Grabbe S. 1997. CD14 is expressed by subsets of murine dendritic cells and upreg-

- ulated by lipopolysaccharide. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**, 145–159.
14. Sabroe I., Jones E.C., Usher L.R., Whyte M.K.B., Dower S.K. 2002. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: A critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol.* **168**, 4701–4710.
 15. Choi S.-H., Harkewicz R., Lee J.H., Boullier A., Almazan F., Li A.C., Witztum J.L., Bae Y.S., Miller Y.I. 2009. Lipoprotein accumulation in macrophages via TLR4-dependent fluid phase uptake. *Circ. Res.* **104** (12), 1355–1363.
 16. Wei M.-T., Hua K.-F., Hsu J., Karmenyan A., Tseng K.-Y., Wong C.-H., Hsu H.-Y., Chiou A. 2007. The interaction of lipopolysaccharide with membrane receptors on macrophages pretreated with extract of Reishi polysaccharides measured by optical tweezers. *Optics Express.* **15**, 11020–11032.
 17. Бывалов А.А., Белозёров В.С., Ананченко Б.А., Коньшев И.В. 2022. Специфические и неспецифические взаимодействия липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* с моноклональными антителами, охарактеризованные методом атомно-силовой микроскопии. *Биофизика.* **67** (6), 1056–1067.
 18. Arnal L., Longo G., Stupar P., Castez M.F., Cattelan N., Salvarezza R.C., Yantorno O.M., Kasas S., Vela M.E. 2015. Localization of adhesins on the surface of a pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy. *Nanoscale.* **7** (41), 17563–17572.
 19. Richter W., Vogel V., Howe J., Steiniger F., Brauser F., Koch M.H.J., Roessle M., Gutschmann T., Garidel P., Mäntele W., Brandenburg K. 2010. Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin. *Innate Immunity.* **17** (5), 1–12.
 20. Bergstrand A., Svanberg C., Langton M., Nyden M. 2006. Aggregation behavior and size of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O55:B5. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **53** (1), 9–14.
 21. Santos N.C., Silva A.C., Castanho M.A., Martins-Silva J., Saldanha C. 2003. Evaluation of lipopolysaccharide aggregation by light scattering spectroscopy. *Chembiochem.* **4** (1), 96–100.
 22. Yang K., Park C.G., Cheong C., Bulgheresi S., Zhang S., Zhang P., He Y., Jiang L., Huang H., Ding H., Wu Y., Wang S., Zhang L., Li A., Xia L., Bartra S.S., Plano G.V., Skurnik M., Klena J.D., Chen T. 2015. Host Langerin (CD207) is a receptor for *Yersinia pestis* phagocytosis and promotes dissemination. *Immunol. Cell Biol.* **93** (9), 815–824.

Force Characteristics of *Yersinia pestis* Lipopolysaccharide Interaction with TLR4 and CD14 Receptors on J774 Macrophages. Atomic Force Microscopy

V. S. Belozherov^{1, 2}, B. A. Ananchenko¹, I. V. Konyshov^{1, 2}, L. G. Dudina^{1, 2},
S. A. Konnova³, E. V. Rozhina³, R. F. Fakhrullin³, A. A. Byvalov^{1, 2, *}

¹Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia

²Institute of Physiology, Komi Science Centre, Urals Branch of Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Komi Republic, 167982 Russia

³Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Privolzhsky) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia

