

Том 89, Номер 7

ISSN 0320-9725
Июль 2024



БИОХИМИЯ



СОДЕРЖАНИЕ

Том 89, № 7, 2024

- Фармакологические дозы тиамина улучшают состояние пациентов с невропатией Шарко–Мари–Тута, изменяя уровень тиаминдифосфата и регуляцию зависимых от него ферментов
А.В. Артюхов, О.Н. Соловьева, Н.В. Балашова, О.П. Сидорова, А.В. Граф, В.И. Буник 1149
- Применение qPCR для оценки эффективности удаления объемных повреждений ДНК в экстрактах клеток млекопитающих с различной максимальной продолжительностью жизни
А.А. Попов, В.А. Шаманин, И.О. Петрусева, А.Н. Евдокимов, О.И. Лаврик 1174
- Генетические особенности метаболизма липидов и углеводов у арктических народов (обзор)
Б.А. Малярчук 1184
- Линии дермальных фибробластов от пациента с болезнью Хантингтона как перспективная модель для изучения патогенеза заболевания: получение и характеристика
Н. Красковская, А. Кольцова, П. Парфенова, А. Шатрова, Н. Ярцева, В. Назаров, Е. Девяткина, М. Хотин, Н. Михайлова 1194
- Содержание первичных и вторичных каротиноидов в клетках криотолерантной микроводоросли *Chloromonas reticulata*
О.В. Дымова, В.С. Паршуков, И.В. Новаковская, Е.Н. Патова 1208
- Миозин и тонкий филамент миокарда – мишени двухвалентных катионов свинца и кадмия
О.П. Герцен, Ю.К. Потоскуева, А.Е. Цыбина, Т.А. Мячина, Л.В. Никитина 1218
- Разнонаправленные механизмы действия генов семейства *TRIM* в ответе врожденной иммунной системы на бактериальные инфекции (обзор)
В.В. Ненашева, Е.А. Степаненко, В.З. Тарантул 1229
- Влияние дозозависимого ингибирования протеинкиназы mTOR на уровень белков аутофаголизосомной системы и альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов периферической крови человека и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y – оценка перспективы терапии болезни Паркинсона
А.И. Безрукова, К.С. Башарова, Г.В. Байдакова, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина, Т.С. Усенко 1248
- Фемтосекундная динамика возбужденного первичного донора электрона в реакционных центрах пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*
А.М. Христин, Т.Ю. Фуфина, Р.А. Хатыпов 1263
- Механизм стимуляции миогенеза под действием янтарной кислоты через сукцинатный рецептор SUCNR1
Ю.В. Абаленихина, М.О. Исаева, П.Ю. Мыльников, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева 1276

Различия влияния бета-гидроксипутирата на биогенез митохондрий, маркеры окислительного стресса и воспаления в тканях молодых и старых крыс

В.В. Нестерова, П.И. Бабенкова, А.А. Брезгунова, Н.А. Самойлова, И.С. Садовникова, Д.С. Семенович, Н.В. Андрианова, А.П. Гуреев, Е.Ю. Плотников

1288

CONTENTS

Vol. 89, Issue 7, 2024

- Pharmacological Doses of Thiamine Benefit Patients with Charcot–Marie–Tooth Neuropathy, Changing the Thiamine Diphosphate Levels and Dependent Enzyme Regulation
A. V. Artiukhov, O. N. Solovjeva, N. V. Balashova, O. P. Sidorova, A. V. Graf, and V. I. Bunik 1149
- The Use of qPCR to Evaluate the Efficiency of Bulky DNA Damage Removal in Extracts of Mammalian Cells with Different Maximum Lifespan
A. A. Popov, V. A. Shamanin, I. O. Petruseva, A. N. Evdokimov, and O. I. Lavrik 1174
- Genetic Features of Lipid and Carbohydrate Metabolism in Arctic Peoples (Review)
B. A. Malyarchuk 1184
- Dermal Fibroblast Lines from a Patient with Huntington’s Disease as a Promising Model for Studying the Pathogenesis of the Disease: Production and Characterization
N. Kraskovskaya, A. Koltsova, P. Parfenova, A. Shatrova, N. Yartseva, V. Nazarov, E. Devyatkina, M. Khotin, and N. Mikhailova 1194
- The Content of Primary and Secondary Carotenoids in the Cells of the Cryotolerant Microalgae *Chloromonas reticulata*
O. V. Dymova, V. S. Parshukov, I. V. Novakovskaya, and E. N. Patova 1208
- Cardiac Myosin and Thin Filament as a Target for Lead and Cadmium Divalent Cations
O. P. Gerzen, I. K. Potoskueva, A. E. Tzybina, T. A. Myachina, and L. V. Nikitina 1218
- Multi-Directional Mechanisms of Action of *TRIM* Family Genes in the Response of the Innate Immune System to Bacterial Infections (Review)
V. V. Nenasheva, E. A. Stepanenko, and V. Z. Tarantul 1229
- Dose-Dependent Alterations of Lysosomal Activity and Alpha-Synuclein in Peripheral Blood Monocyte-Derived Macrophages and SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Line by upon Inhibition of mTOR Protein Kinase – Assessment of the Prospects of Parkinson’s Disease Therapy
A. I. Bezrukova, K. S. Basharova, G. V. Baydakova, E. Y. Zakharova, S. N. Pchelina, and T. S. Usenko 1248
- Femtosecond Dynamics of an Excited Primary Electron Donor in Reaction Centers of the Purple Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*
A. M. Khristin, T. Yu. Fufina, and R. A. Khatypov 1263
- The Mechanism of Stimulation of Myogenesis under the Action of Succinic Acid Through the Succinate Receptor SUCNR1
Y. V. Abalenikhina, M. O. Isayeva, P. Yu. Mylnikov, A. V. Shchulkin, and E. N. Yakusheva 1276

Differences in the Effects of Beta-Hydroxybutyrate on Mitochondria Biogenesis, Markers of Oxidative Stress and Inflammation in Young and Old Rat Tissues

V. V. Nesterova, P. I. Babenkova, A. A. Brezgunova, N. A. Samoylova, I. S. Sadovnikova, D. S. Semenovich, N. V. Andrianova, A. P. Gureev, and E. Y. Plotnikov

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ДОЗЫ ТИАМИНА УЛУЧШАЮТ СОСТОЯНИЕ ПАЦИЕНТОВ С НЕВРОПАТИЕЙ ШАРКО–МАРИ–ТУТА, ИЗМЕНЯЯ УРОВЕНЬ ТИАМИНДИФОСФАТА И РЕГУЛЯЦИЮ ЗАВИСИМЫХ ОТ НЕГО ФЕРМЕНТОВ

© 2024 А.В. Артюхов^{1,2}, О.Н. Соловьева¹, Н.В. Балашова^{3,4},
О.П. Сидорова⁵, А.В. Граф^{1,6}, В.И. Буник^{1,2,7*}

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

² Сеченовский университет, кафедра биохимии, 119991 Москва, Россия

³ Московский областной научно-исследовательский
клинический институт имени М.Ф. Владимирского,
факультет усовершенствования врачей, 129110 Москва, Россия

⁴ Медицинский институт РУДН, факультет
дополнительного медицинского образования, 117198 Москва, Россия

⁵ Московский областной научно-исследовательский
клинический институт имени М.Ф. Владимирского, кафедра неврологии,
129110 Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

⁷ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.05.2024

После доработки 28.05.2024

Принята к публикации 28.05.2024

Невропатия Шарко–Мари–Тута (ШМТ) – это полигенное заболевание периферических нервов, для которого отсутствует эффективное лечение. Тиамин (витамин В1) является нейротропным соединением, улучшающим состояние пациентов с иными невропатиями. Наше пилотное исследование характеризует терапевтический потенциал ежедневного перорального приема тиамина (100 мг) при ШМТ и его молекулярные механизмы. До и после введения тиамина пациентам определяли силу мышц-сгибателей пальцев кистей, уровень коферментной формы тиамина (тиаминдифосфата, ТДФ) в крови, активность эндогенного холофермента (без ТДФ в среде измерения) транскетолазы и ее общую активность (с ТДФ в среде измерения), а также активацию транскетолазы ТДФ [1-(холо-транскетолаза/общая транскетолаза), %], соответствующую доле апо-транскетолазы в среде определения активности, не содержащей ТДФ. Отдельные случаи введения сульбутиамина (200 мг) или бенфотиамина (150 мг) показали сходное с тиамином (100 мг) влияние на анализируемые параметры. Применение тиамина или его фармакологических форм увеличивает силу мышц-сгибателей пальцев кистей у пациентов с ШМТ. Сравнение показателей тиаминного статуса у пациентов с ШМТ с показателями контрольной группы без диагностированных патологий не выявило существенных различий в средних уровнях ТДФ, активности холо-транскетолазы или распределении транскетолазы между холо- и апо-формами. Однако регуляция транскетолазы тиамином/ТДФ различается в контрольной группе и группе ШМТ. В среде измерения активности ТДФ не активирует транскетолазу у пациентов с ШМТ, однако такая активация является статистически значимой в контрольной группе. Прием тиамина *in vivo* парадоксальным образом снижает уровень эндогенной холо-транскетолазы у пациентов с ШМТ, чего не наблюдалось в контрольной группе. Корреляционный анализ выявил половые различия во взаимосвязях между показателями тиаминного статуса у лиц контрольной группы и пациентов с ШМТ. Таким образом, наши результаты связывают физиологические улучшения, наблюдающиеся при приеме тиамина пациентами с ШМТ, с изменениями в их тиаминном статусе, характеризуемыми уровнем ТДФ и регуляцией транскетолазы в крови.

* Адресат для корреспонденции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Шарко–Мари–Тута, сила мышц-сгибателей пальцев кистей, тиамин, транскетолаза, половые различия в метаболизме, сульбутиамин, бенфотиамин.

DOI: 10.31857/S0320972524070019 EDN: WNUSPY

ВВЕДЕНИЕ

Невропатия Шарко–Мари–Тута (ШМТ) – наиболее распространенная в мире форма наследственных нервно-мышечных заболеваний у человека [1, 2]. Заболевание обладает широкой гетерогенностью, но, как правило, характеризуется прогрессирующей мышечной атрофией и потерей двигательных функций нижних конечностей, в дальнейшем поражающей и верхние [3–6]. Сенсорные расстройства менее выражены, но могут дополнительно снижать качество жизни пациентов. В зависимости от конкретного молекулярного дефекта клинические проявления ШМТ могут варьировать от легкой слабости в ногах до тяжелого паралича, но в целом заболевание характеризуется очень медленным прогрессированием; часто проходят десятилетия, прежде чем клиническая картина станет явной [7, 8]. Классификация ШМТ учитывает нарушение скорости нервной проводимости и тип наследования, на основании которых выделяют две основные формы – демиелинизирующую (ШМТ1) и аксональную (ШМТ2). В отдельную группу также выделяются подтипы, сцепленные с X-хромосомой (ШМТХ) [8–10]. Дальнейшая классификация форм ШМТ основана на поражении конкретных генов или мультигенных локусов. Различные типы заболевания имеют коллективную распространенность 1 : 2500 [11], однако в изолированных популяциях, например, в Японии и Норвегии, частота встречаемости ШМТ значительно выше [12–14]. Согласно некоторым оценкам, около половины больных ШМТ людей могут считаться «недееспособными» [15] и до 20% – «тяжелыми инвалидами» [16], что приводит к значительной финансовой нагрузке на систему здравоохранения.

Наиболее распространенный подтип ШМТ, встречающийся более чем у 50% всех пациентов [17], ШМТ1А, возникает в результате дупликации хромосомной области 17p11.2-17p12, содержащей ген *PMP22*. Данный ген кодирует гликопротеин, главный компонент миелиновой оболочки периферических нервных волокон. На животных моделях сверхэкспрессия *PMP22* вызывает симптомы, аналогичные симптомам у пациентов с ШМТ1А, т.е. демиелинизацию нервных волокон, которая снижает скорость нервной проводимости, связанную с атрофией мышц [17]. Тяжесть симптомов у

этих животных коррелирует с количеством копий *PMP22* в геноме, причем даже две дополнительные копии гена вызывают демиелинизацию [18]. Локус 17p11.2-17p12 содержит еще 7 генов и несколько псевдогенов, однако лишь *PMP22*, для которого показан вышеописанный «эффект дозы», считается ответственным за развитие ШМТ1А [19]. Второй наиболее распространенный подтип ШМТ, ШМТХ1, вызывается мутациями гена *GJB1*, локализованного на X-хромосоме. Проявления ШМТХ1 ближе к ШМТ2 у пациентов женского пола, но занимают промежуточное положение между ШМТ1 и ШМТ2 у пациентов мужского пола [8–10]. Число описанных мутаций в различных участках генома, связанных с симптомами ШМТ, постоянно растет: в настоящее время известно порядка 100 генов, мутации в которых вызывают развитие ШМТ [8, 9]. Некоторые из подтипов ШМТ иногда диагностируются и как самостоятельные нарушения. Так, дисфункция гена *TFG* описывается и как подтип ШМТ2Р, и как наследственная моторно-сенсорная невропатия «типа Окинавы» [20].

Ни один из доступных терапевтических подходов не может полностью вылечить ШМТ. Однако при ряде других неврологических расстройств введение тиамина (витамина В1) в высоких дозах приводило к улучшению клинической картины [21–26]. Насколько нам известно, терапевтическое действие тиамина на пациентов с ШМТ не изучалось даже в тех случаях, когда патология была обусловлена мутациями ферментов, функции которых зависят от тиамина и, следовательно, могли бы быть скорректированы введением тиамина [27, 28]. С другой стороны, известно, что демиелинизация при различных формах ШМТ ассоциирована с митохондриальной дисфункцией [29], а тиамин как предшественник кофермента центрального метаболизма глюкозы, тиаминдифосфата (ТДФ), улучшает функцию митохондрий при различных невропатологиях [26, 30–34]. В частности, тиамин оптимизирует окисление глюкозы, снижая таким образом использование аминокислот в качестве энергетических субстратов [35], а также защищает от окислительного стресса [26, 36–38]. Принимая во внимание вклад усиленной митохондриальной деградации аминокислот в такой признак ШМТ, как мышечная атрофия [39, 40], снижение деградации аминокислот, ранее наблюдавшееся в ходе оптимизации

Принятые сокращения: ТДФ – тиаминдифосфат; ШМТ – болезнь Шарко–Мари–Тута; RM-ANOVA – дисперсионный анализ с учетом парных выборок.

метаболизма в результате введения тиамина [35], может иметь потенциальное терапевтическое значение при данном заболевании. Кроме того, нейротропное действие тиамина [41, 42] и существование его фармакологических форм, в частности, мембранопроницаемого сульбутиамина (препараты «Энерион», «Аркалион», также входит в состав препарата «Нейробион») или бенфотиамина, являющегося аналогом тиаминмонофосфата (препарат «Бенфогамма», также входит в состав препаратов «Мильгамма» и «Комбилипен»), делает витамин В1 перспективным кандидатом для лечения ШМТ.

В настоящей работе представлены результаты наблюдения трех клинических случаев женщин с наиболее распространенной формой ШМТ (ШМТ1А), в ходе которого оценивали их физиологические и биохимические ответы на пероральный прием высоких доз тиамина (витамина В1) или сульбутиамина. Основываясь на успешных результатах этих исследований, мы дополнительно оценили тиаминный статус в образцах крови сопоставимых пилотных выборок пациентов с ШМТ и здоровых контролей. Несмотря на то что у пациентов с ШМТ не наблюдается существенных отличий от контрольной группы по средним уровням ТДФ или активности транскетолазы в крови, регуляция транскетолазы пациентов при введении ТДФ в среду измерения активности этого ТДФ-зависимого фермента или при приеме тиамина пациентами отличается от таковой у контрольной группы. Такие биохимические различия подтверждаются корреляционным анализом параметров тиаминного статуса. Таким образом, метаболическое действие высоких доз тиамина, регулирующего ТДФ-зависимые ферменты, может привести к наблюдаемому улучшению физиологических показателей пациентов с ШМТ при приеме тиамина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Коммерческие реагенты, использовавшиеся для биохимических анализов, имели наивысшую доступную чистоту и были получены от фирмы «Sigma-Aldrich», США. Смесь фосфопентоз для измерения активности транскетолазы получали из рибозо-5-фосфата, согласно известной методике энзиматического синтеза с использованием рибозо-5-фосфатизомеразы и ксилулозо-5-фосфатэпимеразы, полученных из ацетонового порошка бычьей селезенки [43, 44]. Апофермент транскетолазы дрожжей получали методом иммуноаффинной хроматографии, согласно опубликованному протоколу с использованием поликлональных антител, выделенных из сыворотки иммунизированной

ванного кролика [45, 46]. Препарат фермента разделяли на аликвоты и хранили при $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ в буфере, содержащем 10 мМ K_2HPO_4 и 50 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (рН 7,6). Перед анализом дрожжевую апо-транскетолазу пропускали через колонку Sephadex G-50 («Pharmacia», Швеция), уравновешенную 50 мМ глицил-глициновым буфером (рН 7,6). Полученный таким образом препарат транскетолазы характеризовался типичными параметрами (например, 7,4 мг/мл; 20 Ед./мг) и был стабилен при хранении при $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение нескольких дней. Транскетолазную активность этого препарата определяли в присутствии 0,1 мМ ТДФ с использованием нижеописанной методики. Для определения концентрации белка использовали молярный коэффициент экстинкции $A^{0,1\%}_{1\text{см}}$, равный 1,45 при 280 нм [47]. Непосредственно перед анализом к препарату транскетолазы добавляли CaCl_2 (конечная концентрация – 0,1 мМ). В присутствии CaCl_2 наблюдался расширенный интервал линейной зависимости активности транскетолазы от концентрации ТДФ [48].

Исследования на людях. Исследование не было предварительно зарегистрировано. Общее количество участников исследования и их общие характеристики показаны в табл. 1. Клинические данные обо всех участниках с диагнозом ШМТ представлены в таблице П1 в Приложении. В исследование были включены пациенты в возрасте 16–63 года с подтвержденным диагнозом ШМТ, а также лица контрольной группы аналогичного возрастного интервала без диагностированных патологий. Пациенты с ШМТ или участники контрольной группы, сообщившие о продолжающемся или недавнем (<6 месяцев) приеме витамина В1, рассматривались лишь как принимавшие тиамин. Выбор трех пациенток с ШМТ для осуществления длительного клинического наблюдения определялся их наиболее распространенной формой болезни (ШМТ1А) и готовностью проходить регулярные обследования, включая анализы крови. На момент включения в исследование эти пациенты получали поддерживающую терапию, состоящую в пероральном приеме карнозина (Севитин, 500 мг в день), ацетилкарнитина (Карницетин, 500 мг в день) и ипидакрина (Аксамон, 60 мг в день). Пациентка 1 также принимала липоевую кислоту (Берлитион, 600 мг в день) и габапентин (600 мг в день). В дополнение к этому продолжающемуся лечению пациенткам 1 и 3 (таблица П1 в Приложении) были назначены курсы перорального приема тиамина гидрохлорида (100 мг в день, В-1, «NOW Foods», США); пациентка 2 (таблица П1 в Приложении) получала сульбутиамина гидрохлорид (200 мг в день, Энерион, «Les Laboratoires Servier Industrie», Франция).

Таблица 1. Краткое описание исследуемых когорт

Группа	Подгруппа	Пол	Возраст, лет
Здоровые контроли, $n = 22$	не принимающие витамин В1, $n = 18$	33% мужчины ($n = 6$) 67% женщины ($n = 12$)	35–70 19–70
	принимающие витамин В1*, $n = 4$	50% мужчины ($n = 2$) 50% женщины ($n = 2$)	35–63 44–65
Пациенты с ШМТ, $n = 15$	не получавшие терапию витамином В1 в течение 6 предшествующих месяцев, $n = 14$	43% мужчины ($n = 6$) 57% женщины ($n = 8$)	18–63 16–49
	получавшие терапию витамином В1 при включении в исследование или в течение 6 предшествующих месяцев**, $n = 10$	30% мужчины ($n = 3$) 70% женщины ($n = 7$)	18–63 16–63

* Витаминные комплексы, о приеме которых сообщали участники контрольной группы, содержали витамина В1 в дозировке 1,5–50 мг в день (VPlab ultra Mens, Vita Balance 2000, Naturelo, Solgar Male Multiple).

** Подробная информация о приеме тиамина, сульфотиамина (Энерион) и бенфотиамина (Бенфогамма) пациентами с ШМТ представлена в табл. П1 в Приложении.

Биохимические исследования образцов крови проводились двойным слепым методом, когда исследователь, проводивший анализы, не был осведомлен о принадлежности образца к определенной группе, а статистический анализ полученных этим исследователем данных проводился независимым исследователем. Физиологическое и биохимическое тестирование пациентов проводили, как описано ниже.

Медицинские тесты. Измерение силы мышц-сгибателей пальцев кисти оценивали с помощью ручного динамометра ДК-25 (Россия) по стандартизированной методике кистевой динамометрии, рекомендованной Советом медицинских исследований Великобритании [49–52]. Все пациенты с доминирующей правой рукой садились на стул и брали динамометр таким образом, чтобы шкала была направлена внутрь. Пациенты сжимали динамометр вытянутой рукой, получая словесную поддержку во время тестирования. Сила мышц-сгибателей пальцев кистей (в кг) в каждой временной точке определялась по среднему из трех измерений отдельно для левой и правой рук. Измеряемый параметр является высоконадежным и достоверным индикатором прогрессирования ШМТ у взрослых пациентов [53, 54]. Надежность кистевой динамометрии подтверждает и ее использование для определения двигательной функции в различных фармакологических исследованиях [55, 56]. У здоровых людей 30–50 лет средняя сила мышц-сгибателей пальцев доминирующей и не доминирующей рук составляет соответственно 27,5 кг и 25,5 кг у женщин и 46 кг и 40,5 кг у мужчин [57].

Силу дистальных мышц ног (в основном передней большеберцовой мышцы) измеряли с помощью динамометра ДС-200 (Россия) и системы

оценки по шкале VMRC, рекомендованной Советом медицинских исследований Великобритании [58]: 0 – отсутствие мышечного сокращения; 1 – сокращение без видимых движений в суставе; 2 – видимое движение без преодоления силы тяжести конечности; 3 – видимое движение, преодолевающее силу тяжести, но не сопротивление конечности; 4 – движение с частичным преодолением сопротивления; 5 – нормальная мышечная сила.

МРТ-исследование мышц нижних конечностей проводили в режимах T1- и T2-STIR системы Optima MR450w GEM («General Electric», США) с магнитным полем 1,5 Тл.

Электронейромиография моторных волокон нервов верхних и нижних конечностей проводилась с помощью системы «Нейро-МВП» («Нейро-софт», Россия) по стандартному ранее описанному протоколу [59]. Неинвазивные электроды располагали на тестируемых участках и использовали для определения скорости проводимости по срединному, малоберцовому, большеберцовому и бедренному нервам, а также для определения остаточной латентности.

Вибрационную чувствительность в руках и ногах измеряли в соответствии с рекомендациями Американской ассоциации диабета [60] с использованием градуированного камертона Райделя–Зейфера с частотой 128 Гц, приложенного перпендикулярно различным тестируемым участкам, как описано в других источниках [61, 62]. Тест оценивал время восприятия в секундах; нормальным считается время 10 с и более.

Забор и обработка крови для биохимических анализов. Для биохимического исследования кровь из срединной локтевой вены собирали в вакутейнер с гепарином утром натощак, делили

на аликвоты и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Размороженную для измерений тиаминового статуса аликвоту крови озвучивали с использованием Bioguprot («Diagenode», Австрия) в режиме низкой интенсивности в течение 7 циклов, состоящих из 30 с озвучивания и 30 с паузы, как описано ранее [63].

Анализ транскетолазы крови. Активность транскетолазы в крови человека измеряли с помощью микропланшетного ридера CLARIOstar Plus («BMG Labtech», Германия) в режиме спектрофотометрии при 340 нм по поглощению NADH, образующегося в сопряженной реакции, согласно описанной ранее методике [64, 65]. Для измерения активности транскетолазы и ее активации ТДФ в медицинских анализах рекомендовано использовать цельную кровь [66, 67]. Активность транскетолазы выражали в единицах на мл крови (Ед./мл), где 1 Ед. соответствует трансформации одного мкмоль субстрата, эквивалентного продукции одного мкмоль NADH в сопряженной реакции, в мин. Озвученную кровь разводили в 5 раз в среде для анализа, содержащей 50 мМ глицил-глициновый буфер (рН 7,6) и 2,5 мМ MgCl_2 . Из полученного образца отбирали 130 мкл и инкубировали в 520 мкл среды для анализа, дополнительно содержащей 1 мМ NADH, 13,5 Ед./мл триозофосфатизомеразы, 0,9 Ед./мл глицерин-3-фосфатдегидрогеназы и 0,2 мМ ТДФ либо не содержащей последнего, в течение 20–40 мин в стеклянной пробирке. За это время расходовались различные субстраты, присутствующие в препаратах ферментов и окисляющие NADH, в результате чего фоновые изменения приходили в стационарное состояние, характеризующееся низкой и постоянной скоростью снижения поглощения NADH. По достижении этого состояния 50 мкл описанного выше разведения крови добавляли в лунку микропланшета, смешивали со 150 мкл среды для анализа, содержащей дополнительно смесь фосфопентоз в концентрации 4 мг/мл, и измеряли активность транскетолазы в течение 90 мин. Смесь субстратов, добавленная при анализе активности транскетолазы, позволяет насытить фермент для определения максимальной скорости реакции. Фоновую реакцию измеряли аналогичным образом, но без добавления фосфопентоз к смеси 150 мкл среды и 50 мкл разведенной крови. Полученную скорость фоновой реакции $\Delta\text{A}_{340}/\text{мин}$ вычитали из скорости транскетолазной реакции с добавленными фосфопентозами. Анализ каждого образца крови проводили в трех повторах. Активность транскетолазы без добавления ТДФ в реакционную среду в дальнейшем тексте упоминается как активность эндогенной холо-транскетолазы, тогда как активность с добавлением ТДФ в среду для анализа – как общая активность транскетолазы. Уровень эндогенной

апо-транскетолазы характеризуется разницей между активностью общей транскетолазы и эндогенной холо-транскетолазы. Фракция эндогенной апо-транскетолазы соответствует активации транскетолазы ТДФ, которую рассчитывали, как $[1 - (\text{эндогенная холо-транскетолаза}/\text{общая транскетолаза})] \times 100\%$. Отрицательные значения такой активации соответствуют ингибированию транскетолазы ТДФ, наблюдавшемуся в наших и других исследованиях [68–74].

Экстракция и анализ ТДФ в крови. Обработанную ультразвуком кровь, разведенную в 5 раз в среде для анализа, использовали для экстракции ТДФ, которую проводили нагреванием при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 мин с последующим центрифугированием при 21 500 g в течение 15 мин. ТДФ измеряли ферментативно с использованием апофермента дрожжевой транскетолазы, активирующегося экстрагированным ТДФ [75], с ранее описанными модификациями [76]. Супернатант после нагревания крови (40 мкл) инкубировали в течение 40 мин с 10 мкл среды для анализа, содержащей 3 мкг дрожжевой апо-транскетолазы. После этого добавляли 150 мкл той же среды, содержащей 0,33 мМ NADH, 4,5 Ед./мл триозофосфатизомеразы, 0,3 Ед./мл глицерин-3-фосфатдегидрогеназы и 4 мг/мл смеси калиевых солей ксилулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата. В полученной смеси измеряли скорость транскетолазной реакции в течение 30–40 мин. Калибровочную кривую строили с использованием 40 мкл 0–0,2 мМ раствора ТДФ (0–8 пмоль ТДФ в лунке). Концентрацию ТДФ в приготовленном в качестве калибровочного стандарта растворе определяли по поглощению при 272 нм с использованием молярного коэффициента экстинкции $7500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [77].