*e-mail: byvalov@nextmail.ru

One of the main stages of infectious process, which mostly determines the course and outcome of the disease, is the initial contact of the pathogen with the host cells. The lipopolysaccharide as a component of the outer membrane is crucially involved in the interaction between Gram-negative bacteria and immunocompetent host cells. It triggers immune reactions by interaction with specific receptors, mainly CD14 and TLR4. The aim of this work was to quantify the force characteristics of the interaction of *Yersinia pestis* EV lipopolysaccharide with CD14 and TLR4 receptors on the surface of mouse macrophages J774 by atomic force microscopy. Lipopolysaccharide was extracted from *Y. pestis* cells (vaccine strain EV) grown at 27°C. The expression of receptors on the cell surface was evaluated by fluorescent and confocal microscopy. Using monoclonal antibodies against CD14 and TLR4 receptors, force spectroscopy was used to estimate the force characteristics of the interaction between lipopolysaccharide on the cantilever surface and J774 macrophages immobilized on a glass substrate. The conditions for immobilization of J774 macrophages on glass were developed that allowed scanning the cell surface and estimating the adhesion force of target antigens to the cells. Incubation of macrophages in solutions with monoclonal antibodies against CD14 and TLR4 receptors caused a decrease in the major force characteristics of the interaction in the J774 macrophage – *Y. pestis* lipopolysaccharide system compared to the system containing untreated macrophages. A similar effect was observed after pretreatment of the cells with a solution containing the same lipopolysaccharide without monoclonal antibodies. The results show the ability of the *Y. pestis* lipopolysaccharide chemically bound to the cantilever to interact with CD14 and TLR4 receptors on the macrophage surface.

Keywords: *Yersinia pestis*, lipopolysaccharide, receptor, CD14, TLR4, macrophages J774, atomic force microscopy

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0233475523040072, EDN: ZAOOVH

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Журнал *Биологические мембраны* публикует статьи, обзоры и краткие сообщения, освещающие различные, прежде всего физико-химические и молекулярные аспекты функционирования клеток и клеточных систем. Приоритетными являются работы в области клеточной и молекулярной мембранологии и биофизики, а также работы, в которых представлены клеточные и молекулярные аспекты физиологии, фармакологии, иммунологии и медицины. Журнал принимает как экспериментальные, так и теоретические работы в указанных направлениях.

Приветствуются экспериментальные работы, в которых исследуются связь между структурой и функцией мембран, молекулярные механизмы мембранного транспорта, рецепторные системы и внутриклеточная сигнализация, клеточные функции и клеточные патологии, ассоциированные с плазматической мембраной клеток (рецепторы, ионные каналы, экзоцитоз, эндоцитоз, фагоцитоз, межклеточные контакты и др.) и с мембранами внутриклеточных структур (биоэнергетика, фотосинтез, ядерно-цитоплазматические отношения, апоптоз, Ca²⁺-сигнализация и др.).

Предпочтение отдается теоретическим работам, в которых рассматриваются физико-химические свойства мембранных систем в рамках моделей различного уровня детализации, моделируются структура и динамика молекулярных систем, функционирующих в биологических мембранах и в клетке в целом, предлагаются математические модели сигнальных и регуляторных процессов, обеспечивающих жизнедеятельность клеток и клеточных систем.

Английская версия журнала называется “Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology” и распространяется издательством Springer (<http://www.springer.com>).

Типы публикаций. Основным типом публикаций является исследовательская статья, в которой представлены результаты оригинальных экспериментальных и теоретических работ. Рукопись должна преимущественно содержать новые, ранее не опубликованные данные. Допускается использование собственных, уже представленных материалов, если таковые были опубликованы в виде краткого сообщения или тезисов доклада. Ссылка на предварительное сообщение обязательна.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в кратком виде в разделе *Краткие сообщения*. Целесообразность такой внеочередной публикации долж-

на быть обоснована в письме, направляемом Главному редактору автором для корреспонденции. В случае принятия такая работа может быть опубликована в течение 3–4 месяцев.

Журнал публикует *обзоры* и *мини-обзоры*, отражающие существующие представления и важнейшие достижения в области мембранологии, биофизики и биологии клетки, молекулярной и клеточной физиологии, иммунологии и медицины.

Отправляя рукопись в журнал, автор гарантирует, что соответствующий материал (в оригинале или в переводе на другие языки или с других языков) ранее нигде не публиковался и не находится на рассмотрении для публикации в других журналах. Журнал поддерживает стандарты публикационной этики (<https://www.pleiades.online/ru/authors/publication-ethics/>) и просит авторов размещать в статье необходимую информацию, связанную с их соблюдением (<https://www.pleiades.online/ru/authors/guidelines/reference-information/>).

Рукописи необходимо отправлять через Издательский портал <https://publish.sciencejournals.ru/> или по электронной почте на адрес редакции: biomembranes2010@gmail.com.

ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ СТАТЕЙ

Формат статей. Рукопись должна быть написана либо на русском, либо на английском языке. Текст печатается шрифтом Times New Roman (12 pt), через 1.5 интервала, с полями 3 см слева и 2.5 см сверху, справа и снизу. Объем исследовательской статьи (включая аннотацию, основной текст, таблицы, список литературы и подписи к рисункам) не должен превышать 8000 слов и 8 рисунков, обзора — 12000 слов и 8 рисунков, мини-обзора — 4000 слов и 3 рисунка, краткого сообщения — 2000 слов и 1 рисунок. Правила оформления рукописи размещены на сайте <https://www.pleiades.online/ru/authors/guidelines/prepare-electronic-version/>.

Рукопись надлежит представлять в электронном виде. Следует присылать единый прикрепленный файл, не превышающий 15 Мб, в формате MS Word (*.doc), содержащий текст, таблицы и рисунки (обычно черно-белые) в последовательности, изложенной ниже. При необходимости файлы рекомендуются сжимать в стандарте *WinZip* или *WinRAR*. Цветные иллюстрации принимаются по согласованию с редакцией.

Сопроводительные документы. Рукопись статьи должна сопровождаться: (а) письмом-направлением

от автора для корреспонденции, в котором констатируется, что данная работа (название, авторы) направляется для опубликования в журнале *Биологические мембраны* и что все авторы согласны с направлением статьи в журнал; (б) заполненными бланками договоров о передаче авторского права на использование материалов для русской и английской версий журнала. Бланки договоров размещены на сайтах <https://www.sciencejournals.ru> и <https://www.pleiades.online>. В случае отклонения статьи договор в силу не вступает.

Сопроводительные документы принимаются в электронном виде. Письмо-направление от учреждения с подписью руководителя и печатью, заполненные и подписанные бланки договоров и титульная страница статьи (см. ниже) с подписями всех авторов сканируются и посылаются (biomembranes2010@gmail.com) в формате jpeg или pdf.

При наличии в авторском коллективе зарубежных соавторов их согласие индивидуально подтверждается письмом, посылаемым в редакцию по электронной почте (biomembranes2010@gmail.com) на имя Главного редактора.

Порядок представления материалов. При оформлении статьи необходимо придерживаться следующего порядка.

Титульная страница:

- индекс УДК (в левом верхнем углу);
- заглавие статьи (не более 150 знаков без пробелов);
- инициалы и фамилии авторов;
- полное название учреждения(ий), почтовый индекс, город, страна;
- инициалы и фамилия автора для корреспонденции с указанием почтового адреса, контактного телефона, факса, электронного адреса;
- ключевые слова (3–6);
- количество слов в основном тексте;
- количество таблиц;
- количество рисунков;
- подписи всех авторов.

Основной текст:

- индекс УДК (в левом верхнем углу);
- заглавие статьи (не более 150 знаков, не считая интервалы);
- инициалы и фамилии авторов;
- полное название учреждения(ий), почтовый индекс, город, страна;
- аннотация (до 300 слов)
- ключевые слова (3–6);
- введение
- материалы и методы;
- результаты;
- обсуждение (или результаты и обсуждение)
- благодарности (отдельный абзац без заголовка)
- таблицы (каждая на отдельной странице);

- подписи к рисункам (на отдельной странице);
- список цитированной литературы (на отдельной странице);
- резюме на английском языке или на русском, если основной текст представлен на английском (до 300 слов, на отдельной странице);
- рисунки (пронумерованные, каждый на отдельной странице).

Расположение основных материалов теоретической работы произвольно, хотя следует в целом придерживаться последовательности, изложенной выше. Уравнения должны быть напечатаны предпочтительно с помощью Microsoft Equation Editor. Не рекомендуется использование символов корней, вместо них должны использоваться дробные показатели степени. Двоеточие не должно использоваться как знак деления. Уравнения должны нумероваться с правой стороны в скобках. Символы должны быть определены при первом упоминании в тексте.