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали GraphPad Prism 8.0 («GraphPad Inc.», США). Достоверность различий между двумя группами оценивалась с помощью теста Манна–Уитни, для которого не требуется нормальное распределение данных. Множественные экспериментальные группы анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с post-hoc-тестом Сидака. Если одна и та же выборка тестировалась в различных условиях, использовалась соответствующая модификация дисперсионного анализа с повторностями (RM-ANOVA).

Для корреляционного анализа использовали корреляции Спирмена, поскольку не все выборки данных имели нормальное распределение, согласно тесту Д'Агостино–Пирсона. Итеративный тест Граббса (при значении параметра Alpha 0,01) не определил выбросы в имеющихся выборках. Мощность всех статистических тестов $(1-\beta)$ была $\geq 0,9$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническое описание пациенток до введения тиамина. На основании клинической картины и дупликации локуса 17p11.2-p12, охватывающего ген *RMP22*, у трех участвовавших в длительном наблюдении пациенток была диагностирована наследственная моторно-сенсорная невропатия Шарко–Мари–Тута подтипа 1А.

Пациентка 1 на момент включения в исследование была в возрасте 47 лет, обладала полую стопой, низкой силой мышц-сгибателей пальцев кистей (8,5 кг в правой руке и 4,5 кг – в левой), нарушением вибрационной чувствительности и снижением сухожильных рефлексов. Пациентка жаловалась на слабость и острую боль в нижних конечностях, спотыкание и периодические падения. Она слегка пошатывалась в позе Ромберга и при пальце-носовой и пяточно-коленной пробах демонстрировала легкий тремор. Электронейромиография выявила сильные нарушения скорости нервной проводимости и длительные латентные периоды, сопровождающиеся полной блокадой сенсорного потенциала большеберцовых и срединных нервов с обеих сторон. МРТ показала серьезные поражения мышц. Сила передней большеберцовой мышцы не определялась, так как при первичной оценке у пациента не было выявлено признаков мышечного сопротивления (0–1 балл по шкале VMRC). Пациентке был назначен тиамина гидрохлорид перорально в дозе 100 мг в день в дополнение к базовой терапии, описанной в разделе «Материалы и методы» («Исследования на людях»).

Пациентка 2 на момент включения в исследование была возрастом 35 лет, имела полую стопу, низкую силу мышц-сгибателей пальцев кистей (9 кг в правой руке и 7 кг – в левой), отсутствие вибрационной чувствительности в пальцах ног и отсутствие сухожильных рефлексов. Пациентка жаловалась на слабость в нижних и верхних конечностях, невозможность встать из положения сидя; подъем из положения лежа происходил в три приема. Она была нестабильна в позе Ромберга, но точно выполняла пальце-носовую пробу. Электронейромиография установила низкую скорость проводимости, большие латентные периоды и полную блокаду сенсорного потенциала срединного нерва с обеих сторон, а также снижение количества нервных волокон. МРТ показала серьезные поражения мышц. Сила передней большеберцовой мышцы была значительно редуцирована (3 балла по шкале VMRC). Пациентке был назначен сульбутиамин перорально в дозе 200 мг в день в дополнение к базовой терапии, описанной в разделе «Материалы и методы» («Исследования на людях»).

Пациентка 3 на момент включения в исследование была возрастом 36 лет, обладала ступенчатой походкой, болями в виде гипестезии, низкой силой мышц-сгибателей пальцев кистей (8,5 кг в правой руке и 4,5 кг – в левой), отсутствием вибрационной чувствительности и отсутствием сухожильных рефлексов. Пациентка жаловалась на слабость нижних конечностей, в особенности стоп. Электронейромиография также продемонстрировала существенное ослабление функции нервов, а МРТ – значительную дегенерацию мышц. Пациентка не проявляла достаточной резистентности при первичной оценке силы передней большеберцовой мышцы (0–1 балл по шкале VMRC). Биохимический анализ крови показал повышенную активность аспартаттрансаминазы – 39 Ед./литр (нормальные значения: 5–31 Ед./литр), хотя активность аланинтрансаминазы (22 Ед./литр) находилась в пределах диапазона нормальных значений (5–34 Ед./литр). Таким образом, биохимический анализ подтвердил серьезное повреждение внепеченочных тканей, таких как скелетные мышцы. Пациентке был назначен тиамина гидрохлорид перорально в дозе 100 мг в день в дополнение к базовой терапии, описанной в разделе «Материалы и методы» («Исследования на людях»).

Клиническое описание пациентов во время и после завершения курсов тиамина. Пациентка 1. В течение 10 месяцев ежедневного перорального приема витамина В1 в форме тиамина гидрохлорида у пациентки наблюдалось постепенное улучшение физиологических и биохимических показателей. Повышение уровня ТДФ в цельной крови с 149 до 332 нМ сопровождалось увеличением силы мышц-сгибателей пальцев обеих кистей (рис. 1, а). Повышение ТДФ сопровождалось снижением активности транскетолазы и исчезновением незначительной активации транскетолазы ТДФ (рис. 1, б). Через 10 месяцев после начала приема тиамина у пациентки были также замечены некоторые неврологические улучшения (табл. 2).

Спустя 7 месяцев после завершения 10-месячной терапии тиамином уровень ТДФ в крови снизился с 332 нМ до практически исходного уровня (156 нМ; рис. 1, а), что сопровождалось увеличением активности транскетолазы и ее активации ТДФ (рис. 1, б). Однако клинические улучшения сохранялись хотя бы частично: сила мышц-сгибателей пальцев в левой кисти не уменьшалась, а в правой – снижалась, но все равно была выше (12 кг) исходной (8,5 кг) (рис. 1, а). Слабые и живые сухожильные рефлексы по-прежнему наблюдались на правой и левой руках соответственно. Пальце-носовая проба по-прежнему выполнялась точно. Таким образом, 10-месячная

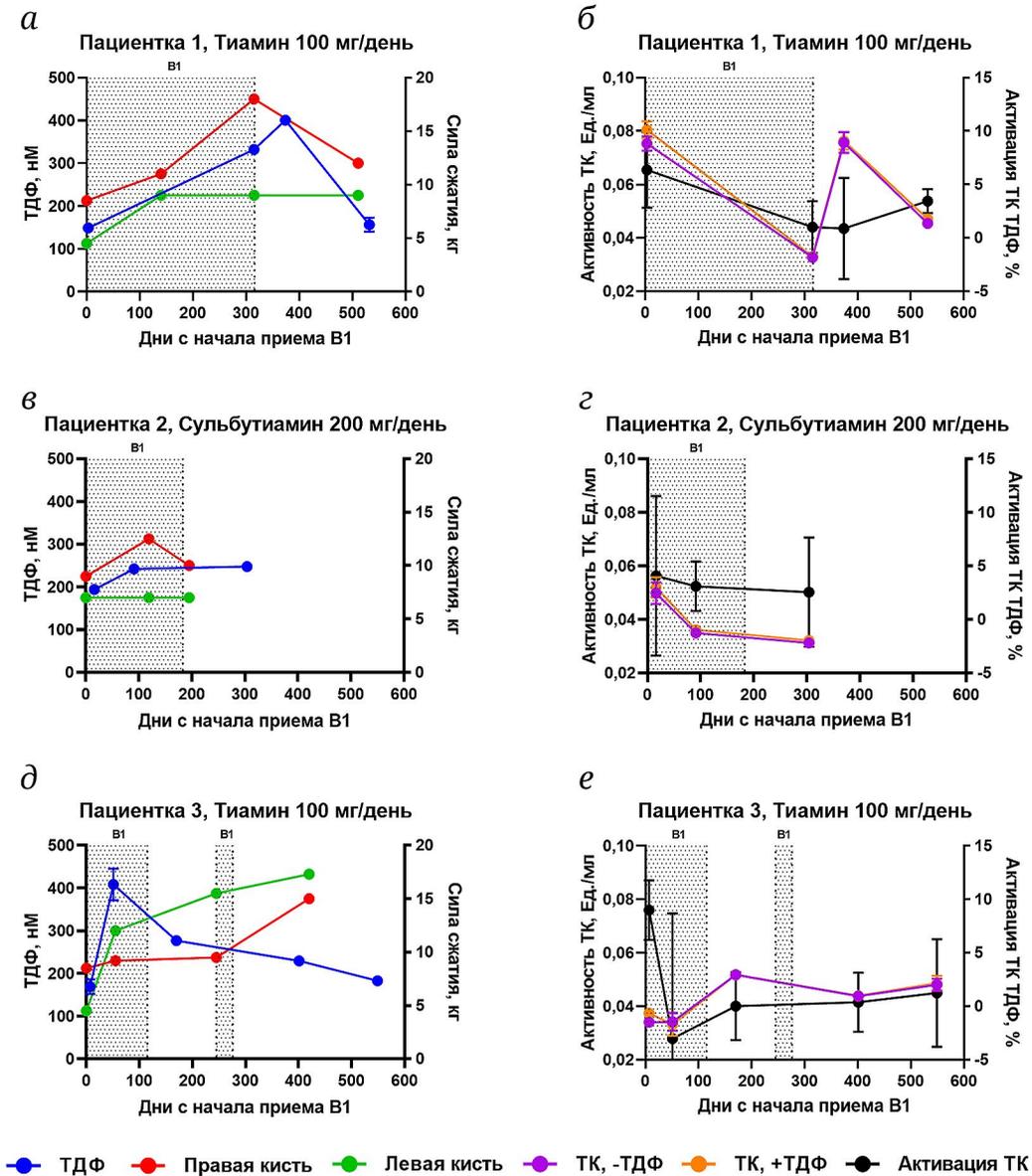


Рис. 1. Динамика изменения тиаминового статуса в крови и силы мышц-сгибателей пальцев кистей у пациенток 1 (а и б), 2 (в и г) и 3 (д и е) во время и после завершения курсов ежедневного перорального приема витамина В1 в форме тиамин гидрохлорида (пациентки 1, 3) или сульбутиамина (пациентка 2). Точечной штриховкой обозначены периоды, когда пациентки принимали В1. (а, в, д) – Содержание ТДФ в крови (левая шкала по оси Y, синяя линия) и сила мышц-сгибателей пальцев кистей (правая шкала по оси Y), правой (красная линия) и левой (зеленая линия) кистей. (б, г, е) – Активность транскетолазы (ТК) крови (левая шкала по оси Y), измеренная при отсутствии (-ТДФ, сиреневая линия) и в присутствии (+ТДФ, оранжевая линия) ТДФ в реакционной среде; измерения используются для расчета активации транскетолазы ТДФ, характеризующей долю апо-транскетолазы от общего количества фермента (правая шкала по оси Y, черная линия), как описано в разделе «Материалы и методы» («Анализ транскетолазы крови»). Все биохимические параметры представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (полосы ошибок не отображаются, если находятся в пределах размера символов)

терапия тиамином привела к долгосрочному, т.е. спустя 7 месяцев после завершения терапии, улучшению, хотя мышечная сила и параметры тиаминового статуса в крови продемонстрировали сопряженные изменения: уровень ТДФ и сила мышц-сгибателей пальцев кистей снижались, а активность транскетолазы и ее активация ТДФ повышались.

Пациентка 2. Спустя 3 месяца ежедневного перорального приема сульбутиамина у пациентки наблюдалось повышение уровня ТДФ (рис. 1, в) совместно со снижением активности транскетолазы (рис. 1, г) в крови, что сопровождалось улучшением силы сжатия в правой руке (рис. 1, в). Сила мышц ног также увеличивалась (с 3-х до 4-х баллов для передней большеберцовой мышцы).

Таблица 2. Неврологические улучшения у пациентки 1 спустя 10 месяцев ежедневного приема 100 мг тиамин гидрохлорида

Плечелучевые сухожильные рефлексы рук				Выполнение пальце-носовой пробы	
правая		левая			
-	+	-	+	-	+
отсутствуют	слабые	отсутствуют	живые	с умеренным тремором	точно

Примечание. Представленные параметры оцениваются до (-) и после (+) приема тиамин.

Через 4 месяца после завершения 6-месячного приема сульбутиамина уровень ТДФ оставался выше (248 нМ), чем до терапии (194 нМ), активация транскетолазы ТДФ исчезла, а сила сжатия в правой кисти, хоть и снизилась до 10 кг, но оставалась выше исходного уровня (9 кг) (рис. 1, в). При этом сила мышц ног (передней большеберцовой мышцы) увеличилась (с 4-х баллов в конце терапии до 5). Таким образом, после завершения терапии сульбутиамином уровень ТДФ у пациентки 2 оставался стабильным в течение 4-х месяцев, активация транскетолазы ТДФ продолжала снижаться, а мышечная сила – улучшаться.

Пациентка 3. Уже спустя 2 месяца приема тиамин гидрохлорида у пациентки 3 наблюдались значительные улучшения биохимических и физиологических показателей (рис. 1, д). Уровень ТДФ в цельной крови резко увеличился (с 169 до 408 нМ). При этом сила сжатия в правой кисти немного улучшилась, но в левой – почти утроилась (рис. 1, д), тогда как активация транскетолазы ТДФ исчезла (рис. 1, е). Аномальный уровень активности АСТ в крови снизился с 39 до 34 Ед./литр. Такие значительные эффекты наблюдались при исходно низком (0,03–0,04 Ед./мл) уровне активности транскетолазы в крови пациентки 3, который при повышении ТДФ не снижался (рис. 1, е). Напротив, более высокие уровни активности транскетолазы (0,05–0,08 Ед./литр) у пациенток 1 (рис. 1, б) и 2 (рис. 1, г) снижались при введении тиамин.

Спустя 4 месяца приема тиамин пациентка была вынуждена прекратить терапию из-за обострения желчной колики. Спустя еще 2 месяца, после регресса печеночных симптомов, уровень ТДФ в крови пациентки оставался высоким (277 нМ), по сравнению с исходным уровнем (169 нМ), как и сила сжатия обеих кистей (9,5 и 15,5 кг для правой и левой руки соответственно). Активность АСТ понизилась до 32 Ед./литр. Сразу после этого обследования пациентке повторно был назначен тиамин гидрохлорид. Однако через месяц после окончания второго курса тиамин признаки заболевания печени вернулись и была проведена цистэктомия.

Примечательно, что спустя 5 месяцев после окончания второго курса тиамин было обна-

ружено дальнейшее увеличение силы сжатия кистей (15 и 17,3 кг для правой и левой руки соответственно; рис. 1, д), сопровождающееся появлением вибрационной чувствительности (4 с), которая полностью отсутствовала до назначения тиамин. На этот момент уровень ТДФ в крови пациентки (229 нМ) все еще был выше, по сравнению с уровнем до терапии (169 нМ; рис. 1, е), и она возобновила прием витамина В1 в виде препарата Нейробион (содержит 100 мг сульбутиамина). Таким образом, у тяжелобольной пациентки 3 прерывистый прием витамина В1 оказал длительное позитивное влияние на состояние мышечной (нормализация уровня активности АСТ, увеличение мышечной силы) и нервной тканей (улучшение вибрационной чувствительности).

Характерные параметры тиаминового статуса у пациентов с ШМТ по сравнению с контрольной группой. Данные наблюдения трех пациенток с ШМТ1А показали улучшение средней силы мышц-сгибателей пальцев с $8,7 \pm 0,2$ кг до $13,2 \pm 2,6$ кг в правой кисти и с $5,3 \pm 0,8$ кг до $9,3 \pm 1,5$ кг в левой кисти при повышении среднего уровня ТДФ в крови с 171 ± 13 нМ до 325 ± 50 нМ. Однако исследованных пациенток нельзя отнести к лицам с дефицитом тиамин, поскольку исходные уровни ТДФ в их крови (рис. 1) находились в пределах референсного интервала у здоровых лиц, 70–230 нМ [43–49]. Чтобы проверить и напрямую соотнести параметры тиаминового статуса, определяемые в наших экспериментах, анализы крови были проведены с использованием выборок пациентов с ШМТ ($n = 15$) и контрольной группы, в которой никакие патологии не были диагностированы ($n = 22$).

Проведенный анализ определяемых показателей тиаминового статуса, таких как уровень ТДФ в крови, активность эндогенной холо-транскетолазы, активность общей (холо + апо)-транскетолазы и доля эндогенной холо-транскетолазы, не выявил существенных половых различий в средних значениях этих параметров (рис. П1 в Приложении). Данные о различных фармакологических формах витамина В1, применяемых у наших пациентов, также не выявили каких-

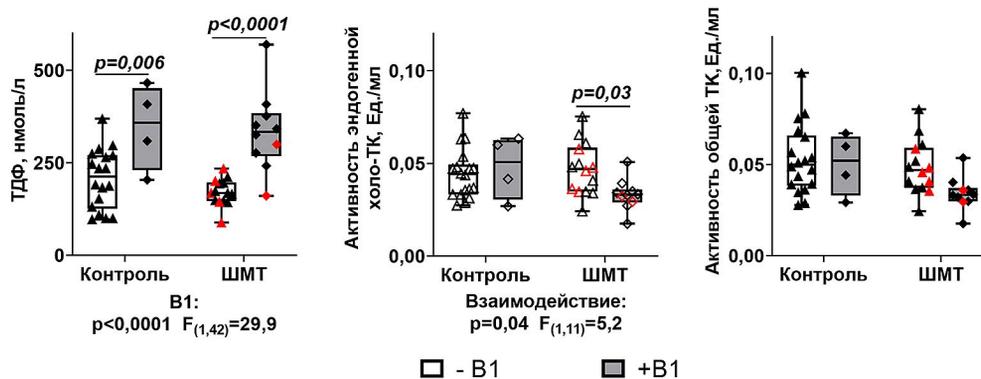


Рис. 2. Сравнение показателей, характеризующих статус тиамин в крови контрольной группы и пациентов с ШМТ, не принимающих и принимающих витамин В1. У лиц, получавших В1 и имеющих несколько временных точек, доступных во время наблюдения за пациентом, для сравнений выбиралась точка, соответствующая максимальному уровню ТДФ в крови. Значения активности транскетолазы (ТК), определенные *in vitro* без и при добавлении ТДФ в среду, показаны пустыми и закрашенными символами соответственно. Прием В1 *in vivo* для каждой группы обозначен серыми столбцами, как показано в легенде. Черные и красные символы обозначают ШМТ1 и ШМТ2 соответственно. Статистически значимые ($p \leq 0,05$) различия между изучаемыми группами, определенные методом двустороннего дисперсионного анализа с парными измерениями (RM-ANOVA) с критерием множественных сравнений Сидака, представлены на графиках. Под графиками указаны статистически значимые факторы. Данные представлены в виде «ящичков с усами», показывающих медиану, а также верхний и нижний квартили распределения каждого образца. Число испытуемых в исследуемых группах составляет: $n = 18$ здоровых контролей, не принимающих витамин В1; $n = 4$ здоровых контролей, принимающих витамин В1; $n = 14$ пациентов с ШМТ, не получавших витамин В1 в течение предыдущих 6 месяцев; $n = 10$ пациентов с ШМТ, получающих терапию витамином В1

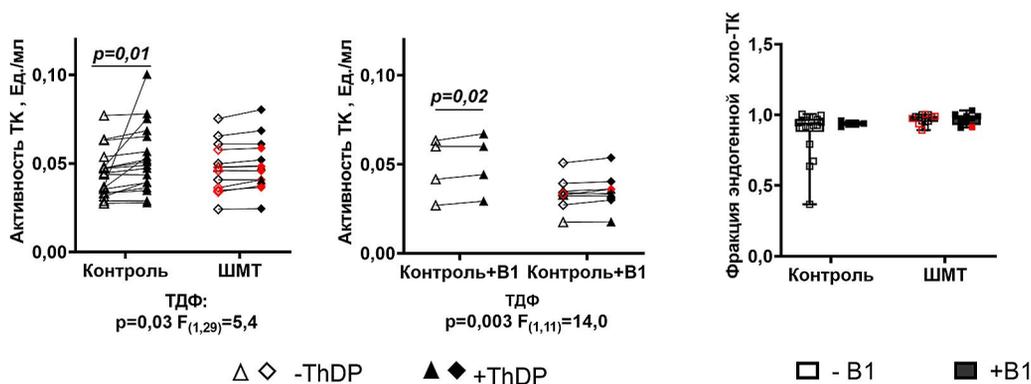


Рис. 3. Сравнение активации транскетолазы (ТК) добавлением ТДФ в среду измерения активности у участников контрольной группы и пациентов с ШМТ. Значения активности ТК, определенные без и при добавлении ТДФ в среду, показаны пустыми и закрашенными символами соответственно. Черные и красные символы обозначают ШМТ1 и ШМТ2 соответственно. При сравнении эндогенной холо-транскетолазы (холо-ТК) прием В1 *in vivo* обозначен полыми и закрашенными прямоугольниками, как показано в легенде под графиком. У лиц, получавших В1 и имеющих несколько временных точек, доступных во время наблюдения за пациентом, для сравнений выбиралась точка, соответствующая максимальному уровню ТДФ в крови. Статистически значимые ($p \leq 0,05$) различия между изучаемыми группами, определенные методом двустороннего дисперсионного анализа с парными измерениями (RM-ANOVA) с критерием множественных сравнений Сидака, представлены на графиках. Под графиками указаны значимые факторы с их статистикой. Число испытуемых в исследуемых группах такое же, как на рис. 2

либо специфичных для препарата различий в их влиянии на анализируемые параметры тиаминового статуса (рис. П2 в Приложении). Поэтому при дальнейшем сравнении показателей, присутствующих группе ШМТ и контрольной группе, мы объединили данные, полученные у представителей обоих полов и при приеме разных фармакологических форм тиамин (рис. 2 и 3).

Как показано на рис. 2, существенных различий в уровнях ТДФ и активностях транскетолазы в крови между ШМТ и контрольной группами, а также между различными изученными формами ШМТ не было обнаружено. Уровни ТДФ как в группе ШМТ, так и в контрольной группе одинаково увеличивались после введения витамина В1. Однако у пациентов с ШМТ можно было

наблюдать снижение среднего уровня активности эндогенной холо-транскетолазы в ответ на введение В1 (рис. 2), что хорошо согласуется с его снижением при наблюдении отдельных пациентов во времени (рис. 1). Снижение эндогенной холо-транскетолазы сопровождалось снижением активности общей транскетолазы у пациентов с ШМТ после приема В1 (рис. 2; $p = 0,11$), причем оба снижения были гораздо более значимыми при анализе с учетом парных измерений (RM-ANOVA), примененному отдельно к группе ШМТ (рис. П2 в Приложении).

У пациентов с ШМТ наблюдался более узкий интервал без высоких значений уровня ТДФ в крови (90–230 мкМ) по сравнению с контрольной группой (100–370 мкМ). Эта особенность могла способствовать большей статистической значимости ответа пациентов на введение В1 ($p = 0,002$) по сравнению с ответом в контрольной группе ($p = 0,02$). Примечательно, что в обеих группах при приеме тиамин был выявлен широкий интервал уровней ТДФ в крови (рис. 2), хотя пациенты с ШМТ принимали более высокие дозы витамина В1 (100 мг тиамин, 150 мг бенфотиамин или 200 мг сульбутиамин; табл. 1), чем контрольная группа (витаминные комплексы, содержащие 1,5–50 мг В1; табл. 1). Это указывает на то, что анализируемые уровни активной коферментной формы тиамин, т.е. ТДФ, регулируются не только доступностью и клеточной проницаемостью вводимых предшественников ТДФ, но также и отдельными компонентами тиамин-зависимой сети реакций, включая в первую очередь биосинтез ТДФ, тесно связанный с транспортом тиамин/ТДФ.

Средние уровни активности эндогенной холо-транскетолазы или общей транскетолазы статистически не различались в двух группах ни до, ни после введения витамина В1 (рис. 2). Однако анализ активации транскетолазы ТДФ в каждом образце с помощью RM-ANOVA выявил статистически значимый эффект только в контрольной группе (рис. 3). Этот эффект был связан с сильно варьирующей долей эндогенной холо-транскетолазы в контрольной группе (рис. 3), что хорошо согласуется с более высокой вариабельностью уровня ТДФ в ней по сравнению с группой ШМТ (рис. 2). Примечательно, что в контрольной группе, принимающей содержащие витамин В1 препараты, активация транскетолазы ТДФ оставалась значимой (рис. 3).

Таким образом, активация транскетолазы ТДФ была статистически значимой только в контрольной группе, тогда как уровень активности эндогенной холо-транскетолазы снижался в ответ на введение витамина В1 только у пациентов с ШМТ. В результате мы обнаружили различную регуляцию транскетолазы тиамин у пациентов

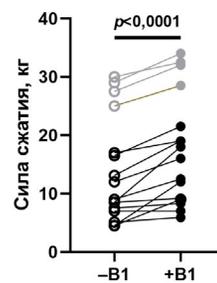


Рис. 4. Изменения силы мышц-сгибателей пальцев кистей у пациентов с ШМТ, принимающих витамин В1. Для каждого пациента показаны данные для правой и левой кистей. Закрашенные и пустые символы обозначают силу, измеренную до приема витамина и при максимальном уровне ТДФ в крови в период приема тиамин соответственно. Данные о пациентах женского пола ($n = 6$; пациенты 1–3, 5, 10, 13; таблица П1 в Приложении) и пациентах мужского пола ($n = 2$; пациенты 8, 14; таблица П1 в Приложении) показаны черными и серыми символами соответственно. Статистическую значимость определяли с помощью парного критерия Манна–Уитни

с ШМТ, по сравнению с участниками контрольной группы, проявляющуюся в виде отсутствия апоформы транскетолазы и снижения транскетолазной активности в ответ на введение витамина В1 при ШМТ, но не у контрольной группы. Указанные изменения были связаны с увеличением силы мышц-сгибателей пальцев кистей у всех исследованных пациентов с ШМТ после введения витамина В1 (рис. 4), что подтверждается результатами наблюдения во времени трех пациенток с ШМТ1А (рис. 1).

Корреляции силы мышц-сгибателей пальцев кистей с параметрами тиаминного статуса в крови пациентов с ШМТ с учетом пола. Учитывая физиологические половые различия в силе мышц-сгибателей пальцев кистей, ее корреляции с параметрами, характеризующими тиаминный статус в крови, были проанализированы отдельно для пациентов мужского и женского пола, не принимавших тиамин (рис. 5). У пациентов мужского пола сила мышц-сгибателей пальцев кистей показала статистически значимую положительную корреляцию Спирмена с уровнем ТДФ (рис. 5, а) и значимые отрицательные корреляции с активностями эндогенной холо-транскетолазы и общей транскетолазы (рис. 5, б и в). Корреляция силы мышц-сгибателей пальцев кистей с фракцией апо-транскетолазы у пациентов-мужчин с ШМТ не достигла статистической значимости (рис. 5, г), хотя ее положительная направленность хорошо согласуется с отрицательной корреляцией силы с активностью эндогенной холо-транскетолазы (рис. 5, б). Напротив, у женщин с ШМТ, не принимающих витамин В1, никакие корреляции с силой сжатия не были статистически значимыми (рис. 5, а–г).