Математические модели должны быть представлены таким образом, чтобы для широкого круга читателей было понятно, какая система (молекулярная, клеточная и др.) или процесс моделируется, каковы исходные постулаты модели и целесообразность ее использования для описания процесса или системы, а также ограничения модели. Методы решения уравнений модели должны быть описаны в деталях, достаточных для их воспроизведения. Коммерческие программы и используемые в них алгоритмы должны быть упомянуты. Основополагающие детали вывода уравнений и/или их решения могут быть представлены в Приложении, помещаемом в конце работы.

Аннотация (не более 300 слов) обязательна для статьи (обзора) и должна давать ясное представление о сути работы, объектах и методах исследования, основных результатах и сделанных выводах.

Раздел **Материалы и методы** должен содержать информацию о методах исследования, достаточную для их ясного понимания и воспроизведения. Методы, описанные ранее, могут быть представлены в краткой форме и должны сопровождаться адекватными ссылками. Необходимо указывать квалификацию и источник основных реактивов; название (в оригинальной транскрипции) фирмы-изготовителя реактивов/оборудования и страна приводятся в скобках (Serva, Германия). Используемые статистические методы обработки данных, графические программы и т.п. также должны быть указаны.

Таблицы (и рисунки) нумеруются в порядке упоминания их в тексте. Каждая таблица должна иметь заголовок и, если необходимо, краткие пояснения к представленным данным (условия эксперимента, число экспериментов и т.п.).

Рисунки должны быть выполнены с разрешением не менее 300 dpi и в масштабе, допускающем их двукратное уменьшение без потери качества. В сложных рисунках со множественными

панелями каждую следует пометить курсивной буквой (*a, b, в ...*). На графиках следует использовать стандартные символы (▲ ▼ ● ○ ◆ □ ■). В нижней части рисунка необходимо указать его порядковый номер и фамилию первого автора.

Электронные версии штриховых рисунков и полутонных фотографий должны представляться в формате JPEG или TIFF.

Цитирование литературы. Ссылка на цитируемую работу дается в тексте цифрой в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Если ссылка на работу есть в таблице или в подписи к рисунку, ей присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Авторы несут полную ответственность за правильность цитирования работ. Последние должны быть либо опубликованными, либо принятыми в печать. Ссылки на тезисы докладов, диссертации, авторские свидетельства следует приводить только, если они являются единственным источником. Цитирования типа “неопубликованные данные” или “персональное сообщение” не должны включаться в список литературы, но допускаются в тексте (например, Прутков К.Ф., персональное сообщение). При этом предполагается, что авторы получили разрешение на цитирование в какой-либо форме.

Список цитированной литературы должен оформляться следующим образом:

Статья в журнале

Карпушев А.В., Павлов Т.С., Старушенко А.В. 2009. Регуляция эпителиальных натриевых каналов (ENaC) малыми G-белками и фосфатидилинозитидами. *Биол. мембраны*. **26** (4), 265–279.

Takeuchi H., Imanaka Y., Hirono H., Kurahashi T. 2003. Cross-adaptation between olfactory responses induced by two-subgroups of odorant molecules. *J. Gen. Physiol.* **122**, 255–264.

Книга

Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. 1980. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 320 с.

Hille B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 607 p.

Статья в книге

Леднев В.В. 1977. Исследование структуры актинсодержащих нитей методом дифракции рентгеновских лучей. В кн.: *Молекулярная и клеточная биофизика*. Ред. Франк Г.М. М.: Наука, с. 164–172.

Keating M.T. 1995. Molecular genetics of the long QT syndrome. In: *Ion channels and genetic diseases*. Eds Dawson D.C., Frizzell R.A. New York: The Rockefeller University Press, p. 53–60.

Статья, принятая в печать

Додонова С.О., Крупенина Н.А., Булычев А.А. 2010. Подавление H^+ -проводимости плазмалеммы на фоне высокой активности H^+ -насоса в клетках *Chara* под действием дитиотреитола. *Биол. мембраны* (в печати).

Во многих международных журналах статьи, принятые в печать, публикуются в электронном виде до выхода бумажной версии. При этом статьи идентифицируются с использованием DOI (digital object identifier), и их следует цитировать в оригинальном формате:

Komaki S., Abe T, Coutuer S., Inze D., Russinova E., Hashimoto T 2010. Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in *Arabidopsis*. *J. Cell Sci.* doi 10.1242/jcs.062703

Если работы, которые цитировались как *в печати*, были опубликованы на момент получения корректуры, авторы должны внести необходимые исправления в список литературы.

Сокращения и аббревиатуры. Стандартные сокращения, рекомендованные комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB (*Eur. J. Biochem.* 1977, **74** (1), 1–6), могут быть использованы непосредственно. Нестандартные сокращения химических соединений, сокращения общего характера разрешается вводить лишь в случае многократного употребления. Их следует ввести (в скобках) при первом же использовании сложного словосочетания в основном тексте статьи, например: активные формы кислорода (АФК).

Аббревиатуры или формулы химических соединений, употребляемые как прилагательные, пишутся через дефис: ИК-спектроскопия, ЖК-состояние, Na^+ -форма, ОН-группа, но группа ОН.

Размерности отделяются от цифры пробелом (100 кПА, 77 К), кроме градусов, процентов и промилле: 90°, 20°C (для градусов Цельсия 20°C, а не 20°), 45%, 10‰. Дробные размерности: 58 Дж/моль, 10 моль/л. Для более сложных размерностей допускается использование степеней, в том числе отрицательных; символы различных размерностей должны быть отделены пробелом: 9.8 м/с² или 9.8 м с⁻², 37 Дж моль⁻¹ град⁻¹. Единообразие написания размерностей в рукописи является обязательным.

При перечислении, а также в числовых интервалах размерность приводится лишь для последнего числа (10–30 Дж/моль, 22–25°C), за исключением угловых градусов (5°–10°, а не 5–10°). Размерности переменных пишутся через запятую (*E*, кДж/моль).

Специальные символы и цифры. Для печати специальных символов (греческие буквы, математические символы, графические символы и т.п.) следует использовать функцию *Insert Symbol* в редакторе *Microsoft Word*. Десятичные доли в числах отделяются точкой (3.14, а не 3,14).

Репринты. После выхода журнала издательство высылает авторам бесплатно PDF-файлы русской и английской версии статьи.

Адрес редакции: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии РАН, корп. 32, комн. 411, редакция журнала *Биологические мембраны*. Телефон редакции: 8(499)724-80-89. E-mail: biomembranes2010@gmail.com.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Сокращения часто употребляемых слов и терминов

БЛМ	Бислойные (бимолекулярные) липидные мембраны	н.	Нормальный (раствор)
<i>втор-</i>	Вторичный	ОЕ	Оптическая единица
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография	ПААГ	Полиакриламидный гель
ГЖХ	Газожидкостная хроматография	п. о.	Пары оснований
ед. акт.	Единица активности	т. п. о.	Тысяча пар оснований
ИК	Инфракрасный	т. кип.	Температура кипения
КД	Круговой дихроизм	т. пл.	Температура плавления
КР	Комбинационное рассеяние	<i>трет-</i>	Третичный
КССВ	Константа спин-спинового взаимодействия	ТСХ	Хроматография в тонком слое
МЕ	Международная единица	УФ	Ультрафиолетовый
<i>м-, о-, п-</i>	<i>мета-, орто-, пара-</i>	ЭПР	Электронный парамагнитный резонанс
<i>н</i>	Нормальный (изомер)	ЯМР	Ядерный магнитный резонанс