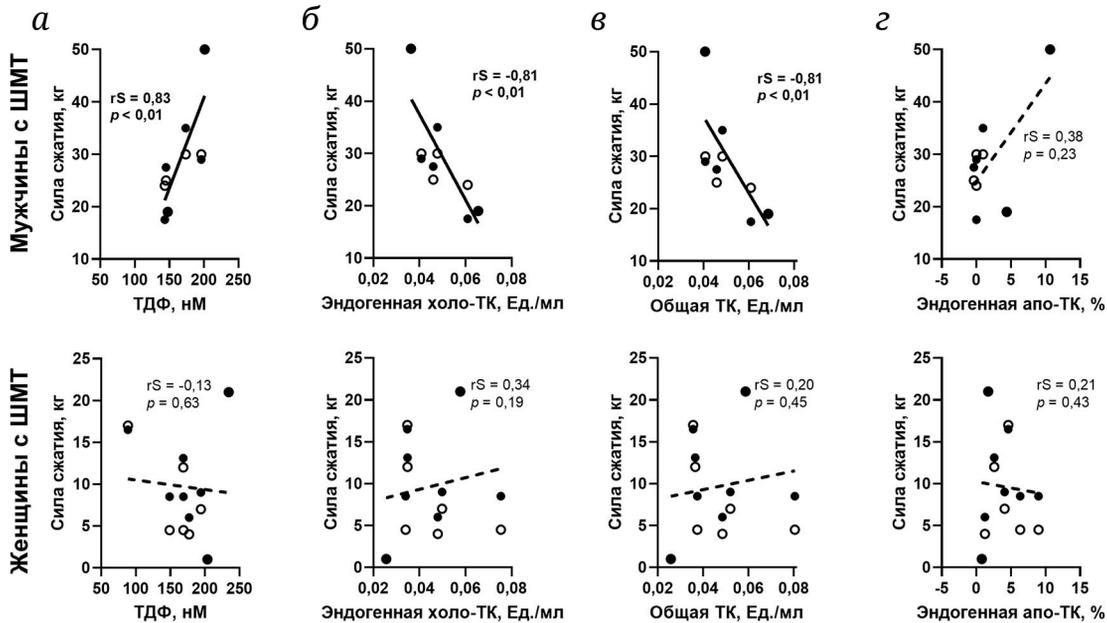


Рис. 5. Корреляция силы мышц-сгибателей пальцев рук с показателями тиаминового статуса в крови пациентов с ШМТ. Графики в верхней и нижней строках соответствуют пациентам женского ($n = 7$) и мужского ($n = 6$) пола. Анализируемые параметры включают: уровень ТДФ (а); активность эндогенной холо-транскетолазы (холо-ТК) (б); активность общей транскетолазы (ТК) (в); долю эндогенного апофермента в общей ТК (апо-ТК, %) (г). Закрашенные и пустые символы соответствуют правой и левой руке соответственно. Коэффициенты корреляции Спирмена (rS) и p -значения (p) показаны на графиках. Параметры корреляций с $p \leq 0,05$ выделены жирным шрифтом и сопровождаются сплошными линиями тренда, а незначимые корреляции показаны пунктирными линиями тренда

Таким образом, корреляционный анализ показал, что у мужчин с ШМТ более высокая сила мышц-сгибателей пальцев кистей ассоциирована с более высоким уровнем ТДФ (рис. 5, а), но более низким уровнем активности транскетолазы (рис. 5, б и в). Ввиду отрицательной корреляции между активностью транскетолазы в крови и силой у мужчин с ШМТ (рис. 5, б и в), практически полное насыщение транскетолазы ТДФ у всех пациентов ШМТ по сравнению с контрольной группой (рис. 3, эндогенная фракция холо-транскетолазы), по-видимому, является одним из признаков патологии.

Разная взаимосвязь между показателями тиаминового статуса крови в контрольной группе и у пациентов с ШМТ. Ранее нами была показана более высокая дискриминационная способность корреляционного анализа по сравнению со средними уровнями параметров [35, 50–52]. Поэтому мы провели корреляционный анализ между параметрами статуса тиамин у пациентов с ШМТ и контрольной группы, чтобы выявить различия, обусловленные заболеванием. Учитывая описанные выше половые различия, корреляционный анализ проводился отдельно у мужчин и женщин. Как видно из табл. 3, эти зависящие от пола корреляции подтверждают представление о том, что определенные параметры тиаминового статуса связаны с полом, аналогично корреляциям с

силой мышц-сгибателей пальцев кистей (рис. 4). У женщин контрольной группы (табл. 3, нижний левый угол) активность эндогенной холо-транскетолазы показывает очень сильную корреляцию с активностью общей транскетолазы. С учетом умеренных корреляций активности эндогенной холо-транскетолазы с ТДФ и фракции эндогенной апо-транскетолазы с активностью общей транскетолазы корреляционный анализ показывает, что у здоровых женщин насыщение транскетолазы ТДФ в большей степени определяется экспрессией транскетолазы, чем уровнем ТДФ. В отличие от женщин, у мужчин контрольной группы (табл. 3, верхний правый угол) наблюдается отрицательная корреляция фракции апо-транскетолазы с уровнем ТДФ ($p = 0,058$) и отсутствуют корреляции апо- или холофермента транскетолазы с общей активностью фермента. В целом, эти результаты указывают на более высокий вклад уровня ТДФ в крови в насыщение транскетолазы коферментом у здоровых мужчин. Так, у здоровых мужчин повышенные уровни ТДФ в крови коррелируют со снижением фракции апо-транскетолазы, а у женщин эта фракция не коррелирует с уровнем ТДФ.

У пациентов с ШМТ соотношение компонентов тиаминового статуса в крови у женщин и мужчин отличается от такового в контрольных группах (табл. 3). Корреляция между активностями общей транскетолазы и эндогенной холо-

Таблица 3. Влияние пола на корреляции параметров тиаминового статуса в крови здоровых контролей (Контр.) и у пациентов с ШМТ (ШМТ), не принимающих тиамин

Контроль					Пациенты с ШМТ				
М, Контр. Ж, Контр.	ТДФ	Активность эндогенной холо-ТК	Активность общей ТК	Фракция эндо- генной апо-ТК	М, ШМТ Ж, ШМТ	ТДФ	Активность эндогенной холо-ТК	Активность общей ТК	Фракция эндо- генной апо-ТК
ТДФ		0,257 0,658	-0,429 0,419	-0,829 0,058	ТДФ		-0,714 0,136	-0,714 0,136	0,609 0,206
Активность эндогенной холо-ТК	0,503 0,099		0,543 0,297	-0,600 0,242	Активность эндогенной холо-ТК	0,024 0,977		1,000 0,003	-0,058 0,933
Активность общей ТК	0,266 0,404	0,888 0,000		0,314 0,564	Активность общей ТК	0,119 0,793	0,929 0,002		-0,058 0,933
Фракция эндогенной апо-ТК	0,007 0,991	0,357 0,256	0,545 0,071		Фракция эндогенной апо-ТК	-0,643 0,096	0,143 0,752	0,286 0,501	

Примечание. Сравниваются женщины (Ж, $n = 12$ и $n = 8$ в контрольной и ШМТ группах соответственно) и мужчины (М, $n = 6$ и в контрольной, и в ШМТ группах). Верхние и нижние значения в каждой ячейке представляют собой коэффициенты корреляции Спирмена и их p -значения соответственно. Достоверные корреляции ($p \leq 0,05$) выделены темно-серым цветом, тренды ($0,05 < p \leq 0,15$) – светло-серым. ТК – транскетолаза.

транскетолазы становится достоверной не только у женщин, но и у мужчин с ШМТ, сопровождаясь сдвигом других корреляций по сравнению с наблюдаемыми у контролей. Так, у пациенток с ШМТ умеренная корреляция фракции апо-транскетолазы с активностью общей транскетолазы, свойственная здоровым женщинам, сменяется умеренной отрицательной корреляцией с уровнем ТДФ. С учетом одновременного исчезновения у пациенток с ШМТ ассоциации ТДФ с активностью эндогенной холо-транскетолазы, вызванные заболеванием изменения позволяют предположить замещение связи ТДФ с экспрессией транскетолазы у здоровых женщин связью ТДФ с насыщением апо-транскетолазы у женщин с ШМТ. Напротив, связь ТДФ с фракцией апо-транскетолазы у здоровых мужчин при ШМТ заменяется связью ТДФ с уровнем холо-транскетолазы. В результате корреляции между ТДФ и распределением транскетолазы между фракциями апо- и холофермента у женщин с ШМТ сходны с таковыми у мужчин из контрольной группы: в обоих случаях уровень ТДФ отрицательно коррелирует с фракцией эндогенной апо-транскетолазы. И наоборот, корреляции между ТДФ и распределением транскетолазы между фракциями у мужчин с ШМТ сходны с таковыми у женщин из контрольной группы: в обоих случаях уровень ТДФ коррелирует с активностью эндогенной холо-транскетолазы (табл. 3).

В целом, изменившиеся соотношения между показателями тиаминового статуса крови у здоро-

вых людей и пациентов с ШМТ свидетельствуют о том, что, несмотря на сходство средних уровней показателей в двух когортах, сеть тиамин-зависимых процессов при ШМТ нарушена по сравнению со здоровым состоянием.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Суммирование клинических и биохимических эффектов приема тиамин пациентами с ШМТ. Тиаминовый статус в крови принимавших тиамин пациентов с ШМТ характеризовали уровнями коферментной формы тиамин (ТДФ) и активности ТДФ-зависимого фермента транскетолазы, а также распределением транскетолазы между холо- и апоферментом, определяемым по активации транскетолазы добавленным в среду измерения активности ТДФ. Ранее было показано, что эритроцитарный ТДФ является доминирующим компонентом пула тиамин в крови, поэтому уровень ТДФ в цельной крови коррелирует с уровнем ТДФ в эритроцитах [78]. Оба параметра используют в качестве индикаторов поступления тиамин в кровь и возможности насыщения тканей доставляемым кровью тиамином, однако определение ТДФ цельной крови позволяет проводить клиническую характеристику пациентов без дополнительных затрат труда и времени на выделение эритроцитов [78–82]. То же самое касается и транскетолазы, показатели активности

Таблица 4. Сравнение влияния перорального приема тиамин на тиаминовый статус цельной крови и мышечную работоспособность у трех пациенток с ШМТ1

№	Возраст	Форма, дозировка и длительность приема тиамин	ТДФ (цельная кровь), нМ		Активность ТК, Ед./мл				Эндогенная апо-ТК, % от общей ТК		Сила сжатия кистей, кг			
					эндогенная холо-ТК		общая ТК				правая кисть		левая кисть	
			-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
1	47	V1*HCl, 100 мг в день, 10 месяцев	149 ± 2	332 ± 8	0,075 ± 0,003	0,033 ± 0,001	0,080 ± 0,003	0,033 ± 0,001	6 ± 4	1 ± 2	8,5	18	4,5	9
2	36	Энерион, 200 мг в день, 3 месяца	194 ± 7	242 ± 3	0,058 ± 0,0003	0,035 ± 0,001	0,060 ± 0,001	0,037 ± 0,001	4 ± 7	3 ± 2	9	12,5	7	7
3	37	V1*HCl, 100 мг в день, 2 месяца	169 ± 17	408 ± 37	0,034 ± 0,001	0,034 ± 0,001	0,037 ± 0,001	0,033 ± 0,004	9 ± 3	0	8,5	9,2	4,5	12

Примечание. Параметры указаны до (-) и после (+) введения витамина В1; форма, дозировка и длительность приема указаны в таблице. ТК – транскетолаза.

которой в цельной крови и эритроцитах совпали [66, 67]. Действительно, средние уровни активности транскетолазы в нашем исследовании хорошо согласуются с активностями порядка 0,04–0,08 Ед./мл, определяемыми в эритроцитах человека в независимых исследованиях [83–86], хотя распределение активности транскетолазы в этом интервале может различаться в разных когортах [87]. Стоит отметить, что активность транскетолазы увеличивалась с 0,05 до 0,08 Ед./мл при анемии [85] и снижалась примерно на 35% при диабете [86]. Этот порядок изменения активности транскетолазы в крови человека аналогичен наблюдаемому в нашем исследовании.

У трех взрослых пациенток с ШМТ1А различной степени тяжести после приема тиамин наблюдалось заметное улучшение физиологических и неврологических параметров, таких как сила мышц-сгибателей пальцев кистей, живость рефлексов, вибрационная чувствительность и/или точность проведения пальце-носовой пробы (рис. 1; табл. 2 и 4). Сила мышц-сгибателей пальцев кистей была выбрана в качестве надежного и легкодоступного для определения физиологического параметра, позволяющего отслеживать терапевтические эффекты. Преимущества этого подхода, использованного в ряде независимых исследований, включая фармакологические [53–56], были подтверждены в нашем исследовании, которое выявило рост силы мышц-сгибателей пальцев кистей при терапии витамином В1 у всех обследованных пациентов с ШМТ. Помимо статистически значимого увеличения силы мышц-сгибателей пальцев кистей у пациентов с ШМТ после введения В1 (рис. 4), исследование трех клинических

случаев ШМТ1А продемонстрировало индивидуальную динамику и комбинацию биохимических и клинических реакций. Различия, по-видимому, не связаны с различными фармакологическими формами и дозами тиамин (рис. П2 в Приложении), а, скорее, соответствуют различным уровням специфических нарушений у пациентов. По сравнению с пациенткой 2, принимавшей сульбутиамин (200 мг), у пациенток 1 и 3, принимавших гидрохлорид тиамин (100 мг), наблюдалось более выраженное повышение уровня ТДФ в крови и более быстрое исчезновение незначительной фракции апо-транскетолазы. Одновременно у пациенток 1 и 3 наблюдалось большее улучшение мышечной силы (в 2–3 раза) по сравнению с пациенткой 2 (30%). Эти различия коррелировали с исходным уровнем нарушений у пациенток, а не с фармакологической формой тиамин. Действительно, до терапии у пациенток 1 и 3 были более низкие уровни ТДФ и большее снижение мышечной силы по сравнению с пациенткой 2 (табл. 4). С другой стороны, аналогичные долгосрочные улучшения и стабилизация уровней ТДФ в крови на более высоких, чем исходные, уровнях наблюдались как у пациентки 2, так и у пациентки 3, принимавших различные дозы и фармакологические формы тиамин. Возможно, что эти долгосрочные эффекты приема витаминных добавок зависели от возраста, поскольку они были более выражены у пациенток 36–37 лет (пациентки 2 и 3) по сравнению с пациенткой 47 лет (пациентка 1). Возрастная зависимость длительных эффектов тиамин может быть связана с возможностями печени по формированию запаса тиамин и уровнем биосинтетической активности

организма. Известно, что печень является депо тиамин, поставляющим этот витамин в другие ткани в соответствии с их потребностями в синтезируемом тканями ТДФ [88, 89].

Хотя нами не было обнаружено исследований, описывающих влияние витамина В1 на пациентов с ШМТ, клиническое улучшение, наблюдаемое в нашем исследовании, хорошо согласуется с положительным эффектом высоких доз тиамин у пациентов с другими неврологическими расстройствами, включая болезнь Паркинсона [90, 91], болезнь Альцгеймера [92–94], атаксию Фридриха [95, 96], рассеянный склероз [97], эпилепсию [98], черепно-мозговую травму [26], а также в животных моделях этих заболеваний [30, 31, 99–104].

Аналогично вышеупомянутым исследованиям клинического улучшения под действием тиамин, наши результаты показали, что поддержание положительного влияния на уровень ТДФ в крови и силу мышц-сгибателей пальцев кистей требует постоянного введения тиамин. Тем не менее мы также наблюдали и долгосрочные эффекты, особенно по улучшению неврологических симптомов. Например, живость рефлексов у пациентки 1 или вибрационная чувствительность у пациентки 3 продолжали улучшаться после завершения приема витамина. Вполне вероятно, что индуцируемое тиамин прерывание порочного круга постоянно усиливающихся повреждений может стимулировать неврологические функции путем создания условий реабилитации.

Заболевание ШМТ не сопровождается дефицитом тиамин, однако для компенсации сопряженных с заболеванием метаболических нарушений могут быть нужны высокие дозы тиамин. Средние уровни ТДФ, активности транскетолазы или ее распределение между холо- и апоформами не отличаются у пациентов с ШМТ по сравнению с контрольной группой (рис. 2) и не отклоняются от референсных значений, известных из литературы для ТДФ [82, 94, 105–109] и транскетолазы [83–86]. Однако корреляция между уровнем ТДФ в крови и силой мышц-сгибателей пальцев кистей у пациентов мужского пола с ШМТ, не принимающих В1 (рис. 5, а), показывает, что чем больше уровень ТДФ, тем менее нарушена мышечная сила. С учетом положительного эффекта приема тиамин на силу мышц-сгибателей пальцев кистей (рис. 4), сопряженного с повышением основного внутриклеточного производного витамина В1 – его коферментной формы ТДФ – наши результаты свидетельствуют в пользу того, что при ШМТ может требоваться более высокое содержание витамина В1 и/или его производных, чем при нормальном метаболизме. В результате даже при отсутствии у пациентов с ШМТ дефи-

цита тиамин повышенная доступность тиамин может способствовать преодолению патофизиологических изменений.

Очевидно, что тиамин улучшает метаболизм за счет воздействия на ТДФ-зависимые ферменты: митохондриальные дегидрогеназы пирувата, 2-оксоглутарата, 2-оксоадипата и 2-оксокислот с разветвленной цепью, участвующие в генерации энергии из глюкозы и аминокислот, и цитозольную транскетолазу, участвующую в синтезе восстановительных эквивалентов для антиоксидантной защиты. Как генерация энергии, так и антиоксидантная защита нарушаются при различных невропатиях, в том числе ШМТ [8, 28, 30, 31, 110–113]. Некоторые исследования указывают на более высокие энергетические потребности при ходьбе у пациентов с ШМТ, что может быть связано с атрофией мышц и повышенной утомляемостью [114–116]. Эти метаболические особенности физической активности при ШМТ могут требовать более высоких уровней ТДФ у пациентов по сравнению с контрольной группой. В результате введение тиамин пациентам с ШМТ может приводить к увеличению силы мышц-сгибателей пальцев кистей, хотя показатели тиамин нового статуса при ШМТ не отличаются от таковых у здоровых людей.

Действительно, в модели нарушения митохондриального метаболизма [117], который, как известно, нарушен и в различных подтипах ШМТ [28, 29, 110, 118], нейроны и мозг *in vivo* поглощают больше тиамин, что указывает на повышенную потребность в тиамин при метаболическом стрессе. В результате при патологических состояниях могут требоваться дозы тиамин, значительно превышающие те, что достаточны для нормальных физиологических условий. В качестве примера можно привести улучшение реабилитации после введения высоких доз тиамин крысам с тяжелой травмой спинного мозга [30] или наше текущее наблюдение индуцированного тиамин улучшения при ШМТ. При некоторых формах ШМТ, вызванных мутациями ТДФ-зависимых ферментов, таких как киназа пируватдегидрогеназы или 2-оксоадипатдегидрогеназа, ТДФ может напрямую регулировать ферменты для преодоления нарушений их функций [28]. Однако ингибирование ТДФ-зависимой пируватдегидрогеназной реакции при ШМТ может быть опосредовано снижением уровня Ca^{2+} в митохондриях из-за вызываемых патологией актин-зависимых нарушений сайтов контакта между митохондриями и эндоплазматическим ретикуломом [118]. Поскольку ТДФ является активатором пируватдегидрогеназы, он может частично компенсировать недостаточность функции фермента, вызванную снижением концентрации другого активатора

фермента – митохондриального Ca^{2+} . Более того, другая Ca^{2+} -активируемая митохондриальная дегидрогеназа, а именно 2-оксоглутаратдегидрогеназа, которая связана с пируватдегидрогеназой через митохондриальный цикл трикарбоновых кислот, также является ТДФ-зависимой. Следовательно, при снижении концентрации митохондриального активатора Ca^{2+} ТДФ может быть альтернативным активатором цикла Кребса, субстрат которого, ацетил-КоА, поставляется пируватдегидрогеназой, а общий поток метаболитов лимитируется 2-оксоглутаратдегидрогеназой. ТДФ-зависимая активация митохондриальной части пути окисления глюкозы может конкурентно снижать митохондриальную деградацию аминокислот в качестве энергетических субстратов, тем самым препятствуя атрофии мышц. Эти явления могут способствовать наблюдаемому физиологическому результату введения тиамина, хотя и не могут быть детектированы при исследовании крови, определяющую массу которой составляют лишенные митохондрий эритроциты.

Пациенты с ШМТ отличаются от контрольной группы по регуляции транскетолазы ТДФ *in vitro* и тиамином *in vivo*. Активация транскетолазы ТДФ часто рассматривается как мера уровня ТДФ в крови [78, 79, 81, 119–124]. Это основано на предположении, что снижение уровня ТДФ приводит к повышению доли апо-транскетолазы, т.е. части общей транскетолазы, которая не насыщена ТДФ. Действительно, уровень апо-транскетолазы может повышаться при различных тиамин-дефицитных состояниях, которые в том числе могут наблюдаться у лиц, злоупотребляющих алкоголем, больных малярией и пожилых людей с риском развития тиаминовой недостаточности [81, 125–129]. В нашем исследовании трех клинических случаев женщин с ШМТ фракция апо-транскетолазы, определенная по активации транскетолазы ТДФ, также снижается с увеличением ТДФ при приеме витамина В1 (рис. 1). С другой стороны, эта незначительная фракция апо-транскетолазы не указывает на состояние дефицита тиамина у пациентов с ШМТ, поскольку уровни ТДФ у них находятся в пределах референсного интервала. Более того, фракция апо-транскетолазы более выражена у контрольной группы, где транскетолаза активируется добавлением ТДФ в реакционную среду в большей степени, чем у пациентов с ШМТ (рис. 3). Таким образом, при одинаковых средних уровнях ТДФ (рис. 2) у пациентов с ШМТ наблюдается более высокое насыщение транскетолазы ТДФ, чем у здоровых людей. Отсутствие активации транскетолазы ТДФ у больных ШМТ известно также из независимого исследования [130]. Интересно, что исследование деменции у пожилых пациентов показало,

что активация транскетолазы ТДФ выше у пациентов без деменции по сравнению с пациентами с деменцией [120], аналогично нашему наблюдению пациентов с невропатией ШМТ по сравнению с контрольной группой (рис. 3).

Более того, при приеме витамина В1 ТДФ крови в группе ШМТ и в контрольной группе растет сходным образом (рис. 2). Тем не менее, несмотря на значимое повышение уровня ТДФ, в контрольной группе сохраняется статистически достоверная активация транскетолазы ТДФ (рис. 3). Полученные данные позволяют предположить, что этот тип регуляции транскетолазы не обязательно является показателем дефицита тиамина, но также присущ нормальному метаболизму. Важность этой латентной транскетолазы особенно очевидна у мужчин с ШМТ, для которых показана сильная отрицательная корреляция силы мышечных сгибателей пальцев кистей с активностями эндогенной холо-транскетолазы и общей транскетолазы, тогда как корреляция силы рук с фракцией апо-транскетолазы ($r_s = 0,4$, $p = 0,2$) положительна (рис. 5, мужчины с ШМТ).

В результате имеющиеся данные указывают на то, что насыщение транскетолазы ТДФ контролируется не только уровнем ТДФ, демонстрируя в очередной раз уже известные ограничения в использовании активации транскетолазы ТДФ в качестве меры уровня этого кофермента внутри клеток [87, 131]. В частности, более высокое насыщение транскетолазы ТДФ может наблюдаться при неврологических заболеваниях, как показано нами (рис. 3) и в независимом исследовании [120]. Очевидно, что насыщение транскетолазы ТДФ зависит и от других регуляторных механизмов, дополняющих регуляторное действие внутриклеточного ТДФ. Корреляции между уровнями эндогенной холо-транскетолазы и общей транскетолазы (табл. 3) свидетельствуют о том, что экспрессия транскетолазы может быть одним из таких механизмов. Действительно, согласно закону действующих масс, образование комплекса между транскетолазой и ТДФ зависит от концентраций обоих компонентов, т.е. как ТДФ, так и транскетолазы. Различное сродство транскетолазы к ТДФ также может регулироваться посттрансляционными модификациями. Многочисленные варианты эритроцитарной транскетолазы, идентифицируемые с помощью изоэлектрического фокусирования, различаются по своему сродству к ТДФ [131]. Показано, что при синдроме Вернике–Корсакова транскетолаза фибробластов обладает пониженным сродством к ТДФ по сравнению со здоровыми контролями [132], что может быть связано с посттрансляционными модификациями [133]. Известно, что фосфорилирование [134] и ацилирование [65, 135]

являются функционально важными для транскетолазы, что свидетельствует о роли посттрансляционных модификаций в ее регуляции. Часто такие модификации изменяются при патологиях, что может также влиять на сродство фермента к ТДФ и насыщение фермента ТДФ.

Помимо статистически значимой активации исследуемой транскетолазы ТДФ лишь в контрольной группе (рис. 3), у контрольных пациентов не наблюдается снижение активности фермента в ответ на прием витамина В1, которое демонстрируют пациенты с ШМТ (рис. 2), предоставляя дополнительное свидетельство разной регуляции транскетолазы тиамином у здоровых людей и пациентов с ШМТ. Такое подавление активности фермента при введении тиамин хорошо выражено при наблюдении трех пациенток с ШМТ1А (рис. 1). Снижение активности общей транскетолазы в ответ на введение В1 может быть опосредовано регуляцией экспрессии генов тиамином/ТДФ [136, 137]. Отрицательная регуляция может быть связана с многогранной ролью тиамин/ТДФ в антиоксидантной защите и целостности ДНК (см. обзор Contestabile et al. [138]). Не исключены и изменения метаболома хозяина посредством ТДФ-рибопереклювателя у кишечной микробиоты человека [139].

Таким образом, пациентам с ШМТ присущая регуляция транскетолазы ТДФ и его предшественником тиамином *in vivo*, по сравнению с контрольной группой, хотя средние уровни ТДФ, транскетолазы или распределение фермента между апо- и холоформами существенно не отличаются от значений в контрольной группе (рис. 2). Отсутствие у пациентов с ШМТ латентной (апо-) формы транскетолазы, которая может активироваться ТДФ при повышенных метаболических потребностях, например, при мышечном сокращении, может вносить вклад в известное снижение физической работоспособности и повышенную утомляемость при ШМТ.

Связанные с полом изменения корреляций между параметрами тиаминового статуса крови у пациентов с ШМТ по сравнению со здоровыми людьми. Роль регуляции транскетолазы коферментом ТДФ в норме и при невропатии ШМТ дополнительно подтверждается корреляционным анализом параметров тиаминового статуса у здоровых людей и пациентов с ШМТ. Выявленные половые различия в этих корреляциях могут лежать в основе как физиологической зависимости силы мышц-сгибателей пальцев кистей от пола, так и изменений взаимоотношений между транскетолазой и ТДФ при ШМТ (табл. 3). Действительно, наши результаты показывают, что женщины контрольной группы обладают механизмами, позволяющими сохранять значительную часть

транскетолазы в апоформе даже при высокой активности общей транскетолазы и достаточном уровне ТДФ. Напротив, уровень апо-транскетолазы у контрольных мужчин в большей степени определяется уровнем ТДФ. Эти взаимосвязи меняются при ШМТ, когда фракция апо-транскетолазы становится сильнее связанной с ТДФ у пациенток-женщин, в то время как пациенты-мужчины приобретают механизмы, приводящие к снижению активностей общей транскетолазы и ее эндогенной холоформы с повышением ТДФ.

Зависимость изменений корреляций между параметрами тиаминового статуса при заболевании ШМТ от пола, показанная в табл. 3, подтверждает наблюдение о том, что выраженные корреляции силы мышц-сгибателей пальцев кистей с ТДФ (положительные) и транскетолазой (отрицательные) наблюдаются у мужчин, но не у женщин, страдающих ШМТ (рис. 5). Возможно, что у пациенток с ШМТ влияние ТДФ на силу мышц-сгибателей пальцев кистей в большей степени опосредовано другими ТДФ-зависимыми ферментами. В частности, существуют специфические для пола различия в экспрессии ферментов ТДФ-зависимого пируватдегидрогеназного комплекса и его киназы [140, 141].

Наши данные о половом диморфизме механизмов регуляции транскетолазы тиамином согласуются с известными из независимых исследований половыми различиями в метаболизме тиамин. В частности, в разных популяциях потребление тиамин у здоровых мужчин было выше, чем у женщин [68, 142, 143]. Данная особенность, подкрепленная различиями в других тиамин-зависимых процессах и их регуляции [140, 141], может вносить вклад не только в более высокую мышечную силу мужчин, по сравнению с женщинами, но также и в зависимость от пола корреляции между параметрами тиаминового статуса как в контрольной группе, так и у пациентов с ШМТ (табл. 3). У пожилых людей потребление тиамин обоими полами снижается, но у женщин с деменцией потребление тиамин ниже, чем у женщин контрольной группы [120]. В модели приматов транскетолаза эритроцитов и ее насыщение ТДФ изменяются в течение менструального цикла [119]. Эти особенности метаболизма тиамин, связанные с полом и заболеванием, хорошо согласуются с нашими выводами о том, что корреляции между различными параметрами тиаминового статуса крови зависят от пола и по-разному меняются у пациентов-мужчин и пациенток-женщин при ШМТ (табл. 3). В этой связи стоит отметить, что различное взаимодействие между компонентами тиамин-зависимой сети белков и метаболитов может определяться не только изучаемыми параметрами крови и другими ТДФ-зависимыми

ферментами, но и белками, использующими тиамин или его производные в качестве некоферментных регуляторов, включая белки, участвующие в нейротрансмиссии [21, 144].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем исследовании показано, что тиамин или его фармакологические формы улучшают клинические показатели у пациентов с ШМТ. Таким образом, пероральный прием высоких доз тиамина может быть рекомендован в качестве поддерживающей терапии при невропатии ШМТ. Положительная взаимосвязь между уровнем ТДФ в крови и силой мышц-сгибателей пальцев кистей у пациентов с ШМТ дополняет предыдущие сообщения о благоприятном влиянии тиамина при других невропатиях. Ответы транскетолазы крови на добавление ТДФ в среду измерения активности и введение тиамина *in vivo* изменяются при ШМТ по сравнению со здоровым состоянием. Корреляции между различными параметрами, характеризующими тиаминный статус в крови людей, показывают зависящие от пола изменения в системе процессов с участием тиамина у пациентов с ШМТ по сравнению с контрольной группой. В результате представленного пилотного исследования выявлены ранее неизвестные биохимические маркеры изменений в ТДФ-зависимом метаболизме при ШМТ, что открывает путь к дальнейшему полномасштабному исследованию клинических улучшений у пациентов с ШМТ при приеме витамина В1 и его производных.

Вклад авторов. Все авторы внесли свой вклад в методологию исследования. Использованные в исследовании материалы предоставили О.Н.С., Н.В.Б. и О.П.С. Данные были собраны О.Н.С. и О.П.С., проанализированы и визуализированы А.В.А., А.В.Г. и В.И.Б. Текст статьи был написан В.И.Б. на основе подготовленного А.В.А. описания результатов исследования клинических случаев и проведенного В.И.Б. и А.В.Г. анализа результатов по выборке пациентов ШМТ и контрольных участников. Все авторы прочитали и одобрили финальную версию манускрипта.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-54-7804 под руководством А.В.Г.) и государственной темы АААА-А19-119042590056-2.

Благодарности. Авторы выражают благодарность персоналу МОНИКИ, участвовавшему в обслуживании пациентов и проведении медицинских обследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Данное исследование было проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрено Московским областным научно-исследовательским клиническим институтом имени М.Ф. Владимирского (Протокол № 17 от 10.12.2020). Письменное информированное согласие было получено от всех участников, включенных в исследование.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saporta, M. A. (2014) Charcot–Marie–Tooth disease and other inherited neuropathies, *Continuum (Minneapolis)*, **20**, 1208-1225, <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000455885.37169.4c>.
2. Nagappa, M., Sharma, S., and Taly, A. B. (2023) *Charcot–Marie–Tooth Disease*, in *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), pp. 1-31.
3. Pareyson, D., and Marchesi, C. (2009) Diagnosis, natural history, and management of Charcot–Marie–Tooth disease, *Lancet Neurol.*, **8**, 654-667, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70110-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70110-3).
4. Rossor, A. M., Polke, J. M., Houlden, H., and Reilly, M. M. (2013) Clinical implications of genetic advances in Charcot–Marie–Tooth disease, *Nat. Rev. Neurol.*, **9**, 562-571, <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.179>.
5. Saporta, M. A., and Shy, M. E. (2013) Inherited peripheral neuropathies, *Neurol. Clin.*, **31**, 597-619, <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2013.01.009>.
6. Shy, M. E., Blake, J., Krajewski, K., Fuerst, D. R., Laura, M., Hahn, A. F., Li, J., Lewis, R. A., and Reilly, M. (2005) Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability, *Neurology*, **64**, 1209-1214, <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000156517.00615.A3>.
7. Gess, B., Baets, J., De Jonghe, P., Reilly, M. M., Pareyson, D., and Young, P. (2015) Ascorbic acid for the treatment of Charcot–Marie–Tooth disease, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2015**, CD011952, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011952>.
8. Baets, J., De Jonghe, P., and Timmerman, V. (2014) Recent advances in Charcot–Marie–Tooth disease, *Curr. Opin. Neurol.*, **27**, 532-540, <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000131>.

9. Estévez-Arias, B., Carrera-García, L., Nascimento, A., Cantarero, L., Hoenicka, J., and Palau, F. (2022) Genetic approaches and pathogenic pathways in the clinical management of Charcot–Marie–Tooth disease, *J. Translat. Genetics Genomics*, **114**, 333-352, <https://doi.org/10.20517/jtgg.2022.04>.
10. Higuchi, Y., and Takashima, H. (2023) Clinical genetics of Charcot–Marie–Tooth disease, *J. Hum. Genet.*, **68**, 199-214, <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01031-2>.
11. Skre, H. (1974) Genetic and clinical aspects of Charcot–Marie–Tooth's disease, *Clin. Genet.*, **6**, 98-118, <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1974.tb00638.x>.
12. Kurihara, S., Adachi, Y., Wada, K., Awaki, E., Harada, H., and Nakashima, K. (2002) An epidemiological genetic study of Charcot–Marie–Tooth disease in Western Japan, *Neuroepidemiology*, **21**, 246-250, <https://doi.org/10.1159/000065643>.
13. Braathen, G. J. (2012) Genetic epidemiology of Charcot–Marie–Tooth disease, *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, **193**, iv-22, <https://doi.org/10.1111/ane.12013>.
14. Barreto, L. C., Oliveira, F. S., Nunes, P. S., de Franca Costa, I. M., Garcez, C. A., Goes, G. M., Neves, E. L., de Souza Siqueira Quintans, J., and de Souza Araujo, A. A. (2016) Epidemiologic study of Charcot–Marie–Tooth disease: a systematic review, *Neuroepidemiology*, **46**, 157-165, <https://doi.org/10.1159/000443706>.
15. Pfeiffer, G., Wicklein, E. M., Ratusinski, T., Schmitt, L., and Kunze, K. (2001) Disability and quality of life in Charcot–Marie–Tooth disease type 1, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **70**, 548-550, <https://doi.org/10.1136/jnnp.70.4.548>.
16. Reilly, M. M. (1998) Genetically determined neuropathies, *J. Neurol.*, **245**, 6-13, <https://doi.org/10.1007/s004150050167>.
17. Li, J., Parker, B., Martyn, C., Natarajan, C., and Guo, J. (2013) The *PMP22* gene and its related diseases, *Mol. Neurobiol.*, **47**, 673-698, <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8370-x>.
18. Huxley, C., Passage, E., Robertson, A. M., Youl, B., Huston, S., Manson, A., Saberan-Djoniedi, D., Figarella-Branger, D., Pellissier, J. F., Thomas, P. K., and Fontes, M. (1998) Correlation between varying levels of *PMP22* expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice, *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 449-458, <https://doi.org/10.1093/hmg/7.3.449>.
19. Inoue, K., Dewar, K., Katsanis, N., Reiter, L. T., Lander, E. S., Devon, K. L., Wyman, D. W., Lupski, J. R., and Birren, B. (2001) The 1.4-Mb *CMT1A* duplication/*HNPP* deletion genomic region reveals unique genome architectural features and provides insights into the recent evolution of new genes, *Genome Res.*, **11**, 1018-1033, <https://doi.org/10.1101/gr.180401>.
20. Maeda, K., Kaji, R., Yasuno, K., Jambaldorj, J., Nodera, H., Takashima, H., Nakagawa, M., Makino, S., and Tamiya, G. (2007) Refinement of a locus for autosomal dominant hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominancy (HMSN-P) and genetic heterogeneity, *J. Hum. Genet.*, **52**, 907-914, <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0193-7>.
21. Aleshin, V. A., Mkrtchyan, G. V., and Bunik, V. I. (2019) Mechanisms of non-coenzyme action of thiamine: protein targets and medical significance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 829-850, <https://doi.org/10.1134/S0006297919080017>.
22. Bunik, V. I., and Aleshin, V. A. (2017) Analysis of the protein binding sites for thiamin and its derivatives to elucidate molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin (vitamin B1), *Studies Nat. Products Chem.*, **53**, 375-429, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63930-1.00011-9>.
23. Sambon, M., Wins, P., and Bettendorff, L. (2021) Neuroprotective effects of thiamine and precursors with higher bioavailability: focus on benfotiamine and dibenzoylthiamine, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5418, <https://doi.org/10.3390/ijms22115418>.
24. Sechi, G. P., Bardanzellu, F., Pintus, M. C., Sechi, M. M., Marcialis, M. A., and Fanos, V. (2021) Thiamine as a possible neuroprotective strategy in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 42, <https://doi.org/10.3390/antiox11010042>.
25. Bunik, V. I. (2014) Benefits of thiamin (vitamin B1) administration in neurodegenerative diseases may be due to both the coenzyme and non-coenzyme roles of thiamin, *J. Alzheimers Dis. Parkinsonism*, **4**, 173-177, <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000173>.
26. Husn, M., Amin, Z., Ali, Y., Kanwal, L., Sabir, K., Shah, S. A., and Shah, S. F. (2023) Neuroprotective effects of vitamin B1 on memory impairment and suppression of pro-inflammatory cytokines in traumatic brain injury, *Metab. Brain Dis.*, **38**, 2175-2184, <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01245-z>.
27. Azzedine, H., Senderek, J., Rivolta, C., and Chrast, R. (2012) Molecular genetics of Charcot–Marie–Tooth disease: from genes to genomes, *Mol. Syndromol.*, **3**, 204-214, <https://doi.org/10.1159/000343487>.
28. Bunik, V. (2023) The therapeutic potential of vitamins B1, B3 and B6 in Charcot–Marie–Tooth disease with the compromised status of vitamin-dependent processes, *Biology*, **12**, 897, <https://doi.org/10.3390/biology12070897>.
29. Schiavon, C. R., Shadel, G. S., and Manor, U. (2021) Impaired mitochondrial mobility in Charcot-Marie-Tooth disease, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 624823, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.624823>.

30. Boyko, A., Tsepkova, P., Aleshin, V., Artiukhov, A., Mkrtychyan, G., Ksenofontov, A., Baratova, L., Ryabov, S., Graf, A., and Bunik, V. (2021) Severe spinal cord injury in rats induces chronic changes in the spinal cord and cerebral cortex metabolism, adjusted by thiamine that improves locomotor performance, *Front. Mol. Neurosci.*, **14**, 620593, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.620593>.
31. Mkrtychyan, G. V., Ucal, M., Mullebner, A., Dumitrescu, S., Kames, M., Moldzio, R., Molcanyi, M., Schaefer, S., Weidinger, A., Schaefer, U., Hescheler, J., Duvigneau, J. C., Redl, H., Bunik, V. I., and Kozlov, A. V. (2018) Thiamine preserves mitochondrial function in a rat model of traumatic brain injury, preventing inactivation of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 925-931, <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2018.05.005>.
32. Weidinger, A., Milivojevic, N., Hosmann, A., Duvigneau, J. C., Szabo, C., Toro, G., Rauter, L., Vaglio-Garro, A., Mkrtychyan, G. V., Trofimova, L., Sharipov, R. R., Surin, A. M., Krasilnikova, I. A., Pinelis, V. G., Tretter, L., Moldzio, R., Bayir, H., Kagan, V. E., Bunik, V. I., and Kozlov, A. V. (2023) Oxoglutarate dehydrogenase complex controls glutamate-mediated neuronal death, *Redox Biol.*, **62**, 102669, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102669>.
33. Gibson, G. E., Hirsch, J. A., Fonzetti, P., Jordan, B. D., Cirio, R. T., and Elder, J. (2016) Vitamin B1 (thiamine) and dementia, *Ann. N Y Acad. Sci.*, **1367**, 21-30, <https://doi.org/10.1111/nyas.13031>.
34. Gibson, G. E., Hirsch, J. A., Cirio, R. T., Jordan, B. D., Fonzetti, P., and Elder, J. (2013) Abnormal thiamine-dependent processes in Alzheimer's disease. Lessons from diabetes, *Mol. Cell. Neurosci.*, **55**, 17-25, <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.09.001>.
35. Tsepkova, P. M., Artiukhov, A. V., Boyko, A. I., Aleshin, V. A., Mkrtychyan, G. V., Zvyagintseva, M. A., Ryabov, S. I., Ksenofontov, A. L., Baratova, L. A., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in rat brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 723-736, <https://doi.org/10.1134/S0006297917060098>.
36. Boyko, A., Ksenofontov, A., Ryabov, S., Baratova, L., Graf, A., and Bunik, V. (2017) Delayed influence of spinal cord injury on the amino acids of NO[•] metabolism in rat cerebral cortex is attenuated by thiamine, *Front. Med.*, **4**, 249, <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00249>.
37. Saber, R., Mirazi, N., Amirahmadi, S., Darbandi, Z. K., Vafae, F., Rajabian, A., and Hosseini, M. (2023) Ameliorative effects of thiamin on learning behavior and memory dysfunction in a rat model of hypothyroidism: implication of oxidative stress and acetylcholinesterase, *Metab. Brain Dis.*, **38**, 2603-2613, <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01317-0>.
38. Felhi, R., Sfaihi, L., Charif, M., Frikha, F., Aoiadni, N., Kamoun, T., Lenaers, G., and Fakhfakh, F. (2023) Vitamin B1 deficiency leads to high oxidative stress and mtDNA depletion caused by SLC19A3 mutation in consanguineous family with Leigh syndrome, *Metab. Brain Dis.*, **38**, 2489-2497, <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01280-w>.
39. Kunzke, T., Buck, A., Prade, V. M., Feuchtinger, A., Prokopchuk, O., Martignoni, M. E., Heisz, S., Hauner, H., Janssen, K. P., Walch, A., and Aichler, M. (2020) Derangements of amino acids in cachectic skeletal muscle are caused by mitochondrial dysfunction, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **11**, 226-240, <https://doi.org/10.1002/jcsm.12498>.
40. Penna, F., Ballaro, R., Beltra, M., De Lucia, S., and Costelli, P. (2018) Modulating metabolism to improve cancer-induced muscle wasting, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, 7153610, <https://doi.org/10.1155/2018/7153610>.
41. Calderon-Ospina, C. A., and Nava-Mesa, M. O. (2020) B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin, *CNS Neurosci. Ther.*, **26**, 5-13, <https://doi.org/10.1111/cns.13207>.
42. Baltrusch, S. (2021) The role of neurotropic B vitamins in nerve regeneration, *Biomed. Res. Int.*, **2021**, 9968228, <https://doi.org/10.1155/2021/9968228>.
43. Gubler, C. J., Johnson, L. R., and Wittorf, J. H. (1970) Yeast transketolase (sedoheptulose-7-phosphate:d-glyceraldehyde-3-phosphate dihydroxyacetone transferase, EC 2.2.1.1) assay of thiamine diphosphate, *Methods Enzymol.*, **18**, 120-125, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)18290-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)18290-0).
44. Kochetov, G. A. (1980) *Practice guidelines on biochemistry*, **2 ed.**, Vysshaya shkola, Moscow.
45. Tikhomirova, N. K., and Kochetov, G. A. (1990) Purification of transketolase from baker's yeast by an immunoadsorbent, *Biochem. Int.*, **22**, 31-36.
46. Solovjeva, O. N. (2002) Isolation and properties of noncovalent complex of transketolase with RNA, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 667-671, <https://doi.org/10.1023/a:1016198321838>.
47. Heinrich, C. P., Noack, K., and Wiss, O. (1972) Chemical modification of tryptophan at the binding site of thiamine-pyrophosphate in transketolase from baker's yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1427-1432, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(72\)90498-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(72)90498-6).
48. Solovjeva, O. N., Selivanov, V. A., Orlov, V. N., and Kochetov, G. A. (2019) Stages of the formation of nonequivalence of active centers of transketolase from baker's yeast, *Mol. Catal.*, **466**, 122-129, <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.01.00>.
49. Solari, A., Laura, M., Salsano, E., Radice, D., Pareyson, D., and Group, C.-T. S. (2008) Reliability of clinical outcome measures in Charcot–Marie–Tooth disease, *Neuromusc. Disord.*, **18**, 19-26, <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.09.006>.

50. Escolar, D. M., Henricson, E. K., Mayhew, J., Florence, J., Leshner, R., Patel, K. M., and Clemens, P. R. (2001) Clinical evaluator reliability for quantitative and manual muscle testing measures of strength in children, *Muscle Nerve*, **24**, 787-793, <https://doi.org/10.1002/mus.1070>.
51. Mathiowetz, V., Kashman, N., Volland, G., Weber, K., Dowe, M., and Rogers, S. (1985) Grip and pinch strength: normative data for adults, *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **66**, 69-74.
52. Sidorova, O. P. (1986) Quantitative assessment of muscle strength in hereditary diseases of the nervous system [in Russian], *S. S. Korsakov J. Neurol. Psychiatry*, **3**, 346-347.
53. Videler, A. J., Beelen, A., Aufdemkampe, G., de Groot, I. J., and Van Leemputte, M. (2002) Hand strength and fatigue in patients with hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II), *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **83**, 1274-1278, <https://doi.org/10.1053/apmr.2002.34282>.
54. Svensson, E., and Hager-Ross, C. (2006) Hand function in Charcot Marie Tooth: test retest reliability of some measurements, *Clin. Rehabil.*, **20**, 896-908, <https://doi.org/10.1177/0269215506072184>.
55. Pierzchlewicz, K., Kepa, I., Podogrodzki, J., and Kotulska, K. (2021) Spinal muscular atrophy: the use of functional motor scales in the era of disease-modifying treatment, *Child Neurol. Open*, **8**, 2329048X211008725, <https://doi.org/10.1177/2329048X211008725>.
56. Wu, J. W., Pepler, L., Maturi, B., Afonso, A. C. F., Sarmiento, J., and Haldenby, R. (2022) Systematic review of motor function scales and patient-reported outcomes in spinal muscular atrophy, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, **101**, 590-608, <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000001869>.
57. Kim, M., Won, C. W., and Kim, M. (2018) Muscular grip strength normative values for a Korean population from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2014-2015, *PLoS One*, **13**, e0201275, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201275>.
58. James, M. A. (2007) Use of the Medical Research Council muscle strength grading system in the upper extremity, *J. Hand Surg. Am.*, **32**, 154-156, <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2006.11.008>.
59. Gekht, B. M., Kasatkina, L. F., Samoilov, M. I., and Sanadze, A. G. (1997) Electromyography in diagnostics of neuromuscular disorders, TRTU, Taganrog.
60. American Diabetes Association Professional Practice, C. (2022) 12. Retinopathy, neuropathy, and foot care: standards of medical care in diabetes-2022, *Diabetes Care*, **45**, S185-S194, <https://doi.org/10.2337/dc22-S012>.
61. Hilz, M. J., Axelrod, F. B., Hermann, K., Haertl, U., Duetsch, M., and Neundorfer, B. (1998) Normative values of vibratory perception in 530 children, juveniles and adults aged 3-79 years, *J. Neurol. Sci.*, **159**, 219-225, [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(98\)00177-4](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(98)00177-4).
62. Starostina, E. G. (2017) Diabetic neuropathy: some issues in differential diagnosis and systemic treatment of the pain syndrome, *Russ. Med. J.*, **22**, 1665-1676.
63. Graf, A., Trofimova, L., Loshinskaja, A., Mkrtychyan, G., Strokina, A., Lovat, M., Tylicky, A., Strumilo, S., Bettendorff, L., and Bunik, V. I. (2013) Up-regulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase as a stress response, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 175-189, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.07.002>.
64. De La Haba, G., Leder, I. G., and Racker, E. (1955) Crystalline transketolase from bakers' yeast: isolation and properties, *J. Biol. Chem.*, **214**, 409-426, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70978-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70978-2).
65. Aleshin, V. A., Kaehne, T., Maslova, M. V., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2024) Posttranslational acylations of the rat brain transketolase discriminate the enzyme responses to inhibitors of ThDP-dependent enzymes or thiamine transport, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 917, <https://doi.org/10.3390/ijms25020917>.
66. Ali, M., Gubler, C. J., Al Saleh, J., and Abu Farsak, F. (1987) A comparison of transketolase assay and transketolase and lactate dehydrogenase activity levels in whole blood and red cell hemolysates and in leukocytes, *Compar. Biochem. Physiol. B Compar. Biochem.*, **87**, 833-835, [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90397-x](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90397-x).
67. Buttery, J. E., and Pannall, P. R. (1985) Kinetic transketolase assay: use of whole-blood hemolysate as the sample, *Clin. Chem.*, **31**, 1086, <https://doi.org/10.1093/clinchem/31.6.1086>.
68. Mataix, J., Aranda, P., Sanchez, C., Montellano, M. A., Planells, E., and Llopis, J. (2003) Assessment of thiamin (vitamin B1) and riboflavin (vitamin B2) status in an adult Mediterranean population, *Br. J. Nutr.*, **90**, 661-666, <https://doi.org/10.1079/bjn2003926>.
69. Wood, B., Breen, K. J., and Penington, D. G. (1977) Thiamine status in alcoholism, *Aust. N Z J Med.*, **7**, 475-484, <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.1977.tb03368.x>.
70. Soukaloun, D., Lee, S. J., Chamberlain, K., Taylor, A. M., Mayxay, M., Sisouk, K., Soumphonphakdy, B., Latsavong, K., Akkhavong, K., Phommachanh, D., Sengmeuang, V., Luangxay, K., McDonagh, T., White, N. J., and Newton, P. N. (2011) Erythrocyte transketolase activity, markers of cardiac dysfunction and the diagnosis of infantile beriberi, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **5**, e971, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000971>.
71. Jeyasingham, M. D., Pratt, O. E., Burns, A., Shaw, G. K., Thomson, A. D., and Marsh, A. (1987) The activation of red blood cell transketolase in groups of patients especially at risk from thiamin deficiency, *Psychol. Med.*, **17**, 311-318, <https://doi.org/10.1017/s0033291700024843>.

72. Jeyasingham, M. D., Pratt, O. E., Shaw, G. K., and Thomson, A. D. (1987) Changes in the activation of red blood cell transketolase of alcoholic patients during treatment, *Alcohol Alcohol.*, **22**, 359-365.
73. Seear, M., Lockitch, G., Jacobson, B., Quigley, G., and MacNab, A. (1992) Thiamine, riboflavin, and pyridoxine deficiencies in a population of critically ill children, *J. Pediatr.*, **121**, 533-538, [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(05\)81140-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(05)81140-0).
74. Bailey, A. L., Finglas, P. M., Wright, A. J., and Southon, S. (1994) Thiamin intake, erythrocyte transketolase (EC 2.2.1.1) activity and total erythrocyte thiamin in adolescents, *Br. J. Nutr.*, **72**, 111-125, <https://doi.org/10.1079/bjn19940014>.
75. Datta, A. G., and Racker, E. (1961) Mechanism of action of transketolase. II. The substrate-enzyme intermediate, *J. Biol. Chem.*, **236**, 624-628, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64278-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64278-4).
76. Kochetov, G. A. (1982) Transketolase from yeast, rat liver, and pig liver, *Methods Enzymol.*, **90 Pt E**, 209-223, [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(82\)90128-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(82)90128-8).
77. Schellenberger, A., and Hubner, G. (1965) On the separation of phosphoric acid esters of thiamine and its analogues by gradient elution [in German], *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **343**, 189-192.
78. Talwar, D., Davidson, H., Cooney, J., and St, J. R. D. (2000) Vitamin B(1) status assessed by direct measurement of thiamin pyrophosphate in erythrocytes or whole blood by HPLC: comparison with erythrocyte transketolase activation assay, *Clin. Chem.*, **46**, 704-710, <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.5.704>.
79. Jones, K. S., Parkington, D. A., Cox, L. J., and Koulman, A. (2021) Erythrocyte transketolase activity coefficient (ETKAC) assay protocol for the assessment of thiamine status, *Ann. N Y Acad. Sci.*, **1498**, 77-84, <https://doi.org/10.1111/nyas.14547>.
80. Howard, J. M. (2000) Assessment of vitamin B(1) status, *Clin. Chem.*, **46**, 1867-1868, <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.11.1867>.
81. Baines, M., and Davies, G. (1988) The evaluation of erythrocyte thiamin diphosphate as an indicator of thiamin status in man, and its comparison with erythrocyte transketolase activity measurements, *Ann. Clin. Biochem.*, **25 (Pt 6)**, 698-705, <https://doi.org/10.1177/000456328802500617>.
82. Lu, J., and Frank, E. L. (2008) Rapid HPLC measurement of thiamine and its phosphate esters in whole blood, *Clin. Chem.*, **54**, 901-906, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.099077>.
83. Himmo, S. D., Thomson, M., and Gubler, C. J. (1988) Isolation of transketolase from human erythrocytes, *Prep. Biochem.*, **18**, 261-276, <https://doi.org/10.1080/00327488808062528>.
84. Warnock, L. G., and Prudhomme, C. R. (1982) The isolation and preliminary characterization of apotransketolase from human erythrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 719-723, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(82\)91770-3](https://doi.org/10.1016/0006-291x(82)91770-3).
85. Chong, Y. H., and Ho, G. S. (1973) Erythrocyte transketolase activity and anaemia, *Med. J. Malaysia*, **28**, 113-114.
86. Michalak, S., Michalowska-Wender, G., Adamcewicz, G., and Wender, M. B. (2013) Erythrocyte transketolase activity in patients with diabetic and alcoholic neuropathies, *Folia Neuropathol.*, **51**, 222-226, <https://doi.org/10.5114/fn.2013.37706>.
87. Jones, K. S., Parkington, D. A., Bourassa, M. W., Cerami, C., and Koulman, A. (2023) Protocol and application of basal erythrocyte transketolase activity to improve assessment of thiamine status, *Ann. N Y Acad. Sci.*, **1521**, 104-111, <https://doi.org/10.1111/nyas.14962>.
88. Parkhomenko, Y. M., Kudryavtsev, P. A., Pylypchuk, S. Y., Chekhivska, L. I., Stepanenko, S. P., Sergiichuk, A. A., and Bunik, V. I. (2011) Chronic alcoholism in rats induces a compensatory response, preserving brain thiamine diphosphate, but the brain 2-oxo acid dehydrogenases are inactivated despite unchanged coenzyme levels, *J. Neurochem.*, **117**, 1055-1065, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07283.x>.
89. Osiezagha, K., Ali, S., Freeman, C., Barker, N. C., Jabeen, S., Maitra, S., Olagbemiro, Y., Richie, W., and Bailey, R. K. (2013) Thiamine deficiency and delirium, *Innov. Clin. Neurosci.*, **10**, 26-32.
90. Costantini, A., Pala, M. I., Grossi, E., Mondonico, S., Cardelli, L. E., Jenner, C., Proietti, S., Colangeli, M., and Fancellu, R. (2015) Long-term treatment with high-dose thiamine in Parkinson disease: an open-label pilot study, *J. Altern. Complement. Med.*, **21**, 740-747, <https://doi.org/10.1089/acm.2014.0353>.
91. Costantini, A., Pala, M. I., Compagnoni, L., and Colangeli, M. (2013) High-dose thiamine as initial treatment for Parkinson's disease, *BMJ Case Rep.*, **2013**, <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-009289>.
92. Gibson, G. E., Luchsinger, J. A., Cirio, R., Chen, H., Franchino-Elder, J., Hirsch, J. A., Bettendorff, L., Chen, Z., Flowers, S. A., Gerber, L. M., Grandville, T., Schupf, N., Xu, H., Stern, Y., Habeck, C., Jordan, B., and Fonzetti, P. (2020) Benfotiamine and cognitive decline in Alzheimer's disease: results of a randomized placebo-controlled phase IIa clinical trial, *J. Alzheimers Dis.*, **78**, 989-1010, <https://doi.org/10.3233/JAD-200896>.
93. Pan, X., Fei, G., Lu, J., Jin, L., Pan, S., Chen, Z., Wang, C., Sang, S., Liu, H., Hu, W., Zhang, H., Wang, H., Wang, Z., Tan, Q., Qin, Y., Zhang, Q., Xie, X., Ji, Y., Cui, D., Gu, X., Xu, J., Yu, Y., and Zhong, C. (2016) Measurement of blood thiamine metabolites for Alzheimer's disease diagnosis, *EBioMedicine*, **3**, 155-162, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.11.039>.