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота	FAD	Флавинадениндинуклеотид
ДНКаз	Дезоксирибонуклеаза	FCCP	Карбонилцианид-4-трифторметокси-фенилгидразон
РНК	Рибонуклеиновая кислота	FMN	Флавиномононуклеотид
РНКаз	Рибонуклеаза	GA	Грамицидин А
Трис	Трис(оксиметил)аминометан	Gpp(NH)p	Гуанозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат
ADP	Аденозин-5'-дифосфат	HEPES	4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
AMP	Аденозин-5'-фосфат	MES	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
сAMP	Аденозин-3',5'-циклофосфат	MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота
ANS	1-Анилинафталин-8-сульфонат	NAD, NAD ⁺ , NADH	Никотинамидадениндинуклеотид и его окисленная и восстановленная формы
ATP	Аденозин-5'-трифосфат	NADP, NADP ⁺ , NADPH	Никотинамидадениндинуклеотид-фосфат и его окисленная и восстановленная формы
ATP-аза	Аденозинтрифосфатаза	P _i	Неорганический фосфат
СССР	Карбонилцианид- <i>м</i> -хлорфенилгидразон	PP _i	Неорганический пирофосфат
СМ-целлюлоза	Карбоксиметилцеллюлоза	poly(A)	(3'-5')Поли(адениловая кислота)
Con A	Конканавалин А	POPOP	1,4-Бис[2-(5-фенил)оксазолил]бензол
DCC	N,N'-дициклогексилкарбодиимид	PPO	2,5-Дифенилоксазол
DEAE-целлюлоза	Диэтиламиноэтилцеллюлоза	SDS	Додецилсульфат натрия
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота	TAPS	3-{[2-Гидрокси-1,1-бис(гидрокси-метил)этил]амино}-1-пропансульфоновая кислота
EGTA	Этиленгликольбис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусная кислота		

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Символы для некоторых физических и химических величин и единицы их измерения

Символ	Величина	Единица измерения
m	Масса	г, мг, мкг и т.д.
M	Молекулярная масса	Да ^а (дальтон)
M_r	Относительная молекулярная масса	безразмерная
c_B или [B]	Концентрация вещества В	М (моль/л), mM и т.д.
n	Количество вещества	моль, нмоль, мкмоль и т.д.
s	Коэффициент седиментации	S (сведберг, 10^{-13} с)
T	Термодинамическая температура	К ^б (кельвин)
t	Температура по Цельсию	°C
E	Энергия	Дж или кал (4.1868 Дж)
P	Давление	Па (паскаль), или атм (101325 Па), или мм рт. ст. (133.2 Па)
I	Ионная сила	М, mM и т.д.
I	Интенсивность излучения	безразмерная
A	Поглощение ^в ($-\lg I/I_0$)	безразмерная
ϵ	Молярный коэффициент поглощения ^г	М ⁻¹ см ⁻¹
λ	Длина волны	нм
Le	Радиоактивность (излучательная способность)	Бк (беккерель, с ⁻¹) или Ки (3.7×10^{10} Бк)
t	Время	с (не сек), мин, ч (не час), сут (не сутки)
V	Объем	дм ³ (л), см ³ (мл), мкл и т.д.
K	Константа равновесия	моль/л
K_m	Константа Михаэлиса	М, mM
K_s	Субстратная константа	То же
K_i	Константа ингибирования	»
k	Константа скорости	с ⁻¹ или М ⁻¹ с ⁻¹
$k_{кат}$	Каталитическая константа	с ⁻¹
v	Скорость превращения	моль/с
V или V_{max}	Максимальная скорость	моль л ⁻¹ с ⁻¹
h или n_H	Коэффициент Хилла	безразмерный
U	Напряжение	В (вольт)
I	Сила тока	А (ампер)
C	Емкость	Ф (фарада)
R	Сопротивление	Ом
G	Проводимость	См (сименс)
$\Delta\mu_{H^+}$	Градиент электрохимического потенциала	В (вольт)
$\Delta\psi$	Разность электрических потенциалов на мембране	В (вольт)
E , или V_m , или $\Delta\phi$	Мембранный потенциал	В (вольт)

^а 1/12 массы чистого изотопа ¹²C.^б Не °K.^в Англ. "absorbance" – поглощательная способность.^г Термин "экстинкция" употреблять не рекомендуется.