94. Pan, X., Sang, S., Fei, G., Jin, L., Liu, H., Wang, Z., Wang, H., and Zhong, C. (2017) Enhanced activities of blood thiamine diphosphatase and monophosphatase in Alzheimer's disease, *PLoS One*, **12**, e0167273, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167273>.
95. Costantini, A., Laureti, T., Pala, M. I., Colangeli, M., Cavalieri, S., Pozzi, E., Brusco, A., Salvarani, S., Serrati, C., and Fancellu, R. (2016) Long-term treatment with thiamine as possible medical therapy for Friedreich ataxia, *J. Neurol.*, **263**, 2170-2178, <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8244-7>.
96. Costantini, A., Giorgi, R., D'Agostino, S., and Pala, M. I. (2013) High-dose thiamine improves the symptoms of Friedreich's ataxia, *BMJ Case Rep.*, **2013**, <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-009424>.
97. Costantini, A., Nappo, A., Pala, M. I., and Zappone, A. (2013) High dose thiamine improves fatigue in multiple sclerosis, *BMJ Case Rep.*, **2013**, <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-009144>.
98. Botez, M. I., Botez, T., Ross-Chouinard, A., and Lalonde, R. (1993) Thiamine and folate treatment of chronic epileptic patients: a controlled study with the Wechsler IQ scale, *Epilepsy Res.*, **16**, 157-163, [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(93\)90030-b](https://doi.org/10.1016/0920-1211(93)90030-b).
99. Aleshin, V. A., Graf, A. V., Artiukhov, A. V., Boyko, A. I., Ksenofontov, A. L., Maslova, M. V., Nogues, I., di Salvo, M. L., and Bunik, V. I. (2021) Physiological and biochemical markers of the sex-specific sensitivity to epileptogenic factors, delayed consequences of seizures and their response to vitamins B1 and B6 in a rat model, *Pharmaceuticals (Basel)*, **14**, 737, <https://doi.org/10.3390/ph14080737>.
100. Tapias, V., Jainuddin, S., Ahuja, M., Stack, C., Elipenahli, C., Vignisse, J., Gerges, M., Starkova, N., Xu, H., Starkov, A. A., Bettendorff, L., Hushpulian, D. M., Smirnova, N. A., Gazaryan, I. G., Kaidery, N. A., Wakade, S., Calingasan, N. Y., Thomas, B., Gibson, G. E., Dumont, M., and Beal M. F. (2018) Benfotiamine treatment activates the Nrf2/ARE pathway and is neuroprotective in a transgenic mouse model of tauopathy, *Hum. Mol. Genet.*, **27**, 2874-2892, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy201>.
101. Pan, X., Gong, N., Zhao, J., Yu, Z., Gu, F., Chen, J., Sun, X., Zhao, L., Yu, M., Xu, Z., Dong, W., Qin, Y., Fei, G., Zhong, C., and Xu, T. L. (2010) Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice, *Brain*, **133**, 1342-1351, <https://doi.org/10.1093/brain/awq069>.
102. Sambon, M., Gorlova, A., Demelenne, A., Alhama-Riba, J., Coumans, B., Lakaye, B., Wins, P., Fillet, M., Anthony, D. C., Strekalova, T., and Bettendorff, L. (2020) Dibenzoylthiamine has powerful antioxidant and anti-inflammatory properties in cultured cells and in mouse models of stress and neurodegeneration, *Biomedicines*, **8**, 361, <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090361>.
103. Markova, N., Bazhenova, N., Anthony, D. C., Vignisse, J., Svistunov, A., Lesch, K. P., Bettendorff, L., and Strekalova, T. (2017) Thiamine and benfotiamine improve cognition and ameliorate GSK-3beta-associated stress-induced behaviours in mice, *Progr. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **75**, 148-156, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.11.001>.
104. Zhang, Q., Yang, G., Li, W., Fan, Z., Sun, A., Luo, J., and Ke, Z. J. (2011) Thiamine deficiency increases beta-secretase activity and accumulation of beta-amyloid peptides, *Neurobiol. Aging*, **32**, 42-53, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.01.005>.
105. Ihara, H., Matsumoto, T., Shino, Y., and Hashizume, N. (2005) Assay values for thiamine or thiamine phosphate esters in whole blood do not depend on the anticoagulant used, *J. Clin. Lab. Anal.*, **19**, 205-208, <https://doi.org/10.1002/jcla.20079>.
106. Stuetz, W., Carrara, V. I., McGready, R., Lee, S. J., Biesalski, H. K., and Nosten, F. H. (2012) Thiamine diphosphate in whole blood, thiamine and thiamine monophosphate in breast-milk in a refugee population, *PLoS One*, **7**, e36280, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036280>.
107. Gangolf, M., Czerniecki, J., Radermecker, M., Detry, O., Nisolle, M., Jouan, C., Martin, D., Chantraine, F., Lakaye, B., Wins, P., Grisar, T., and Bettendorff, L. (2010) Thiamine status in humans and content of phosphorylated thiamine derivatives in biopsies and cultured cells, *PLoS One*, **5**, e13616, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013616>.
108. Lee, B. L., Ong, H. Y., and Ong, C. N. (1991) Determination of thiamine and its phosphate esters by gradient-elution high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **567**, 71-80, [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80311-y](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80311-y).
109. Gropper, S. A. S., Smith, J. L., and Carr, T. P. (2018) *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, 7th Edn., Cengage Learning, Boston, MA.
110. Van Hameren, G., Campbell, G., Deck, M., Berthelot, J., Gautier, B., Quintana, P., Chrast, R., and Tricaud, N. (2019) *In vivo* real-time dynamics of ATP and ROS production in axonal mitochondria show decoupling in mouse models of peripheral neuropathies, *Acta Neuropathol. Commun.*, **7**, 86, <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0740-4>.
111. Cassereau, J., Chevrollier, A., Codron, P., Goizet, C., Gueguen, N., Verny, C., Reynier, P., Bonneau, D., Lenaers, G., and Procaccio, V. (2020) Oxidative stress contributes differentially to the pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2K, *Exp. Neurol.*, **323**, 113069, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113069>.

112. Espinos, C., Galindo, M. I., Garcia-Gimeno, M. A., Ibanez-Cabellos, J. S., Martinez-Rubio, D., Millan, J. M., Rodrigo, R., Sanz, P., Seco-Cervera, M., Sevilla, T., Tapia, A., and Pallardo, F. V. (2020) Oxidative stress, a crossroad between rare diseases and neurodegeneration, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 313, <https://doi.org/10.3390/antiox9040313>.
113. Lin, M. T., and Beal, M. F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature*, **443**, 787-795, <https://doi.org/10.1038/nature05292>.
114. Ramdharry, G. M., Pollard, A. J., Grant, R., Dewar, E. L., Laura, M., Moore, S. A., Hallsworth, K., Ploetz, T., Trenell, M. I., and Reilly, M. M. (2017) A study of physical activity comparing people with Charcot–Marie–Tooth disease to normal control subjects, *Disabil. Rehabil.*, **39**, 1753-1758, <https://doi.org/10.1080/09638288.2016.1211180>.
115. Ramdharry, G. M., Thornhill, A., Mein, G., Reilly, M. M., and Marsden, J. F. (2012) Exploring the experience of fatigue in people with Charcot–Marie–Tooth disease, *Neuromusc. Disord.*, **22**, S208-S213, <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.10.016>.
116. Menotti, F., Felici, F., Damiani, A., Mangiola, F., Vannicelli, R., and Macaluso, A. (2011) Charcot-Marie-Tooth 1A patients with low level of impairment have a higher energy cost of walking than healthy individuals, *Neuromusc. Disord.*, **21**, 52-57, <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.09.008>.
117. Mkrtchyan, G., Graf, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2016) Cellular thiamine status is coupled to function of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase, *Neurochem. Int.*, **101**, 66-75, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.10.009>.
118. Wolf, C., Pouya, A., Bitar, S., Pfeiffer, A., Bueno, D., Rojas-Charry, L., Arndt, S., Gomez-Zepeda, D., Tenzer, S., Bello, F. D., Vianello, C., Ritz, S., Schwirz, J., Dobrindt, K., Peitz, M., Hanschmann, E. M., Mencke, P., Boussaad, I., Silies, M., Brüstle, O., Giacomello, M., Krüger, R., and Methner, A. (2022) GDAP1 loss of function inhibits the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex by altering the actin cytoskeleton, *Commun. Biol.*, **5**, 541, <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03487-6>.
119. Boots, L. R., Cornwell, P. E., Donahue, M. A., and Bradley, E. L., Jr. (1983) Vitamin fluctuations in the blood of female baboons in relation to normal menstrual cycles, treatments with Lo-Ovral or Depo-Provera and a selected vitamin supplement, *Am. J. Clin. Nutr.*, **37**, 518-531, <https://doi.org/10.1093/ajcn/37.4.518>.
120. Nes, M., Sem, S. W., Rousseau, B., Bjorneboe, G. E., Engedal, K., Trygg, K., and Pedersen, J. I. (1988) Dietary intakes and nutritional status of old people with dementia living at home in Oslo, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **42**, 581-593.
121. Heap, L. C., Peters, T. J., and Wessely, S. (1999) Vitamin B status in patients with chronic fatigue syndrome, *J. R. Soc. Med.*, **92**, 183-185, <https://doi.org/10.1177/014107689909200405>.
122. Shaw, N. S., Wang, J. L., Pan, W. H., Liao, P. C., and Yang, F. L. (2007) Thiamin and riboflavin status of Taiwanese elementary schoolchildren, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, **16 Suppl 2**, 564-571.
123. Yang, F. L., Liao, P. C., Chen, Y. Y., Wang, J. L., and Shaw, N. S. (2005) Prevalence of thiamin and riboflavin deficiency among the elderly in Taiwan, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, **14**, 238-243.
124. Malara, M., Hubner-Wozniak, E., and Lewandowska, I. (2013) Assessment of intake and nutritional status of vitamin b1, b2, and b6 in men and women with different physical activity levels, *Biol. Sport*, **30**, 117-123, <https://doi.org/10.5604/20831862.1044430>.
125. Price, J., Clague, A. E., Kerr, R. A., and Nixon, P. F. (1991) In thiamine deficiency, activation of erythrocyte transketolase by thiamine *in vivo* exceeds activation by cofactor *in vitro*, *Clin. Chim. Acta*, **202**, 39-45, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90253-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90253-9).
126. Taylor, A. J., Talwar, D., Lee, S. J., Cox, L., Mayxay, M., and Newton, P. N. (2020) Comparison of thiamin diphosphate high-performance liquid chromatography and erythrocyte transketolase assays for evaluating thiamin status in malaria patients without beriberi, *Am. J. Trop. Med. Hygiene*, **103**, 2600-2604, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0479>.
127. Herve, C., Beyne, P., Letteron, P., and Delacoux, E. (1995) Comparison of erythrocyte transketolase activity with thiamine and thiamine phosphate ester levels in chronic alcoholic patients, *Clin. Chim. Acta*, **234**, 91-100, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)05980-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(94)05980-7).
128. Warnock, L. G., Prudhomme, C. R., and Wagner, C. (1978) The determination of thiamin pyrophosphate in blood and other tissues, and its correlation with erythrocyte transketolase activity, *J. Nutr.*, **108**, 421-427, <https://doi.org/10.1093/jn/108.3.421>.
129. Takeuchi, T., Jung, E. H., Nishino, K., and Itokawa, Y. (1990) The relationship between the thiamin pyrophosphate effect and the saturation status of the transketolase with its coenzyme in human erythrocytes, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **60**, 112-120.
130. Switala, K. J., Robinson, N., Sances, A., Jr., Larson, S., Evans, S. M., and Pintar, K. (1977) Serum enzymes in peroneal muscular atrophy (Charcot–Marie–Tooth disease), *Wis. Med. J.*, **76**, S4-S6.
131. Kaczmarek, M. J., and Nixon, P. F. (1983) Variants of transketolase from human erythrocytes, *Clin. Chim. Acta*, **130**, 349-356, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(83\)90309-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(83)90309-1).
132. Blass, J. P., and Gibson, G. E. (1977) Abnormality of a thiamine-requiring enzyme in patients with Wernicke–Korsakoff syndrome, *New Eng. J. Med.*, **297**, 1367-1370, <https://doi.org/10.1056/NEJM197712222972503>.

133. Martin, P. R., McCool, B. A., and Singleton, C. K. (1995) Molecular genetics of transketolase in the pathogenesis of the Wernicke–Korsakoff syndrome, *Metab. Brain Dis.*, **10**, 45-55, <https://doi.org/10.1007/BF01991782>.
134. Saha, A., Connelly, S., Jiang, J., Zhuang, S., Amador, D. T., Phan, T., Pilz, R. B., and Boss, G. R. (2014) Akt phosphorylation and regulation of transketolase is a nodal point for amino acid control of purine synthesis, *Mol. Cell*, **55**, 264-276, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.028>.
135. Wang, H. L., Chen, Y., Wang, Y. Q., Tao, E. W., Tan, J., Liu, Q. Q., Li, C. M., Tong, X. M., Gao, Q. Y., Hong, J., Chen, Y. X., and Fang, J. Y. (2022) Sirtuin5 protects colorectal cancer from DNA damage by keeping nucleotide availability, *Nat. Commun.*, **13**, 6121, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33903-8>.
136. Coles, C. A., Woodman, K. G., Gibbs, E. M., Crosbie, R. H., White, J. D., and Lamande, S. R. (2024) Benfotiamine improves dystrophic pathology and exercise capacity in mdx mice by reducing inflammation and fibrosis, *Hum. Mol. Genet.*, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddae066>.
137. Bunik, V. I., Aleshin, V. A., Zhou, X., Tabakov, V. Y., and Karlsson, A. (2020) Activation of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase by cocarboxylase in human lung adenocarcinoma cells A549 Is p53/p21-dependent and impairs cellular redox state, mimicking the cisplatin action, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3759, <https://doi.org/10.3390/ijms21113759>.
138. Contestabile, R., di Salvo, M. L., Bunik, V., Tramonti, A., and Verni, F. (2020) The multifaceted role of vitamin B(6) in cancer: *Drosophila* as a model system to investigate DNA damage, *Open Biol.*, **10**, 200034, <https://doi.org/10.1098/rsob.200034>.
139. Quarta, G., and Schlick, T. (2024) Riboswitch distribution in the human gut microbiome reveals common metabolite pathways, *J. Phys. Chem. B*, **128**, 4336-4343, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.4c00267>.
140. Christianto, A., Baba, T., Takahashi, F., Inui, K., Inoue, M., Suyama, M., Ono, Y., Ohkawa, Y., and Morohashi, K. I. (2021) Sex differences in metabolic pathways are regulated by Pfkfb3 and Pdk4 expression in rodent muscle, *Commun. Biol.*, **4**, 1264, <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02790-y>.
141. Vijay, V., Han, T., Moland, C. L., Kwekel, J. C., Fuscoe, J. C., and Desai, V. G. (2015) Sexual dimorphism in the expression of mitochondria-related genes in rat heart at different ages, *PLoS One*, **10**, e0117047, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117047>.
142. Martel, J. L., Kerndt, C. C., Doshi, H., and Franklin, D. S. (2023) *Vitamin B1 (Thiamine)*. in *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), pp. 1-13.
143. Institute of Medicine (U.S.). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes., Institute of Medicine (U.S.). Panel on Folate Other B Vitamins and Choline., and Institute of Medicine (U.S.). Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients. (1998) *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline*, National Academy Press, Washington, D.C.
144. Bunik, V. I., Tylicki, A., and Lukashev, N. V. (2013) Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models, *FEBS J.*, **280**, 6412-6442, <https://doi.org/10.1111/febs.12512>.

PHARMACOLOGICAL DOSES OF THIAMINE BENEFIT PATIENTS WITH CHARCOT–MARIE–TOOTH NEUROPATHY, CHANGING THE THIAMINE DIPHOSPHATE LEVELS AND DEPENDENT ENZYME REGULATION

**A. V. Artiukhov^{1,2}, O. N. Solovjeva¹, N. V. Balashova^{3,4}, O. P. Sidorova⁵,
A. V. Graf^{1,6}, and V. I. Bunik^{1,2,7*}**

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

² *Department of Biochemistry, Sechenov University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Faculty of Advanced Medicine, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, 129110 Moscow, Russia*

⁴ *Faculty of Continuing Medical Education, RUDN Medical Institute, 117198 Moscow, Russia*

⁵ *Department of Neurology, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, 129110 Moscow, Russia*

⁶ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

⁷ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

Charcot–Marie–Tooth (CMT) neuropathy is a polygenic disorder of peripheral nerves with no effective cure. Thiamine (vitamin B1) is a neurotropic compound improving neuropathies. Our pilot study characterizes therapeutic potential of daily oral administration of thiamine (100 mg) in CMT neuropathy and its molecular mechanisms. The patient hand grip strength is determined before and after the thiamine administration along with the blood levels of the thiamine coenzyme form (thiamine diphosphate, ThDP), activities of endogenous (without ThDP in the assay medium) holo-transketolase and total (with ThDP in the assay medium) transketolase, and the transketolase activation by ThDP [1-(holo-transketolase/total transketolase),%], corresponding to the fraction of the ThDP-free apo-transketolase. Single cases of administration of sulbutiamine (200 mg) or benfotiamine (150 mg) reveal their effects on the assayed parameters within those of thiamine. Administration of thiamine or its pharmacological forms increases the hand grip strength in the CMT patients. Comparison of the thiamin status in patients with varied forms of CMT disease to that of the control subjects without diagnosed pathologies has not found significant differences in the average levels of ThDP, holo-transketolase or transketolase distribution between the holo and apo forms. However, the transketolase regulation by thiamine/ThDP differs in the control and CMT groups. In the assay medium, ThDP does not activate transketolase of CMT patients, while the activation is statistically significant in the control group. Thiamine supplementation *in vivo* paradoxically decreases endogenous holo-transketolase in CMT patients, the effect not observed in the control group. Correlation analysis reveals sex-specific differences in relationships between the parameters of thiamine status in the control subjects and patients with CMT disease. Thus, our findings link physiological benefits of thiamine supplementation in CMT patients to the changes in their thiamine status, characterized by the blood levels of ThDP and transketolase regulation.

Keywords: Charcot–Marie–Tooth disease, hand grip strength, thiamine, transketolase, sex-specific differences in metabolism, sulbutiamine, benfotiamine

ПРИМЕНЕНИЕ qPCR ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ УДАЛЕНИЯ ОБЪЕМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ЭКСТРАКТАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ С РАЗЛИЧНОЙ МАКСИМАЛЬНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ЖИЗНИ

© 2024 А.А. Попов¹, В.А. Шаманин², И.О. Петрусева¹,
А.Н. Евдокимов¹, О.И. Лаврик^{1,3*}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

² ООО «БиоЛинк», 630090 Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 01.03.2024

После доработки 18.04.2024

Принята к публикации 28.04.2024

Белки системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) ответственны за обнаружение и удаление из ДНК широкого спектра объемных повреждений, благодаря чему вносят заметный вклад в поддержание стабильности генома в клетках млекопитающих. Диагностика функционального статуса NER в клетках имеет важное значение для выявления патологических изменений в организме и оценки эффективности применения химиотерапевтических препаратов. В работе представлено описание способа оценки эффективности удаления объемных повреждений ДНК *in vitro*, основанного на использовании qPCR. С помощью разработанного метода проведена сравнительная оценка активности NER на экстрактах клеток двух млекопитающих с различной продолжительностью жизни – долгоживущего голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) и короткоживущей мыши (*Mus musculus*). Было показано, что белки экстракта клеток *H. glaber* в 1,5 раза более эффективно удаляют объемное повреждение из модельного ДНК-субстрата, чем белки экстракта клеток *M. musculus*, что согласуется с экспериментальными данными, полученными ранее. Представленная разработка может найти применение не только в фундаментальных исследованиях репарации ДНК в клетках млекопитающих, но и в клинической практике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: репарация ДНК, PCR, долголетие.

DOI: 10.31857/S0320972524070026 EDN: WNPEPB

ВВЕДЕНИЕ

Системы репарации ДНК обеспечивают поддержание стабильности генома в клетках живых организмов, удаляя постоянно возникающие в результате воздействий экзогенных и эндогенных факторов повреждения для восстановления структуры ДНК [1]. Белки эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) удаляют из ДНК широкий спектр объемных повреждений, в том числе аддукты, формирующиеся под действием УФ-света и вредных полицикли-

ческих соединений из окружающей среды. Такие аддукты вызывают значительные нарушения регулярной двуцепочечной структуры ДНК, которые распознаются фактором ХРС, инициирующим привлечение ТFIIN и последующую сборку репарационного комплекса на поврежденном участке ДНК. После верификации повреждения хеликазой XPD происходит катализируемая эндонуклеазами XPF-ERCC1 и XPG эксцизия фрагмента ДНК, содержащего объемное повреждение. Образующаяся брешь застраивается в результате репаративного синтеза с использованием в качестве матрицы

Принятые сокращения: ОДН – последовательность олигонуклеотидов; BER – эксцизионная репарация оснований; NER – эксцизионная репарация нуклеотидов; nFlu – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил) гекса-ноил]-3-амино-1,2-пропандиол; TEG – тетраэтиленгликоль.

* Адресат для корреспонденции.

неповрежденной цепи ДНК и последующего лигирования; в результате исходная структура ДНК восстанавливается [1].

Поскольку активность систем репарации ДНК определяет устойчивость клеток к воздействию генотоксического стресса, оценка функционального статуса той или иной системы репарации ДНК в клетках имеет важное значение в клинике и проводится с целью диагностики различных патологических состояний. Нарушение работы NER является причиной развития таких заболеваний, как пигментная ксеродерма и синдром Коккейна, а снижение активности NER, как предполагается, может увеличивать предрасположенность к развитию раковых заболеваний и преждевременному старению [2–4]. При этом повышенная активность NER, характерная для раковых клеток, может снижать эффективность применения химиотерапевтических препаратов, действие которых основано на образовании объемных аддуктов в ДНК [5–7].

В большинстве работ по изучению NER оценивали специфическую эксцизионную активность белков прямой детекцией продуктов эксцизии модельных ДНК либо путем постэксцизионного радиоактивного мечения 3'-концов этих продуктов [8–11]. Существенным недостатком этих методов, ограничивающим их применение в клинике, является необходимость использования радиоактивной метки при создании модельной ДНК, либо детекции продуктов эксцизии. В связи с этим особую значимость для определения активности NER *in vitro* приобретают методы, основанные на количественной ПЦР (quantitative polymerase chain reaction, qPCR). Возможность оценки эффективности протекания репарации путем измерения флуоресценции в сочетании с простой и быстрой процедурой выполнения делает методы, основанные на qPCR, перспективными инструментами для применения не только в исследовательских целях, но и в медицине. К настоящему моменту описаны два варианта методики измерения активности NER, включающие использование qPCR, которые различаются по степени сложности процедуры, архитектуре модельных ДНК и типу удаляемых объемных повреждений (УФ-повреждения и ДНК-белковая сшивка) [12, 13].

Целью настоящей работы стала разработка метода оценки эффективности удаления объемных повреждений *in vitro* с использованием qPCR и одного из эффективно узнаваемых (и процессируемых) белками NER повреждений – аналога полициклических объемных повреждений [8, 10, 14]. Разработанный подход был применен для сравнительной оценки эффективности работы системы NER в клетках млекопитающих с различной продолжительностью жизни – долгоживущего голого

землекопа (*Heterocephalus glaber*) и короткоживущей мыши (*Mus musculus*). Полученные результаты показывают, что белки клеток *H. glaber* более эффективно удаляют объемные повреждения ДНК, это согласуется с ранее опубликованными данными, полученными методом постэксцизионного мечения [14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ДНК-субстратов. Последовательности олигонуклеотидов (ОДН), использованных для синтеза ДНК-субстратов, представлены в таблице 1.

Для получения цепи ДНК, содержащей ненуклеотидную модификацию N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол (nFlu), смешивали ОДН-1, ОДН-2-nFlu, ОДН-3, ОДН-4 и ОДН-5 в эквимольном соотношении, после чего инкубировали при температуре 95 °С в течение 5 мин и медленно охлаждали до комнатной температуры. Реакционную смесь для проведения лигирования, которая содержала смесь гибридизованных ОДН (10 мкМ), Т4 ДНК-лигазу (2 ед./мкл; «СибЭнзим», Россия), АТФ (10 мМ) и 1× буфер для Т4 ДНК-лигазы (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5); 10 мМ MgCl₂; 10 мМ ДТТ; 1 мМ АТФ), инкубировали в течение 16–18 ч при температуре 12 °С. Инактивацию реакции проводили в течение 20 мин при температуре 70 °С. Продукты реакции лигирования разделяли в 10%-ном ПААГ в денатурирующих условиях, а целевую одноцепочечную (оц.) ДНК выделяли из геля электропереносом на DEAE-бумагу («Whatman», Великобритания). Элюцию целевой оц. ДНК с DEAE-бумаги проводили при 70 °С четырьмя порциями (30 мкл) 3 М водного раствора LiClO₄, после чего ДНК осаждали 5-кратным избытком холодного ацетона и инкубировали 30–40 мин при –20 °С. После центрифугирования (10 мин, 12 000 g, 4 °С) супернатант удаляли, а осадок промывали холодным ацетоном. Затем осадок высушивали при комнатной температуре и растворяли в H₂O.

Аналогичные процедуры выполняли при синтезе немодифицированной цепи (использовали ОДН-1, ОДН-2, ОДН-3, ОДН-4 и ОДН-5) и комплементарной цепи ДНК, содержащей модификацию на основе тетраэтиленгликоля (TEG) (использовали ОДН-6, ОДН-7, ОДН-8, ОДН-9 и ОДН-10). Концентрацию полученных оц. ДНК определяли путем измерения поглощения раствора при длине волны 260 нм на спектрофотометре U-0080D («Hitachi High-Technologies», Япония).

Для формирования модельных ДНК-дуплексов nFlu- и TEG-содержащие цепи (nFlu/TEG-ДНК), а также немодифицированную и TEG-содержащую

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов и праймеров, использованных в работе

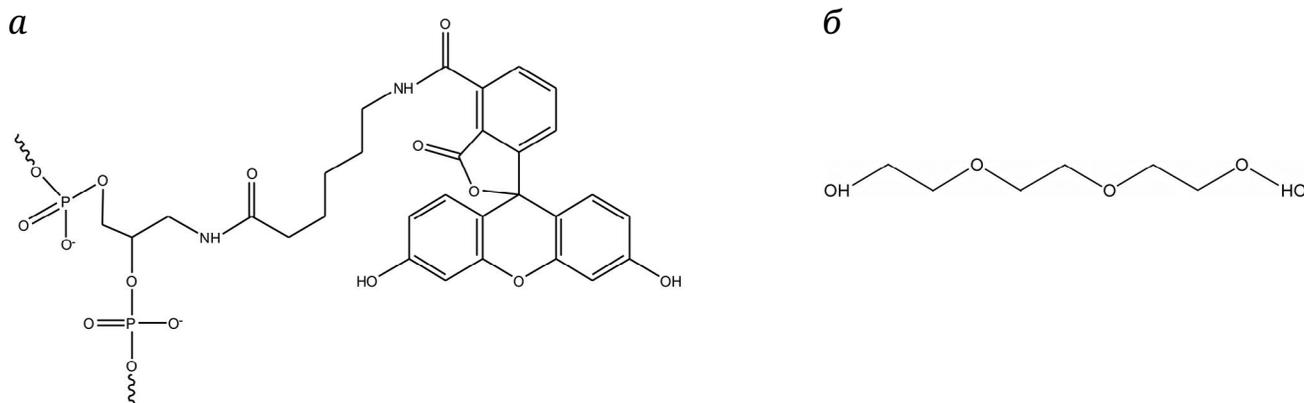
Наименование	Последовательность
Олигонуклеотиды	
ОДН-1	cgatgaagctgggtgcaactggctcctcatgaagcgggtccaagtcggcagtagccggcataacc
ОДН-2-nFlu	aagcctatgcctacagcatccaggg(nFlu)gacgggtccgaggatgacgatgagcgca
ОДН-2	aagcctatgcctacagcatccagggcgacgggtccgaggatgacgatgagcgca
ОДН-3	ttgttagatttcatacacgggtgatgctacaagtctctggcg
ОДН-4	gtaggcataggttggttatgccggtactg
ОДН-5	gtatgaaatctaacaatgcgctcatcgtcctcctcg
ОДН-6	cgccacgaactgtagcatcacctgtgatgaaatctaaca
ОДН-7	tgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcctggatgctgtaggcataggctt
ОДН-8	ggttatgccggtactgccgacttgaccgcttcatggaggacc(PS-TEG)gttgaccaccagcttcatcg
ОДН-9	gacgatgagcgcattgttagatttcatacacgg
ОДН-10	taccggcataaccaagcctatgcctaca
ОДН-11	agctgctgctcatctcgagatctgagtacattggattgccattctccgagtgattaccgtgacg
Праймеры	
Праймер 1	cgccacgaactgtagcatc
Праймер 2	cgatgaagctgggtgca

Примечание. ОДН – последовательность олигонуклеотидов. Выделение полужирным шрифтом: **nFlu** – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил) гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; **PS-TEG** – тетраэтиленгликоль с введенной с 5'-стороны фосфотиоатной группой.

цепи (nm/TEG-ДНК) смешивали в эквимольном соотношении, после чего инкубировали при температуре 95 °С в течение 5 мин и медленно охлаждали до комнатной температуры. Химические структуры nFlu и TEG представлены на рис. 1.

Культивирование клеток. Фибробласты кожи голого землекопа (NSF8) культивировали в среде αMEM, содержащей эмбриональную сыворотку

теленка (15% v/v; «Thermo Fisher Scientific», США), 10% AmnioMAX II Complete Medium («Thermo Fisher Scientific»), основной фактор роста фибробластов (bFGF; 5 нг/мл; «ПанЭко», Россия), пеницилин (0,1 ед./мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и амфотерицин Б (2,5 мкг/мл), при температуре 32 °С в атмосфере 5% CO₂. Эмбриональные фибробласты мыши культивировали в среде αMEM, содержащей

**Рис. 1.** Химические структуры nFlu (а) и TEG (б)

эмбриональную сыворотку теленка (15% v/v;), пеницилин (0,1 ед./мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и амфотерицин Б (2,5 мкг/мл), при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Все клеточные линии были предоставлены ИМКБ СО РАН («Коллекция культур клеток общепромышленного назначения»; № 0310-2016-0002).

Получение NER-компетентных клеточных экстрактов. Работу проводили по протоколу, представленному в работе Reardon и Sancar [15]. Клетки ресуспендировали в четырех PCV (packed cell volume – объем биомассы клеток, предварительно собранных центрифугированием в течение 10 мин при 1000 g) гипотонического буфера для лизиса (10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM ЭДТА; 5 mM ДТТ) и выдерживали в течение 20 мин во льду, после чего разрушали с помощью стеклянного гомогенизатора Поттера с использованием плотно притертой пары (20 движений пестика). Полученный гомогенат, помещенный в стеклянный стаканчик на ледяной бане, растворяли в 4 PCV сахарозно-глицеринового буфера (50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM MgCl₂; 2 mM ДТТ; 25% (m/v) сахарозы; 50% (v/v) глицерина), после чего к нему добавляли 1 PCV насыщенного нейтрального раствора (NH₄)₂SO₄ (pH 7,0) в течение 30 мин.

После ультрацентрифугирования (3 ч, 100 000 g, 4 °С) супернатант собирали, после чего к нему добавляли сухой измельченный (NH₄)₂SO₄ (из расчета 0,33 г/мл) и 1 M NaOH для поддержания нейтрального pH, и перемешивали в течение 30 мин. Осадок собирали центрифугированием (45 мин, 12 000 g, 4 °С), после чего растворяли в равном объеме буфера для NER-компетентных экстрактов (25 mM Hepes (pH 7,9); 100 mM KCl; 12 mM MgCl₂; 0,5 mM ЭДТА; 2 mM ДТТ; 12% (v/v) глицерина). Полученный раствор диализовали против 500 мл того же буфера в течение 2 ч, после чего диализный буфер заменяли на свежеприготовленный и диализ вели еще 14–16 ч. Осадок денатурированного белка удаляли центрифугированием (10 мин, 13 400 g, 4 °С). Полученный клеточный экстракт в виде аликвот замораживали в жидком азоте и хранили при –70 °С.

Определение концентрации белка в клеточных экстрактах. Концентрацию белка в препаратах экстракта определяли по методу Бредфорда с использованием набора Quick Start™ Bradford protein assay («Bio-Rad Laboratories», США), следуя приложенной инструкции. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали БСА.

Проведение реакции NER. Реакционную смесь для проведения реакции NER (30 мкл), которая содержала 16 нМ ДНК-субстрата, 0,4 мкг/мкл NER-компетентного экстракта клеток, 0,5 mM смесь дез-

оксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), 0,066 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы и 0,5 мкМ олигонуклеотид (ОДН-11) для защиты от нуклеаз, специфичных к оц. участкам ДНК (таблица), в буфере (25 mM Tris-HCl (pH 7,8); 45 mM NaCl; 4,4 mM MgCl₂; 0,1 mM ЭДТА; 4 mM АТР), инкубировали при 30 °С в течение 30 мин. Реакцию останавливали прогревом реакционной смеси при 65 °С в течение 20 мин. Аликвоту инактивированной после инкубации с белками экстракта реакционной смеси (1 мкл) разбавляли в H₂O (до концентрации ДНК, равной 1 × 10⁻¹² M), после чего использовали для анализа с помощью PCR в режиме реального времени.

qPCR-анализ. Реакционная смесь (25 мкл) для проведения PCR содержала 1 мкл разбавленной инактивированной реакционной смеси для проведения реакции NER и следующие компоненты (указаны финальные концентрации): 0,3 мкМ праймеров 1 и 2 (табл. 1); 0,06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы с «горячим стартом»; 0,25 mM смесь dNTP; 0,5× краситель SYBR Green I («Lumiprobe», Россия); 1× PCR-буфер (75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 2 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20; 3 mM MgCl₂). Реакцию проводили в 96-луночных планшетах (белый, низкопрофильный пластик; «BIOplastics BV», Нидерланды) на амплификаторе LightCycler 96 («Roche», Швейцария) при заданной программе PCR: 95 °С – 5 мин, 1 цикл; 95 °С – 15 с, 58 °С – 15 с, 72 °С – 10 с (считывание сигнала), 35 циклов; плавление продуктов PCR; охлаждение до 37 °С.

Полученные в ходе анализа кривых амплификации значения порогового цикла C(t) были использованы для расчета разницы dC(t) по формуле (1):

$$dC(t) = C(t)^{nFlu/TEG-ДНК} - C(t)^x, \quad (1)$$

где C(t)^x – значение C(t) для анализируемой пробы; C(t)^{nFlu/TEG-ДНК} – значение C(t) для nFlu/TEG-ДНК в контрольном образце, который не подвергался воздействию белков клеточного экстракта.

Статистическую значимость определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, где * *p* < 0,05; ** *p* < 0,01; *** *p* < 0,001.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы разработали основанный на использовании qPCR метод оценки эффективности удаления объемных повреждений *in vitro*, который включает использование в качестве субстрата протяженного (160 п.н.) линейного ДНК-дуплекса, содержащего по одному модифицированному звену в каждой из цепей, и NER-компетентных клеточных экстрактов (рис. 2).

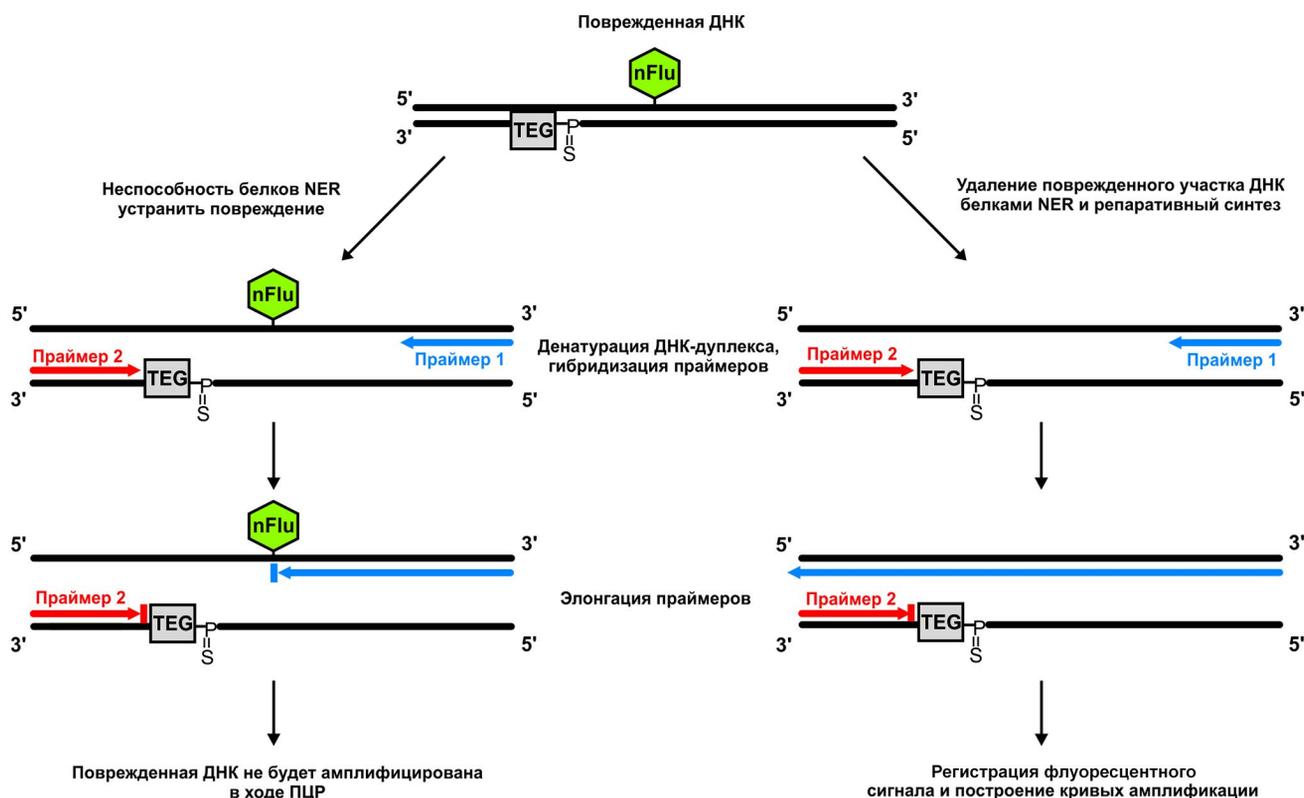


Рис. 2. Схематическое изображение предлагаемого подхода для оценки эффективности удаления объемных повреждений *in vitro* с помощью qPCR

Объемная модификация nFlu хорошо распознается и удаляется из ДНК белками системы NER [8, 10, 14]. Необъемная модификация на основе TEG представляет собой аналог апуринов/апириимидинового сайта и, предположительно, может подвергаться воздействию белков системы эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER), однако введенная с 5'-стороны от TEG фосфотиоатная группа, устойчивая к воздействию нуклеаз [16], блокирует процессинг TEG эндогенной AP-эндонуклеазой экстрактов. Присутствие этих модификаций в цепях ДНК-субстрата препятствует элонгации праймеров 1 и 2, катализируемой Taq ДНК-полимеразой в ходе PCR (рис. 2). Удаление белками системы NER фрагмента ДНК, содержащего nFlu, должно приводить к восстановлению структуры одной из цепей ДНК, в результате чего данная цепь может быть копирована при элонгации праймера 1. Образованная при этом копия ДНК, не несущая модификаций, становится полноценной матрицей, которая беспрепятственно будет амплифицироваться в последующих циклах PCR.

В процессе разработки метода нами были сконструированы и использованы два типа модельных ДНК. nFlu/TEG-ДНК содержит обе модификации и является субстратом для системы NER (рис. 2). Взаимное расположение nFlu и TEG

в модельной ДНК таково, что присутствие TEG не влияет на способность nFlu подвергаться реакции специфической эксцизии, катализируемой белками NER [11]. nm/TEG-ДНК, содержащая только TEG, имитирует продукт репарации цепи ДНК-субстрата, содержащей объемное повреждение (рис. 2).

С использованием синтезированных матриц и SYBR Green I в качестве флуоресцентного красителя была проведена PCR для оценки условий амплификации. Эффективность PCR рассчитывали на основе данных калибровочного графика, для построения которого была использована nm/TEG-ДНК в интервале концентраций от 4×10^{-11} до 4×10^{-15} М (рис. 3, а–в).

Для оценки амплификации модельных nFlu/TEG-ДНК и nm/TEG-ДНК мы выбрали концентрацию ДНК, равную 4×10^{-12} М. Результаты проведенной сравнительной оценки амплификации nFlu/TEG-ДНК и nm/TEG-ДНК подтвердили возможность использования ДНК-субстрата, сконструированного нами (рис. 3, г). Значение порогового цикла $C(t)$ для nm/TEG- и nFlu/TEG-ДНК составило $12,12 \pm 0,29$ и $19,28 \pm 0,52$ цикла соответственно (рис. 3, д); разница в значениях порогового цикла между nFlu/TEG- и nm/TEG-ДНК ($dC(t)$) составила $7,17 \pm 0,43$ цикла. Таким образом, субстрат и продукт реакции специфической эксцизии различимы в ходе проведения PCR.

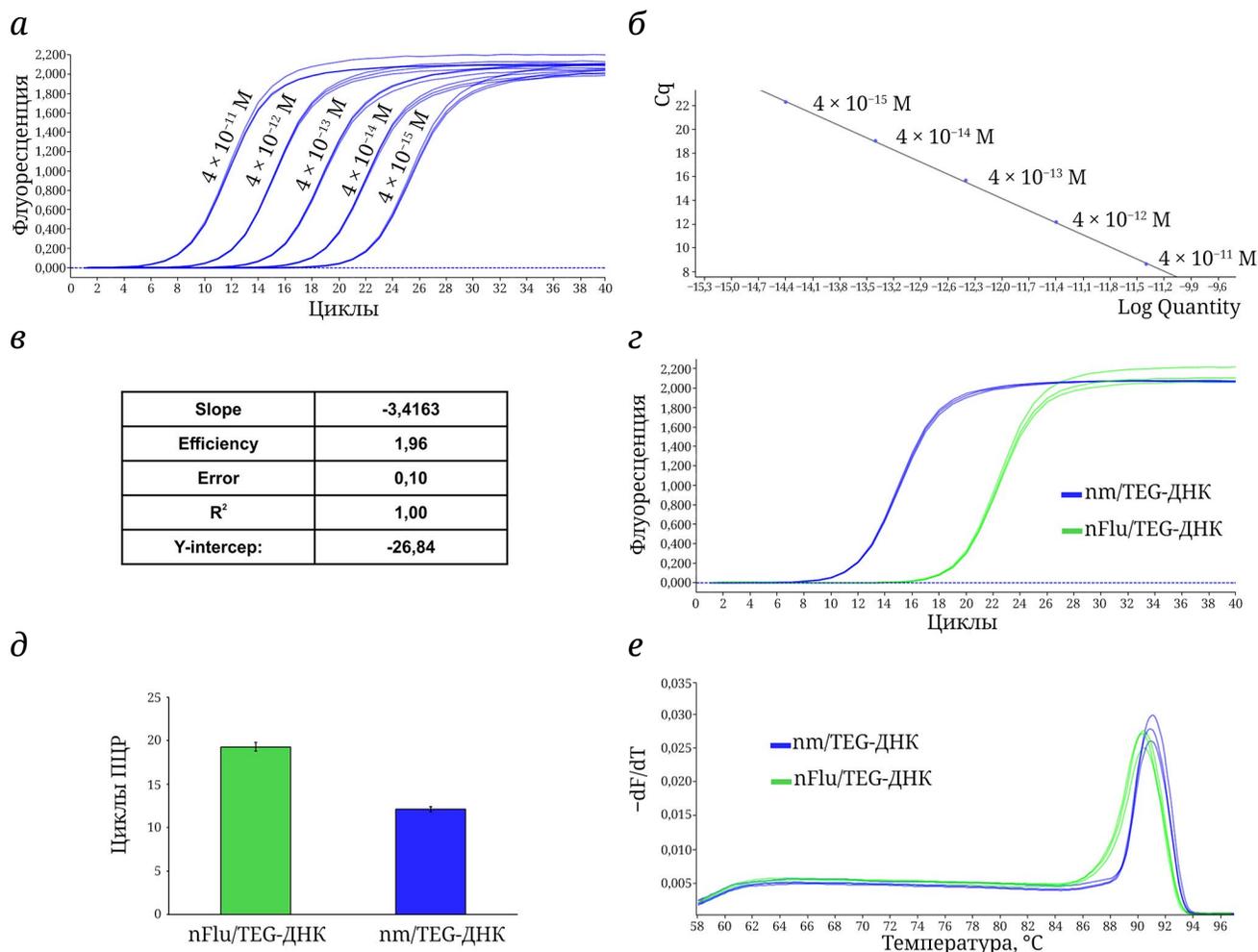


Рис. 3. Анализ результатов амплификации nFlu/TEG- и nm/TEG-ДНК. Представлены кривые амплификации стандартных образцов nm/TEG-ДНК (а), калибровочный график (б) и результаты расчета эффективности амплификации nm/TEG-ДНК (в). г – Пример кривых амплификации nm/TEG- и nFlu/TEG-ДНК; д – средние значения C_t и стандартное отклонение для nm/TEG- и nFlu/TEG-ДНК, полученные по результатам трех измерений; е – кривые плавления продуктов амплификации nm/TEG- и nFlu/TEG-ДНК

Одной из возможных причин амплификации nFlu/TEG-ДНК может быть присутствие в препарате синтетической примеси ДНК, содержащей цепь без модификации (nm/TEG-ДНК). Тем не менее при анализе кривых плавления продуктов амплификации nFlu/TEG-ДНК и nm/TEG-ДНК мы наблюдали расхождение пиков кривых плавления PCR-продуктов и, как следствие, выявили незначительное различие в их температурах плавления (T_m) – $90,37 \pm 0,11$ °C для nFlu/TEG-ДНК и $90,99 \pm 0,03$ °C для nm/TEG-ДНК соответственно (рис. 3, е). На основе этих данных мы предполагаем, что образуемые продукты амплификации nFlu/TEG-ДНК и nm/TEG-ДНК несколько отличаются по своей нуклеотидной последовательности, что может быть обусловлено склонностью Taq ДНК-полимеразы к транслезионному синтезу, в результате которого на этапе элонгации праймера фермент с невысокой вероятностью может включать в цепь случайный нуклеотид (предпо-

читательно дезоксиаденозин) напротив объемной модификации ДНК [17–20].

Используя сконструированный субстрат nFlu/TEG-ДНК, мы провели оценку эффективности удаления объемных повреждений ДНК *in vitro* белками клеток долгоживущего голого землекопа (*H. glaber*) и короткоживущей мыши (*M. musculus*) с помощью qPCR. К настоящему времени известно, что клетки *H. glaber* демонстрируют высокую устойчивость к генотоксическим воздействиям, онкотрансформации и клеточному старению, что во многом обеспечивается эффективным функционированием клеточных систем поддержания стабильности генома [21–24]. Сравнительная оценка эксцизионной активности NER в клетках *H. glaber* и *M. musculus* ранее проводилась с применением метода постэксцизионного мечения продуктов специфической эксцизии [14]. Результаты контрольных экспериментов, проведенных в данном исследовании, показали,

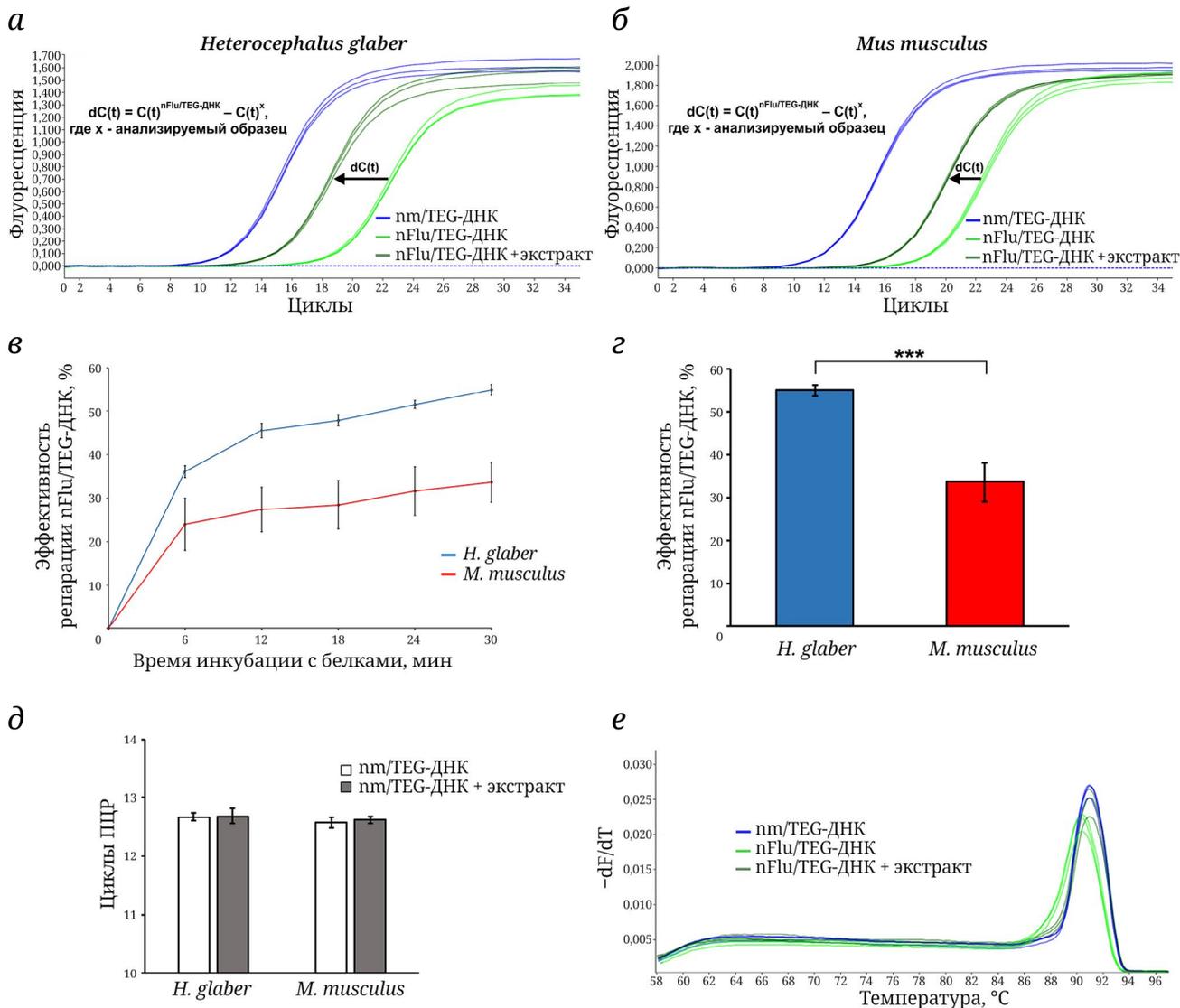


Рис. 4. Сравнительная оценка эффективности репарации nFlu/TEG-ДНК белками экстракта клеток *Heterocephalus glaber* и *Mus musculus* с помощью qPCR. Кривые амплификации nm/TEG-ДНК (фиолетовый цвет), nFlu/TEG-ДНК (зеленый цвет) и nFlu/TEG-ДНК после 30 мин инкубации с белками экстракта (темно-зеленый цвет), полученные для *H. glaber* (а) и *M. musculus* (б); в – сравнение эффективности репарации nFlu/TEG-ДНК белками NER экстракта клеток *H. glaber* (синий цвет) и *M. musculus* (красный цвет) в зависимости от времени инкубации; г – диаграмма, демонстрирующая различия в эффективности репарации nFlu/TEG-ДНК белками экстракта *H. glaber* (синий цвет) и *M. musculus* (красный цвет) после 30 мин инкубации; д – оценка воздействия белков экстрактов клеток *H. glaber* и *M. musculus* на nm/TEG-ДНК, не содержащей объемного повреждения, после 30 мин инкубации; е – пример кривых плавления продуктов амплификации nm/TEG-ДНК (фиолетовый цвет), nFlu/TEG-ДНК (зеленый цвет) и nFlu/TEG-ДНК после 30 мин инкубации с белками NER (темно-зеленый цвет) экстракта клеток *M. musculus*. Представлены результаты трех биологических повторов со стандартным отклонением, *** $p < 0,001$

что эффективность эксцизии поврежденного фрагмента ДНК, содержащего nFlu, из модельного ДНК-дууплекса (137 п.н.) белками экстракта клеток *H. glaber* была в 1,5–2 раза выше по сравнению с *M. musculus* [14]. Мы решили сопоставить результаты, полученные с помощью разработанного метода, с данными, ранее полученными нами в работе Evdokimov et al. [14], для чего в качестве модельных систем были использованы аналогичные препараты экстрактов клеток *H. glaber* и

M. musculus. Чтобы адаптировать протокол проведения реакции NER к последующей детекции методом qPCR, мы внесли в него некоторые изменения.

Для проведения PCR критически важен не только этап специфической эксцизии объемного повреждения, но и этап восстановления нативной структуры цепи (рис. 2). Используемые в качестве модельных систем для определения активности NER *in vitro* NER-компетентные клеточные

экстракты, полученные из клеток или тканей различных типов, могут различаться по содержанию необходимых для застраивания одноцепочечной «бреши» компонентов, что может существенно повлиять на результаты, полученные при оценке эксцизионной активности NER с использованием клеточных экстрактов. Чтобы нивелировать эти эффекты, мы добавляли в реакционную смесь для проведения NER Taq ДНК-полимеразу и смесь dNTP.

С использованием разработанного протокола была проведена сравнительная оценка зависимости эффективности репарации nFlu/TEG-ДНК от времени инкубации с белками экстракта клеток *H. glaber* и *M. musculus* (рис. 4, а и б).

Расчет эффективности репарации nFlu/TEG-ДНК осуществляли на основе полученных средних значений $dC(t)$, переведенных в проценты. При расчетах за 100% было принято значение разницы в $C(t)$ для nFlu/TEG- и nm/TEG-ДНК, полученное в базовых контрольных экспериментах, проведенных без выдерживания модельных ДНК с белками экстракта. Эффективность репарации nFlu/TEG-ДНК была более высокой на всем временном промежутке инкубации с белками экстракта клеток *H. glaber* (рис. 4, в) и после 30 мин составила $55,67 \pm 0,42\%$, в то время как после инкубации с белками экстракта клеток *M. musculus* эффективность репарации была значительно ниже и составила $35,17 \pm 1,42\%$ соответственно (рис. 4, г). Инкубация nm/TEG-ДНК с белками экстрактов в течение 30 мин не приводила к заметному изменению в значениях $C(t)$, что говорит об отсутствии значимого влияния неспецифического воздействия белков экстрактов в обоих случаях. Белки экстракта клеток *H. glaber* практически в 1,5 раза более эффективно удаляли объемное повреждение nFlu из модельного ДНК-субстрата, чем белки экстракта клеток *M. musculus*. Полученные данные согласуются с результатами контрольных экспериментов, выполненных нами ранее с использованием аналогичных препаратов клеточных экстрактов методом постэксцизионного мечения продуктов эксцизии [14]. Сходство значений T_m и положения пиков кривых плавления продуктов амплификации, которые мы наблюдали для nFlu/TEG-ДНК, процессированной белками экстракта, и контрольной nm/TEG-ДНК ($90,98 \pm 0,04$ °C и $91,00 \pm 0,06$ °C соответственно), дополнительно подтверждает факт удаления объемного повреждения из ДНК и восстановление её корректной нуклеотидной последовательности в процессе репарации (рис. 4, г).

Несмотря на то что использованные для проверки разработанного метода фибробласты кожи долгоживущего *H. glaber* и эмбриональные фибробласты короткоживущей *M. musculus* различаются

по своей природе, что может несколько снижать наблюдаемую разницу между эффективностью удаления объемных повреждений белками экстрактов этих млекопитающих, сравнительная оценка, проведенная методом постэксцизионного мечения и с использованием qPCR, свидетельствует о том, что удаление объемных повреждений системой NER действительно осуществляется более эффективно в клетках *H. glaber*. Это согласуется с современными представлениями о значительном вкладе систем репарации ДНК в обеспечении высокой стабильности генома *H. glaber*, обитающего в условиях постоянного окислительного стресса [25–27]. Не исключено, что в эффективном удалении объемных повреждений в клетках *H. glaber* могут играть важную роль и другие системы репарации ДНК, такие как BER, высокая активность которой также была отмечена в клетках *H. glaber* [14, 27]. Возможность участия белков BER и не только этой системы в репарации УФ-повреждений недавно была продемонстрирована в экспериментах на клетках человека, дефицитных по ХРА – одного из основных белковых факторов, вовлеченных в процесс NER [28, 29]. Таким образом, разработанный метод открывает перспективы для дальнейшего использования в исследованиях, направленных не только на изучение репарации ДНК в клетках долгоживущих млекопитающих, но и на поиск функциональной взаимосвязи различных систем репарации ДНК, участвующих в удалении объемных повреждений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный нами способ позволил оценить эффективность удаления объемных повреждений ДНК *in vitro* с использованием экстрактов клеток долгоживущего *H. glaber* и короткоживущей *M. musculus*. Белки экстракта клеток *H. glaber* обеспечивали более эффективное распознавание и удаление объемного повреждения nFlu из модельного ДНК-субстрата по сравнению с белками экстракта клеток *M. musculus*, что согласуется с ранее опубликованными данными [14]. Таким образом, простая и быстрая процедура выполнения разработанного способа, основанного на использовании qPCR-анализа, может способствовать его дальнейшему широкому применению как в фундаментальных исследованиях процесса репарации ДНК, так и для оперативной оценки репаративного статуса пациентов, применяемой в клинической практике.

Вклад авторов. А.А. Попов, В.А. Шаманин, И.О. Петрусева – проведение экспериментов; А.А. Попов, И.О. Петрусева, А.Н. Евдокимов,

О.И. Лаврик – написание и редактирование текста статьи; И.О. Петрусева, О.И. Лаврик – руководство работой.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10056-П).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chatterjee, N., and Walker, G. C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis, *Environ. Mol. Mutagen.*, **58**, 235-263, <https://doi.org/10.1002/em.22087>.
- Krasikova, Y., Rechkunova, N., and Lavrik, O. (2021) Nucleotide excision repair: from molecular defects to neurological abnormalities, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6220, <https://doi.org/10.3390/ijms22126220>.
- Paccosi, E., Balajee, A. S., and Proietti-De-Santis, L. (2022) A matter of delicate balance: loss and gain of Cockayne syndrome proteins in premature aging and cancer, *Front. Aging*, **3**, 960662, <https://doi.org/10.3389/fragi.2022.960662>.
- Yurchenko, A. A., Rajabi, F., Braz-Petta, T., Fassihi, H., Lehmann, A., Nishigori, C., Wang, J., Padioleau, I., Gunbin, K., Panunzi, L., Morice-Picard, F., Laplante, P., Robert, C., Kannouche, P. L., Menck, C. F. M., Sarasin, A., and Nikolaev, S. I. (2023) Genomic mutation landscape of skin cancers from DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients, *Nat. Commun.*, **14**, 2561, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38311-0>.
- Kap, E. J., Popanda, O., and Chang-Claude, J. (2016) Nucleotide excision repair and response and survival to chemotherapy in colorectal cancer patients, *Pharmacogenomics*, **17**, 755-794, <https://doi.org/10.2217/pgs-2015-0017>.
- Bowden, N. A. (2014) Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? *Cancer Lett.*, **346**, 163-171, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.005>.
- Kiwierska, K., and Szyfter, K. (2019) DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy—a double-edged sword, *J. Appl. Genet.*, **60**, 329-334, <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00516-9>.
- Evdokimov, A., Petruseva, I., Tsidulko, A., Koroleva, L., Serpokrylova, I., Silnikov, V., and Lavrik, O. (2013) New synthetic substrates of mammalian nucleotide excision repair system, *Nucleic Acids Res.*, **41**, e123, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt301>.
- Liu, Z., Ding, S., Kropachev, K., Lei, J., Amin, S., Broyde, S., and Geacintov, N. E. (2015) Resistance to nucleotide excision repair of bulky guanine adducts opposite abasic sites in DNA duplexes and relationships between structure and function, *PLoS One*, **10**, e0142068, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137124>.
- Lukyanchikova, N. V., Petruseva, I. O., Evdokimov, A. N., Silnikov, V. N., and Lavrik, O. I. (2016) DNA with damage in both strands as affinity probes and nucleotide excision repair substrates, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 263-274, <https://doi.org/10.1134/S0006297916030093>.
- Naumenko, N., Petruseva, I., Lomzov, A., and Lavrik, O. (2021) Recognition and removal of clustered DNA lesions via nucleotide excision repair, *DNA Repair (Amst)*, **108**, 103225, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103225>.
- Chesner, L. N., and Campbell, C. (2018) A quantitative PCR-based assay reveals that nucleotide excision repair plays a predominant role in the removal of DNA-protein crosslinks from plasmids transfected into mammalian cells, *DNA Repair (Amst)*, **62**, 18-27, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.01.004>.
- Shen, J. C., Fox, E. J., Ahn, E. H., and Loeb, L. A. (2014) A rapid assay for measuring nucleotide excision repair by oligonucleotide retrieval, *Sci. Rep.*, **4**, 1-10, <https://doi.org/10.1038/srep04894>.
- Evdokimov, A., Kutuzov, M., Petruseva, I., Lukjanchikova, N., Kashina, E., Kolova, E., Zemerova, T., Romanenko, S., Perelman, P., Prokopov, D., Seluanov, A., Gorbunova, V., Graphodatsky, A., Trifonov, V., Khodyreva, S., and Lavrik, O. (2018) Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells, *Aging (Albany NY)*, **10**, 1454-1473, <https://doi.org/10.18632/aging.101482>.
- Reardon, J. T., and Sancar, A. (2006) Purification and characterization of *Escherichia coli* and human nucleotide excision repair enzyme systems, *Methods Enzymol.*, **408**, 189-213, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)08012-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)08012-8).
- Clavé, G., Reverte, M., Vasseur, J. J., and Smietana, M. (2020) Modified internucleoside linkages for nuclease-resistant oligonucleotides, *RSC Chem. Biol.*, **2**, 94-150, <https://doi.org/10.1039/d0cb00136h>.
- Smith, C. A., Baeten, J., and Taylor, J. S. (1998) The ability of a variety of polymerases to synthesize past site-specific cis-syn, trans-syn-II, (6-4), and Dewar photoproducts of thymidylyl-(3'→5')-thymidine, *J. Biol. Chem.*, **273**, 34, 21933-21940, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21933>.
- Taylor, J. S. (2002) New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions, *Mutat. Res.*, **510**, 55-70, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00252-x](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00252-x).

19. Khare, V., and Eckert, K. A. (2002) The proofreading 3'→5' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis, *Mutat. Res.*, **510**, 45-54, [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(02\)00251-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00251-8).
20. Obeid, S., Schnur, A., Gloeckner, C., Blatter, N., Welte, W., Diederichs, K., and Marx, A. (2011) Learning from directed evolution: *Thermus aquaticus* DNA polymerase mutants with translesion synthesis activity, *Chembiochem.*, **12**, 1574-1580, <https://doi.org/10.1002/cbic.201000783>.
21. Evdokimov, A., Popov, A., Ryabchikova, E., Koval, O., Romanenko, S., Trifonov, V., Petruseva, I., Lavrik, I., and Lavrik, O. (2021) Uncovering molecular mechanisms of regulated cell death in the naked mole rat, *Aging (Albany NY)*, **13**, 3239-3253, <https://doi.org/10.18632/aging.202577>.
22. Yamamura, Y., Kawamura, Y., Oka, K., and Miura, K. (2022) Carcinogenesis resistance in the longest-lived rodent, the naked mole-rat, *Cancer Sci.*, **113**, 4030-4036, <https://doi.org/10.1111/cas.15570>.
23. Boughey, H., Jurga, M., and El-Khamisy, S. F. (2021) DNA homeostasis and senescence: lessons from the naked mole rat, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11, 6011, <https://doi.org/10.3390/ijms22116011>.
24. Hadj-Moussa, H., Eaton, L., Cheng, H., Pamenter, M. E., and Storey, K. B. (2022) Naked mole-rats resist the accumulation of hypoxia-induced oxidative damage, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **273**, 111282, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.111282>.
25. Buffenstein R. (2005) The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **60**, 1369-1377, <https://doi.org/10.1093/gerona/60.11.1369>.
26. Gorbunova, V., Seluanov, A., Zhang, Z., Gladyshev, V. N., and Vijg, J. (2014) Comparative genetics of longevity and cancer: insights from long-lived rodents, *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 531-540, <https://doi.org/10.1038/nrg3728>.
27. MacRae, S. L., Croken, M. M., Calder, R. B., Aliper, A., Milholland, B., White, R. R., Zhavoronkov, A., Gladyshev, V. N., Seluanov, A., Gorbunova, V., Zhang, Z. D., and Vijg, J. (2015) DNA repair in species with extreme lifespan differences, *Aging (Albany NY)*, **7**, 1171-1184, <https://doi.org/10.18632/aging.100866>.
28. Gautam, A., Fawcett, H., Burdova, K., Brazina, J., and Caldecott, K. W. (2023) APE1-dependent base excision repair of DNA photodimers in human cells, *Mol. Cell*, **83**, 3669-3678.e7, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.09.013>.
29. Saha, L. K., Wakasugi, M., Akter, S., Prasad, R., Wilson, S. H., Shimizu, N., Sasanuma, H., Huang, S. N., Agama, K., Pommier, Y., Matsunaga, T., Hirota, K., Iwai, S., Nakazawa, Y., Ogi, T., and Takeda, S. (2020) Topoisomerase I-driven repair of UV-induced damage in NER-deficient cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 14412-14420, <https://doi.org/10.1073/pnas.1920165117>.

THE USE OF qPCR TO EVALUATE THE EFFICIENCY OF BULKY DNA DAMAGE REMOVAL IN EXTRACTS OF MAMMALIAN CELLS WITH DIFFERENT MAXIMUM LIFESPAN

A. A. Popov¹, V. A. Shamanin², I. O. Petruseva¹, A. N. Evdokimov¹, and O. I. Lavrik^{1,3*}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

² LLC "BioLink", 630090 Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk National Research State University, 630090 Novosibirsk, Russia

Proteins of the nucleotide excision repair (NER) system are responsible for the detection and removal of a wide range of bulky damages from DNA, thereby making a significant contribution to maintaining genome stability in mammalian cells. Diagnosis of the functional status of NER in cells is important for detecting pathological changes in the body and evaluating the efficiency of the use of chemotherapeutic drugs. The paper describes a method for evaluating the efficiency of *in vitro* removal of bulky DNA damage based on the use of qPCR. Using the developed method, a comparative assessment of NER activity on cell extracts of two mammals with different lifespans – a long-lived naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) and a short-lived mouse (*Mus musculus*) was carried out. It has been shown that the proteins of the *H. glaber* cell extract are 1.5 times more effective at removing bulky damage from the model DNA substrate than the proteins of the *M. musculus* cell extract, which is consistent with the experimental data obtained earlier. The presented development can be used not only in fundamental research of DNA repair in mammalian cells, but also in clinical practice.

Keywords: DNA repair, PCR, longevity

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ И УГЛЕВОДОВ У АРКТИЧЕСКИХ НАРОДОВ

Обзор

© 2024 Б.А. Малярчук

Институт биологических проблем Севера
Дальневосточного отделения Российской академии наук,
685000 Магадан, Россия; электронная почта: malyarchuk@ibpn.ru

Поступила в редакцию 27.03.2024

После доработки 16.05.2024

Принята к публикации 11.06.2024

Длительная, на протяжении нескольких тысячелетий, адаптация предков коренных народов Крайнего Севера Азии и Америки к экстремальным природно-климатическим условиям Арктики привела к изменениям генов, контролирующим различные метаболические процессы. Однако основная часть генетической вариативности у эскимосов и палеоазиатов (чукчей и коряков) связана с адаптацией к традиционной «арктической» диете, богатой липидами и белками, но крайне скудной в отношении растительных углеводов. Результаты популяционно-генетических исследований показали, что у эскимосов и палеоазиатских народов распространены специфические варианты полиморфизма в генах, связанных с метаболизмом липидов (гены *CPT1A*, *FADS1*, *FADS2* и *CYB5R2*) и углеводов (гены *AMY1*, *AMY2A* и *SI*). При отходе от традиционной диеты эти варианты полиморфизма приводят к метаболическим нарушениям. Специфические для американских эскимосов варианты полиморфизма в генах, связанных с метаболизмом глюкозы (гены *TBC1D* и *ADCY*), значительно повышают риск развития диабета 2-го типа. Все эти обстоятельства указывают на необходимость проведения широкомасштабного генетического тестирования коренного населения Крайнего Севера и изучения биохимических и физиологических последствий генетически детерминированных изменений активности ферментов метаболизма липидов и углеводов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: адаптация человека, Арктика, гены липидного обмена, гены углеводного обмена.

DOI: 10.31857/S0320972524070032 EDN: WNMRSY

ВВЕДЕНИЕ

Современные люди, *Homo sapiens*, довольно быстро в эволюционном масштабе – менее чем за 70 тыс. лет – заселили практически всю планету, проделав огромный путь из Африки на все остальные континенты и адаптируясь при этом к жаре, холоду, различной высоте проживания и множеству встреченных на пути болезнетворных микроорганизмов. По всей видимости, основной причиной, предоставившей преимущества нашим предкам перед более ранними архаичными популяциями людей, включая неандертальцев и денисовцев, стал быстрый рост численности и высокий уровень генетической гетерогенности популяций сапиенсов. Об этом свидетельствуют

результаты палеогеномных исследований, проведенных за последние 15 лет [1]. Полученные данные продемонстрировали широкие способности генома адаптироваться к специфическим условиям природной среды или климата, с которыми сталкивалось человечество [2]. А накопление разнообразных генетических вариантов в крупных популяциях, в том числе благодаря эпизодам смешения с неандертальцами и денисовцами на ранних этапах эволюции *H. sapiens*, способствовало повышению устойчивости этих групп к климатическим или экологическим воздействиям, а также открывало путь к дальнейшей экспансии популяций людей [1, 3].

Следствием одного из наиболее жестких природных экспериментов стало появление культур

Принятые сокращения: ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

арктических морских охотников [4–7]. Помимо испытания экстремальными условиями Крайнего Севера, им пришлось адаптироваться к весьма скудным пищевым ресурсам, предоставляемым Арктикой. Традиционная диета морских зверобоев основывалась на потреблении главным образом мяса и жира морских млекопитающих (тюленей, моржей и китов) и рыбы, богатых полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК). При этом аборигены Крайнего Севера испытывали большой дефицит растительных углеводов. С течением времени, однако, в генофонде предков морских охотников произошли изменения, связанные с адаптацией к крайне неблагоприятным условиям природной среды Арктики. Между тем археологи предполагают, что арктическая зона была освоена охотниками и рыбаками, уже адаптированными к употреблению морской пищи [5]. Считается, что морские адаптации, проявляющиеся в специфике образа жизни и экономики групп людей, возникли примерно 9 тыс. лет назад в климатически умеренной и высокопродуктивной северо-восточной части Тихого океана, и только примерно 5 тыс. лет назад (и наиболее интенсивно примерно 3,5 тыс. лет назад) они распространились на севере – на побережье и островах Охотского, Берингова и Чукотского морей [5, 7].

АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ В АРКТИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Одним из первых обнаруженных генетических вариантов, свидетельствующих об адаптации предков морских охотников к условиям Арктики, является «арктическая» мутация в гене *CPT1A*, кодирующем печёночную изоформу карнитин-пальмитоилтрансферазы типа 1А, которая катализирует перенос ацильной группы с молекулы ацил-СоА на молекулу карнитина [8, 9]. Ацилкарнитины затем переносятся через внутреннюю мембрану митохондрий для осуществления β -окисления. Появление «арктической» мутации обусловлено нуклеотидной заменой G → A в локусе rs80356779 (аминокислотная замена Pro479Leu) гена *CPT1A* [8]. С наибольшими частотами (50–70%) этот вариант полиморфизма распространён в популяциях эскимосов, чукчей, коряков и других народов Охотоморского региона, хозяйственный уклад которых связан с морским зверобойным промыслом [10, 11]. С низкими частотами (1–10%) вариант rs80356779-А был выявлен у эвенков Якутии, долган и нганасан Таймыра, нивхов и нанайцев, что может объясняться миграциями морских охотников на протяжении последних 3 тыс. лет [12–14] (рисунок).

Палеогеномные исследования, проведённые в широком диапазоне времени (от палеолита до средневековья), показали, что «арктическая» мутация в гене *CPT1A* появилась у палеоэскимосов археологической культуры Саккак (Гренландия) примерно 4 тыс. лет назад и немного позже у представителей токаревской культуры (Северное Приохотье, примерно 3 тыс. лет назад), и у древних жителей поселения Эквен (Чукотка, примерно 2 тыс. лет назад) [4, 15]. В то же время вариант rs80356779-А был зарегистрирован и на юге Приохотья – у носителей культуры позднего дзёмона (Хоккайдо, 3,5–3,8 тыс. лет назад), которые также активно охотились на морских животных [16]. Предпринятый с помощью филогенетического анализа поиск предковых гаплотипов показал, что вариант rs80356779-А появился на основе гаплотипа, несущего замену rs3794020-Т в гене *CPT1A* [10]. Этот предковый вариант полиморфизма наблюдается в основном в популяциях Восточной Азии – у японцев (30%), корейцев (31%), вьетнамцев (37%). Таким образом, «арктическая» мутация возникла на основе восточноазиатского по происхождению гаплотипа, но достигла высоких частот только в самых северных популяциях, что связано, по всей видимости, с преимуществами, которые она давала своим носителям.

Предполагается, что поддержанию высокой частоты варианта rs80356779-А гена *CPT1A* в популяциях эскимосов на протяжении многих поколений способствовал естественный отбор, связанный, скорее всего, с адаптацией как к традиционной «арктической» диете, богатой омега-3 ПНЖК, так и к холоду (таблица 1) [9, 10, 17, 18]. Исследования ферментативной активности карнитин-пальмитоилтрансферазы 1А, проведённые *in vitro* в культивируемых фибробластах, показали, что аминокислотная замена P479L приводит к снижению каталитической активности фермента, что вполне оправданно в условиях избытка омега-3 ПНЖК [8, 9]. Предполагается, что носители мутации P479L в большей степени защищены от чрезмерно высоких уровней окисления жирных кислот и кетогенеза в условиях хронической «кетогенной диеты» [9, 10]. Между тем более широкий анализ результатов биохимических, метаболических и физиологических исследований показал, что отбор варианта 479Leu у предков эскимосов мог быть связан с большим числом метаболических адаптаций [18]. В первую очередь это относится к возможности экономии глюкозы в условиях низкоуглеводной диеты и её перенаправлению на синтез гликогена в печени. Кроме этого, вполне вероятно, что из-за замены Pro479Leu увеличивается производство ацилкарнитинов, которые играют важную роль в метаболизме бурой жировой ткани [19], и тем самым снижается потре-

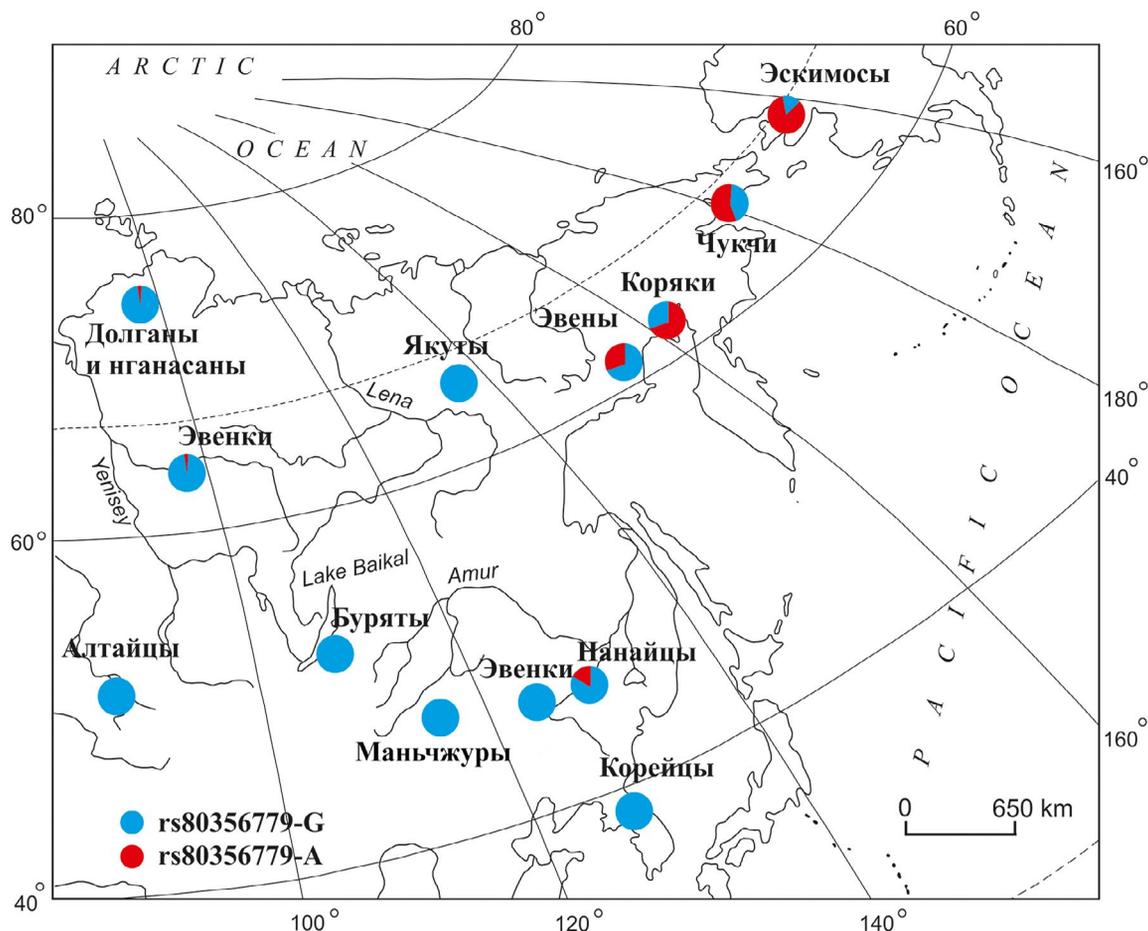


Рис. 1. Распространённость вариантов полиморфизма локуса rs80356779 гена *CPT1A* в популяциях Восточной Сибири и Аляски. Данные приводятся по работам Малярчук и соавт., Smolnikova et al. и Li et al. [11–13]

Таблица 1. Гипотезы о селективном преимуществе «арктической» мутации в гене *CPT1A* (вариант rs80356779-A)

Гипотеза	Значимые факторы	Литературный источник
Защита от избыточного образования кетонов	высокое потребление ПНЖК, низкое потребление углеводов	[9, 10]
Снижение метаболических эффектов высокобелковой диеты	низкое потребление углеводов и высокое потребление белка	[9]
Адаптация к холоду из-за изменений метаболизма бурой жировой ткани	холод, высокое потребление ПНЖК	[10]
Экономия глюкозы в условиях низкоуглеводной диеты	низкое потребление углеводов, высокое потребление белка, холод	[18]

ние глюкозы бурой жировой тканью. Отмечалось также, что эскимосы-носители замены Pro479Leu характеризуются меньшим ростом, что способствует снижению теплопотерь и имеет адаптивное значение в условиях холода [20]. Всё это, по всей видимости, свидетельствует о том, что формирование арктических народов сопровождалось сопряжёнными процессами адаптации к диете и экстремальным факторам среды. Такая стратегия

позволила выработать оптимальные механизмы терморегуляции и липидного обмена в суровых условиях Арктики и Субарктики.

С медико-генетической точки зрения вариант 479Leu приводит к врождённому дефициту карнитин-пальмитоилтрансферазы типа 1A – аутосомно-рецессивному заболеванию, которое сопряжено у детей-эскимосов с высоким риском младенческой смертности, гипокетонной гипогликемией,

более тяжёлым протеканием инфекционных заболеваний респираторного тракта и предрасполагает к ожирению и диабету 2-го типа [9, 21, 22]. Последнее особенно актуально при переходе аборигенов Арктики на «европейскую» высокоуглеводную диету [21]. Вместе с тем имеются сведения о том, что «арктический» вариант гена *CPT1A* может обладать и протективным эффектом в отношении сердечно-сосудистых заболеваний, так как у эскимосов Гренландии и Аляски носительство варианта 479Leu ассоциируется с более высокими уровнями холестерина высокой плотности и апо-липопротеина A1 [23, 24].

О перестройках в функционировании генов метаболизма жирных кислот свидетельствуют результаты исследований и других генов арктических народов. Так, у канадских эскимосов обнаружен повышенный мутационный груз в генах карнитин-ацилтрансфераз, что, по мнению авторов исследования, связано с генетической адаптацией к диете и холодному климату [25]. Аналогично несинонимичные замены, приводящие к карнитин-ацилтрансферазному дефициту (дополнительно к rs80356779 гена *CPT1A*), были выявлены у эскимосов, чукчей и коряков Северо-Восточной Сибири в локусах rs763273578 гена *CPT1C*, кодирующего мозговую изоформу карнитин-пальмитоилтрансферазы, и rs1588456303 гена *CRAT*, кодирующего карнитин-ацетилтрансферазу [26]. У указанных северных народов также были обнаружены несинонимичные замены (с высокими индексами патогенности) в генах, ответственных за расщепление триглицеридов – гене *ABHD6*, кодирующем моноацилглицерол-липазу, и гене *GK2*, кодирующем глицеролкиназу 2 [26].

В исследовании эскимосов Аляски впервые была выявлена ассоциация вариантов полиморфизма в генах *CPT1A*, *FADS1* и *FADS2* с более высоким уровнем дельта-5-десатураз жирных кислот в плазме и эритроцитах [27]. Генетические исследования показали, что в популяциях человека распространены два основных гаплотипа, определяемых вариантами полиморфизма в генах *FADS1* и *FADS2*, кодирующих десатуразы жирных кислот, которые катализируют образование двойных связей в ацильных цепях [28]. Эти гаплотипы значительно различаются по уровню экспрессии и кодируют ферменты с пониженной (гаплотип А) и повышенной (гаплотип D) десатуразной активностью. Популяционно-генетические исследования продемонстрировали, что гаплотип А чаще всего встречается среди коренного населения Сибири и Арктики и у американских индейцев [29, 30]. Согласно палеогеномным данным, распространение менее активного в плане десатурации жирных кислот гаплотипа А началось ещё со времён заселения Евразии и Америки верхнепалеолити-

ческими людьми, потреблявшими пищу, богатую липидами и белками [31]. Увеличение частоты более активного гаплотипа D в некоторых регионах мира (Европе, Южной Азии) предположительно связано с появлением и распространением в неолитическое время технологий сельского хозяйства, что потребовало с большей скоростью синтезировать ПНЖК из липидов растений [32]. Установлено, что частота гаплотипа D в Европе увеличилась от менее 10% 10 тыс. лет тому назад до 60–75% в настоящее время [29] и продолжает расти на 0,009% в год по результатам анализа данных UK Biobank [33]. Предположительно, рост частоты гаплотипа D у европейцев объясняется репродуктивным успехом, связанным с увеличением коэффициента рождаемости у носителей этого гаплотипа.

Высокая распространённость менее активно гаплотипа А *FADS*-генов в арктических популяциях (почти до фиксации, как у гренландских эскимосов – 98%), очевидно, также обусловлена избытком липидов животного происхождения в пище аборигенов; в связи с этим отпадает необходимость дополнительного синтеза ПНЖК [34]. У коряков Северо-Восточной Сибири обнаружена низкая частота (5,6%) 22 п.н.-инсерции в гене *FADS2* (локус rs66698963), благодаря которой повышается уровень экспрессии гена *FADS1* [35]. Для сравнения на юго-востоке Сибири у бурят частота этой инсерции почти на порядок выше (45,3%) [35]. Аналогично существенные различия между коренным населением северо-востока (12,5%) и юга (1,5%) Сибири выявлены и по варианту rs115724324-G гена *FFAR4*, кодирующего рецептор длинноцепочечных жирных кислот [36]. Этот рецептор играет ключевую роль в связывании жирных кислот и контроле энергетического баланса [37]. Кроме этого, у коряков и эскимосов (с частотой ~10%) выявлен уникальный вариант полиморфизма в локусе rs159088662 гена *CYB5R2*, кодирующего NADH-цитохром b5 редуктазу [35]. Стоп-кодон в этом локусе терминирует синтез фермента, который обеспечивает передачу электронов к десатуразам, кодируемым *FADS*-генами. Терминация синтеза NADH-цитохром b5 редуктазы, очевидно, способна привести к недостатку этого фермента и, как следствие, к ещё большему снижению активности десатураз жирных кислот у коренного населения Крайнего Севера.

АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ В АРКТИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ

Особенности «арктической» диеты не только повлияли на метаболизм липидов, но и суще-

ственно преобразили аллельный спектр ферментов углеводного обмена у северных аборигенов, что связано с дефицитом растительных углеводов в условиях Арктики. Например, в генотипах эскимосов, чукчей и коряков обнаружена максимальная среди других изученных народов мира частота делеции целого гена панкреатической амилазы *AMY2A* (52%), которая необходима для расщепления крахмала, а также минимальное число копий этого гена в сочетании с пониженной копийностью гена амилазы слюны *AMY1* [38]. У 30% северных аборигенов ген панкреатической амилазы *AMY2A* вообще отсутствует, что приводит к панкреатической недостаточности [38].

Следствием долговременной адаптации к дефициту дисахаридов можно объяснить появление и высокую распространённость среди коренного населения Арктики делеции динуклеотида AG в локусе rs781470490 гена сахаразы-изомальтазы (ген *SI*). С наибольшими частотами аллель rs781470490-delAG зарегистрирован у эскимосов Гренландии и Канады (17–20%) [39, 40] и несколько реже в популяциях Чукотки и Северного Приохотья – у чукчей (14,3%), коряков (7,3%) и эвенов (3,5%) [41]. Анализ популяционно-генетических данных, включая результаты палеогеномных исследований, показал, что этот вариант полиморфизма гена *SI*, вероятнее всего, появился у предков эскимосов примерно 1,2–2,0 тыс. лет назад благодаря специфике образа жизни и питания, а его распространение связано с экспансией неоэскимосской культуры Туле [42].

Динуклеотидная делеция в локусе rs781470490 гена *SI* приводит к сдвигу рамки считывания кодона 92 (вариант Gly92Leufs*8), что является причиной преждевременной терминации синтеза сахаразы-изомальтазы [39]. В результате у фермента отсутствуют две каталитические субъединицы (сахаразная и изомальтазная), а у носителей такого генетического варианта развивается аутосомно-рецессивное заболевание – врождённая недостаточность сахаразы-изомальтазы (CSID) [43]. Установлено, что у гомозигот по варианту rs781470490-delAG кодируемый фермент становится функционально неактивным, а у гетерозигот, частота которых высока в арктических популяциях, ферментативная активность в отношении гидролиза сахарозы понижается на 65% и более [44]. Предполагается, что негативное влияние на ферментативную функцию оказывает укороченный мутантный вариант, который тем не менее является транспортно-компетентным, локализуется на поверхности клетки и активно взаимодействует с сахарозой-изомальтазой дикого типа. Таким образом, у гетерозиготных носителей варианта rs781470490-delAG также могут наблюдаться симптомы CSID [44].

Тем не менее исследования эскимосов Гренландии показали, что взрослые гомозиготные носители варианта rs781470490-delAG имеют заметно более здоровый метаболический профиль, чем контрольная группа: они характеризуются более низкими значениями индекса массы тела, содержания жировой ткани, уровня триглицеридов в сыворотке крови натошак и остаточного холестерина [40, 45]. Исследования гомозиготных носителей-эскимосов показали, что эти эффекты обусловлены не столько снижением потребления сахарозы, сколько повышением уровня циркулирующего ацетата в плазме крови. Полученные результаты были подтверждены экспериментами на мышцах с нокаутированным геном *SI*, которые в ответ на приём сахарозы демонстрировали значительно более высокий уровень ацетата и сниженный уровень глюкозы в крови. Предполагается, что такой благоприятный метаболический эффект связан с усилением бактериальной ферментации непереваренных углеводов, избежавших расщепления в тонком кишечнике из-за потери ферментативной активности сахаразы-изомальтазы [40]. В свою очередь, усиление бактериальной ферментации углеводов может привести и к более высокому уровню циркулирующего ацетата у гомозигот по варианту rs781470490-delAG [40, 45]. Как известно, ацетат, как и пропионат, бутират и другие короткоцепочечные жирные кислоты, являются важнейшими метаболитами микробиоты кишечника, обеспечивающими противовоспалительное, иммунорегуляторное, противодиабетическое, гепато- и нейропротективное действие [46].

Долговременный дефицит растительных углеводов в «арктической» диете привёл к появлению в популяциях аборигенов Крайнего Севера вариантов генетического полиморфизма, связанных с гомеостазом глюкозы. Наиболее яркий к настоящему времени пример – это нуклеотидная замена G → A в локусе rs61736969 гена *TBC1D4*, обнаруженная с частотой 13–17% у эскимосов Гренландии, Канады и Аляски [47, 48]. У коренного населения Сибири эта мутация пока не выявлена. Ген *TBC1D4* кодирует белок AS160, необходимый для транслокации транспортера глюкозы GLUT4 на плазматическую мембрану клеток [49]. Замена rs61736969-A приводит к стоп-кодону в гене *TBC1D4* и, как следствие, к синтезу укороченной изоформы белка [47]. Показано, что у гомозиготных носителей этой мутации существенно снижается уровень GLUT4 в мышцах и, соответственно, уменьшается стимулированное инсулином поглощение глюкозы в мышцах. Всё это вызывает постпрандиальную гипергликемию, нарушение толерантности к глюкозе и обуславливает высокий риск развития диабета 2-го типа [47].

По всей видимости, вариант rs61736969-A гена *TBC1D4* появился среди эскимосов в результате ослабления естественного отбора, вызванного дефицитом углеводных субстратов в традиционной диете. Однако в настоящее время, когда неуклонно растёт потребление пищи, богатой углеводами, носителям варианта rs61736969-A трудно справиться с высокими концентрациями глюкозы в крови, что, естественно, отражается на их метаболическом здоровье.

Только у эскимосов Гренландии с частотой 3,1% была обнаружена мутация в акцепторном сайте сплайсинга гена *ADCY3* (локус rs1331776405), кодирующего аденилатциклазу 3, которая катализирует синтез сАМР из АТФ и играет важную роль в регуляции адипогенеза и гомеостаза глюкозы [50]. Нуклеотидная замена С → Т в этом локусе приводит к нарушению сплайсинга и снижению уровня экспрессии гена *ADCY3*. У гомозиготных носителей мутации наблюдались нарушения индекса массы тела и метаболизма глюкозы, почти у половины из них – диабет 2-го типа. У больных диабетом гренландских эскимосов также обнаружены дополнительные варианты полиморфизма (например, в генах *ITGA1* [51], *HNF1A* [52]). Хотя биохимические процессы, обусловленные снижением экспрессии гена *ADCY3* у эскимосов, мало изучены, фенотипические проявления мутации показывают, что она представляет собой ещё один пример генетических изменений, произошедших в результате адаптации популяций человека к экстремальным условиям природной среды, в том числе дефициту растительных углеводов в пище.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом необходимо отметить, что длительное (на протяжении не менее 3,5 тыс. лет) воздействие крайне экстремальных условий Арктики на предков эскимосо-алеутских и палеоазиатских народов привело к целому ряду адаптивных изменений в их генофондах. Коренные жители Сибири демонстрируют значительное повышение скорости метаболизма, особенно в зимнее время, что связано с изменениями в функционировании эндокринной системы и бурой жировой ткани, а также в метаболизме липидов [53, 54]. У эскимосов и других коренных народов Сибири наблюдаются низкие уровни липидов в крови, что связано с распространением у них специфических

вариантов полиморфизма генов липидного обмена – не только *CPT1A*, *FADS1*, *FADS2* и *CYB5R2* (как у народов арктического побережья), но и других генов: *PLA2G2A* (фосфолипазы А2), *PLIN1* (перилипина 1), *ANGPTL8* (ангиопоэтиноподобного белка 8), мутации в которых были выявлены у народов Центральной Сибири (у нганасан и якутов) [55]. Вместе с тем долговременный дефицит углеводов в «арктической» диете аборигенов Крайнего Севера, вероятнее всего, стал причиной ослабления отрицательного отбора, отсекающего мутации, приводящие к нарушениям в функционировании ферментов метаболизма углеводов. В результате в популяциях предков арктических народов стали распространяться мутации в генах, кодирующих ферменты, метаболизирующие крахмал и дисахариды (гены *AMY1*, *AMY2A*, *SD*), а также варианты полиморфизма в генах, связанных с метаболизмом глюкозы (гены *TBC1D*, *ADCY*). Высокой распространённости индивидов, которые не могут усваивать те или иные углеводы, мог способствовать дрейф генов, эффекты которого намного сильнее проявляются в малочисленных изолированных популяциях, к каковым относятся коренные народы Арктики [10].

По всей видимости, адаптивные изменения в генах метаболизма липидов и углеводов стали проблемой для здоровья коренного населения циркумарктического региона лишь в наше время, что связано с изменениями питания – отходом от традиционной «арктической» диеты к «западной» диете, богатой углеводами и бедной омега-3 ПНЖК. Поэтому в современных условиях крайне важным представляется проведение широкомасштабного генетического тестирования коренного населения Крайнего Севера и изучение биохимических и физиологических последствий генетически детерминированных изменений активности ферментов метаболизма липидов и углеводов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00264).

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennett, E. A., and Fu, Q. (2024) Ancient genomes and the evolutionary path of modern humans, *Cell*, **187**, 1042-1046, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.01.047>.

2. Irving-Pease, E. K., Refoyo-Martínez, A., Barrie, W., Ingason, A., Pearson, A., Fischer, A., Sjögren, K. G., Halgren, A. S., Macleod, R., Demeter, F., Henriksen, R. A., Vimala, T., McColl, H., Vaughn, A. H., Speidel, L., Stern, A. J., Scorrano, G., Ramsøe, A., Schork, A. J., Rosengren, A., Zhao, L., Kristiansen, K., Iversen, A. K. N., Fugger, L., Sudmant, P. H., Lawson, D. J., Durbin, R., Korneliussen, T., Werge, T., Allentoft, M. E., Sikora, M., Nielsen, R., Racimo, F., and Willerslev, E. (2024) The selection landscape and genetic legacy of ancient Eurasians, *Nature*, **625**, 312-320, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06705-1>.
3. Zeberg, H., Jakobsson, M., and Pääbo, S. (2024) The genetic changes that shaped Neandertals, Denisovans, and modern humans, *Cell*, **187**, 1047-1058, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.12.029>.
4. Rasmussen, M., Li, Y., Lindgreen, S., Pedersen, J. S., Albrechtsen, A., Moltke, I., Metspalu, M., Metspalu, E., Kivisild, T., Gupta, R., Bertalan, M., Nielsen, K., Gilbert, M. T., Wang, Y., Raghavan, M., Campos, P. F., Kamp, H. M., Wilson, A. S., Gledhill, A., Tridico, S., Bunce, M., Lorenzen, E. D., Binladen, J., Guo, X., Zhao, J., Zhang, X., Zhang, H., Li, Z., Chen, M., Orlando, L., Kristiansen, K., Bak, M., Tommerup, N., Bendixen, C., Pierre, T. L., Grønnow, B., Meldgaard, M., Andreassen, C., Fedorova, S. A., Osipova, L. P., Higham, T. F., Ramsey, C. B., Hansen, T. V., Nielsen, F. C., Crawford, M. H., Brunak, S., Sicheritz-Pontén, T., Villems, R., Nielsen, R., Krogh, A., Wang, J., and Willerslev, E. (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo, *Nature*, **463**, 757-762, <https://doi.org/10.1038/nature08835>.
5. Fitzhugh, B. (2016) in *Oxford Handbook of the Prehistoric Arctic* (Friesen, T. M., and Mason, O. K., eds), Oxford University Press, Oxford, pp. 253-278, <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199766956.013.20>.
6. Grebenyuk, P. S., Fedorchenko, A. Y., Dyakonov, V. M., Lebedintsev, A. I., and Malyarchuk, B. A. (2022) in *Humans in the Siberian Landscapes* (Bocharnikov, V. N., and Steblyanskaya, A. N., eds), Springer, Cham, pp. 89-133, https://doi.org/10.1007/978-3-030-90061-8_4.
7. Fitzhugh, B. (2022) in *Maritime Prehistory of Northeast Asia. The Archaeology of Asia-Pacific Navigation* (Cassidy, J., Ponkratova, I., and Fitzhugh, B., eds), Springer, Singapore, pp. 349-378, https://doi.org/10.1007/978-981-19-1118-7_15.
8. Brown, N. F., Mullur, R. S., Subramanian, I., Esser, V., Bennett, M. J., Saudubray, J. M., Feigenbaum, A. S., Kobari, J. A., Macleod, P. M., McGarry, J. D., and Cohen, J. C. (2001) Molecular characterization of L-CPT I deficiency in six patients: insights into function of the native enzyme, *J. Lipid Res.*, **42**, 1134-1142, [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)31604-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31604-7).
9. Greenberg, C. R., Dilling, L. A., Thompson, G. R., Seargeant, L. E., Haworth, J. C., Phillips, S., Chan, A., Vallance, H. D., Waters, P. J., Sinclair, G., Lillquist, Y., Wanders, R. J., and Olpin, S. E. (2009) The paradox of the carnitine palmitoyltransferase type Ia P479L variant in Canadian Aboriginal populations, *Mol. Gen. Metab.*, **96**, 201-207, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.12.018>.
10. Clemente, F. J., Cardona, A., Inchley, C. E., Peter, B. M., Jacobs, G., Pagani, L., Lawson, D. J., Antão, T., Vicente, M., Mitt, M., DeGiorgio, M., Faltyskova, Z., Xue, Y., Ayub, Q., Szpak, M., Mägi, R., Eriksson, A., Manica, A., Raghavan, M., Rasmussen, M., Rasmussen, S., Willerslev, E., Vidal-Puig, A., Tyler-Smith, C., Villems, R., Nielsen, R., Metspalu, M., Malyarchuk, B., Derenko, M., and Kivisild, T. (2014) A selective sweep on a deleterious mutation in the *CPT1A* gene in Arctic populations, *Am. J. Hum. Genet.*, **95**, 584-589, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.09.016>.
11. Малярчук Б. А., Деренко М. В., Денисова Г. А., Литвинов А. Н. (2016) Распространенность арктического варианта гена *CPT1A* в популяциях коренного населения Сибири, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **20**, 571-575, <https://doi.org/10.18699/VJ16.130>.
12. Smolnikova, M. V., Tereshchenko, S. Y., and Freidin, M. B. (2015) The «Arctic Variant» specific mutation P479L in *CPT1A* gene predisposing to carnitine palmitoyltransferase-1A deficiency in two Russian far north aboriginal populations: A retrospective genotyping of newborn screening cards, *Mol. Genet. Metabol.*, **114**, 341, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.12.308>.
13. Li, Q., Dong, K., Xu, L., Jia, X., Wu, J., Sun, W., Zhang, X., and Fu, S. (2018) The distribution of three candidate cold-resistant SNPs in six minorities in North China, *BMC Genomics*, **19**, 134, <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4524-1>.
14. Малярчук Б. А. (2020) Генетические маркеры о распространении древних морских охотников в Приохотье, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **24**, 539-544, <https://doi.org/10.18699/VJ20.646>.
15. Sikora, M., Pitulko, V., Sousa, V., Allentoft, M. E., Vinner, L., Rasmussen, S., Margaryan, A., de Barros Damgaard, P., de la Fuente Castro, C., Renaud, G., Yang, M., Fu, Q., Dupanloup, I., Giampoudakis, K., Nogues, D. B., Rahbek, C., Kroonen, G., Peyrot, M., McColl, H., Vasilyev, S., Veselovskaya, E., Gerasimova, M., Pavlova, E., Chasnyk, V., Nikolskiy, P., Gromov, A. V., Khartanovic, V. I., Moiseev, V., Grebenyuk, P., Fedorchenko, A., Lebedintsev, A., Slobodin, S. B., Malyarchuk, B., Martiniano, R., Meldgaard, M., Arppe, L., Palo, J., Sundell, T., Mannermaa, K., Putkonen, M., Alexandersen, V., Primeau, C., Baimukhanov, N., Malhi, R., Sjögren, K.-G., Kristiansen, K., Wessman, A., Sajantila, A., Lahr, M. M., Durbin, R., Nielsen, R., Meltzer, D., Excoffier, L., and Willerslev, E. (2019) The population history of northeastern Siberia since the Pleistocene, *Nature*, **570**, 182-188, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1279-z>.

16. Kanzawa-Kiriyama, H., Jinam, T. A., Kawai, Y., Sato, T., Hosomichi, K., Tajima, A., Adachi, N., Matsumura, H., Kryukov, K., Saitou, N., and Shinoda, K. (2019) Late Jomon male and female genome sequences from the Funadomari site in Hokkaido, Japan, *Anthropol. Sci.*, **127**, 83-108, <https://doi.org/10.1537/ase.190415>.
17. Senftleber, N., Jørgensen, M. E., Jørsboe, E., Imamura, F., Forouhi, N. G., Larsen, C. L., Bjerregaard, P., Hansen, T., and Albrechtsen, A. (2020) Genetic study of the Arctic *CPT1A* variant suggests that its effect on fatty acid levels is modulated by traditional Inuit diet, *Eur. J. Hum. Genet.*, **28**, 1592-1601, <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0674-0>.
18. Hale, N. (2020) Inuit metabolism revisited: what drove the selective sweep of *CPT1a* L479? *Mol. Gen. Metab.*, **129**, 255-271, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.01.010>.
19. Simcox, J., Geoghegan, G., Maschek, J. A., Bensard, C. L., Pasquali, M., Miao, R., Lee, S., Jiang, L., Huck, I., Kershaw, E. E., Donato, A. J., Apte, U., Longo, N., Rutter, J., Schreiber, R., Zechner, R., Cox, J., and Villanueva, C. J. (2017) Global analysis of plasma lipids identifies liver-derived acylcarnitines as a fuel source for brown fat thermogenesis, *Cell Metab.*, **26**, 509-522, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.006>.
20. Skotte, L., Koch, A., Yakimov, V., Zhou, S., Søborg, B., Andersson, M., Michelsen, S. W., Navne, J. E., Mistry, J. M., Dion, P. A., Pedersen, M. L., Børresen, M. L., Rouleau, G. A., Geller, F., Melbye, M., and Feenstra, B. (2017) *CPT1A* missense mutation associated with fatty acid metabolism and reduced height in Greenlanders, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **10**, e001618, <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001618>.
21. Gessner, B. D., Gillingham, M. B., Birch, S., Wood, T., and Koeller, D. M. (2010) Evidence for an association between infant mortality and a carnitine palmitoyltransferase 1A genetic variant, *Pediatrics*, **126**, 945-951, <https://doi.org/10.1542/peds.2010-0687>.
22. Sinclair, G., Collins, S., Arbour, L., and Vallance, H. (2019) The p.P479L variant in *CPT1A* is associated with infectious disease in a BC First Nation, *Paediatr. Child Health*, **24**, e111-e115, <https://doi.org/10.1093/pch/pxy106>.
23. Rajakumar, C., Ban, M. R., Cao, H., Young, T. K., Bjerregaard, P., and Hegele, R. A. (2009) Carnitine palmitoyltransferase IA polymorphism P479L is common in Greenland Inuit and is associated with elevated plasma apolipoprotein A-I, *J. Lipid Res.*, **50**, 1223-1228, <https://doi.org/10.1194/jlr.P900001-JLR200>.
24. Lemas, D. J., Wiener, H. W., O'Brien, D. M., Hopkins, S., Stanhope, K. L., Havel, P. J., Allison, D. B., Fernandez, J. R., Tiwari, H. K., and Boyer, B. B. (2012) Genetic polymorphisms in carnitine palmitoyltransferase 1A gene are associated with variation in body composition and fasting lipid traits in Yup'ik Eskimos, *J. Lipid Res.*, **53**, 175-184, <https://doi.org/10.1194/jlr.P018952>.
25. Zhou, S., Xiong, L., Xie, P., Ambalavanan, A., Bourassa, C. V., Dionne-Laporte, A., Spiegelman, D., Turcotte Gauthier, M., Henrion, E., Diallo, O., Dion, P. A., and Rouleau, G. A. (2015) Increased missense mutation burden of fatty acid metabolism related genes in Nunavik Inuit population, *PLoS One*, **10**, e0128255, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128255>.
26. Мальярчук Б. А., Деренко М. В. (2017) Полиморфизм генов карнитин-ацилтрансфераз у коренного населения Сибири, *Экологическая генетика*, **15**, 13-18, <https://doi.org/10.17816/ecogen15413-18>.
27. Voruganti, V. S., Higgins, P. B., Ebbesson, S. O., Kennish, J., Göring, H. H., Haack, K., Laston, S., Drigalenko, E., Wenger, C. R., Harris, W. S., Fabsitz, R. R., Devereux, R. B., Maccluer, J. W., Curran, J. E., Carless, M. A., Johnson, M. P., Moses, E. K., Blangero, J., Umans, J. G., Howard, B. V., Cole, S. A., and Comuzzie, A. G. (2012) Variants in *CPT1A*, *FADS1*, and *FADS2* are associated with higher levels of estimated plasma and erythrocyte delta-5 desaturases in Alaskan Eskimos, *Front. Genet.*, **3**, 86, <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00086>.
28. Ameur, A., Enroth, S., Johansson, A., Zaboli, G., Igl, W., Johansson, A. C., Rivas, M. A., Daly, M. J., Schmitz, G., Hicks, A. A., Meitinger, T., Feuk, L., van Duijn, C., Oostra, B., Pramstaller, P. P., Rudan, I., Wright, A. F., Wilson, J. F., Campbell, H., and Gyllenstein, U. (2012) Genetic adaptation of fatty-acid metabolism: a human specific haplotype increasing the biosynthesis of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids, *Am. J. Hum. Genet.*, **90**, 809-820, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.014>.
29. Amorim, C. E., Nunes, K., Meyer, D., Comas, D., Bortolini, M. C., Salzano, F. M., and Hünemeier, T. (2017) Genetic signature of natural selection in first Americans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2195-2199, <https://doi.org/10.1073/pnas.1620541114>.
30. Мальярчук, В. А., Деренко, М. В., Денисова, Г. А., Литвинов, А. Н., and Дамбуева, И. К. (2024) *FADS* gene polymorphism and the history of the formation of the indigenous populations of Siberia, *Russ. J. Genet.*, **60**, 199-209, <https://doi.org/10.1134/S1022795424020091>.
31. Mathieson, I. (2020) Limited evidence for selection at the *FADS* locus in Native American populations, *Mol. Biol. Evol.*, **37**, 2029-2033, <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa064>.
32. Mathieson, I., Lazaridis, I., Rohland, N., Mallick, S., Patterson, N., Roodenberg, S. A., Harney, E., Stewardson, K., Fernandes, D., Novak, M., Sirak, K., Gamba, C., Jones, E. R., Llamas, B., Dryomov, S., Pickrell, J., Arsuaga, J. L., de Castro, J. M., Carbonell, E., Gerritsen, F., Khokhlov, A., Kuznetsov, P., Lozano, M., Meller, H., Mochalov, O., Moiseyev, V., Guerra, M. A., Roodenberg, J., Vergès, J. M., Krause, J., Cooper, A., Alt, K. W., Brown, D., Anthony, D.,

- Lalueza-Fox, C., Haak, W., Pinhasi, R., and Reich, D. (2015) Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians, *Nature*, **528**, 499-503, <https://doi.org/10.1038/nature16152>.
33. Mathieson, I., Day, F. R., Barban, N., Tropf, F. C., Brazel, D. M., eQTLGen Consortium, BIOS Consortium, Vaez, A., van Zuydam, N., Bitarello, B. D., Gardner, E. J., Akimova, E. T., Azad, A., Bergmann, S., Bielak, L. F., Boomsma, D. I., Bosak, K., Brumat, M., Buring, J. E., Cesarini, D., et al. (2023) Genome-wide analysis identifies genetic effects on reproductive success and ongoing natural selection at the FADS locus, *Nat. Hum. Behav.*, **7**, 790-801, <https://doi.org/10.1038/s41562-023-01528-6>.
34. Fumagalli, M., Moltke, I., Grarup, N., Racimo, F., Bjerregaard, P., Jørgensen, M. E., Korneliussen, T. S., Gerbault, P., Skotte, L., Linneberg, A., Christensen, C., Brandslund, I., Jørgensen, T., Huerta-Sánchez, E., Schmidt, E. B., Pedersen, O., Hansen, T., Albrechtsen, A., and Nielsen, R. (2015) Greenlandic Inuit show genetic signatures of diet and climate adaptation, *Science*, **349**, 1343-1347, <https://doi.org/10.1126/science.aab2319>.
35. Malyarchuk, B. A., Derenko, M. V., and Denisova, G. A. (2021) Adaptive changes in fatty acid desaturation genes in indigenous populations of Northeast Siberia, *Russ. J. Genet.*, **57**, 1461-1466, <https://doi.org/10.1134/S1022795421120103>.
36. Малярчук Б.А. (2018) Полиморфизм гена *FFAR4*, кодирующего рецептор длинноцепочечных жирных кислот, у коренного населения Сибири, *Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН*, **4**, 108-112.
37. Ichimura, A., Hirasawa, A., Poulain-Godefroy, O., Bonnefond, A., Hara, T., Yengo, L., Kimura, I., Leloire, A., Liu, N., Iida, K., Choquet, H., Besnard, P., Lecoeur, C., Vivequin, S., Ayukawa, K., Takeuchi, M., Ozawa, K., Tauber, M., Maffei, C., Morandi, A., Buzzetti, R., Elliott, P., Pouta, A., Jarvelin, M.-R., Körner, A., Kiess, W., Pigeyre, M., Caiazzo, R., Van Hul, W., Van Gaal, L., Horber, F., Balkau, B., Lévy-Marchal, K., Rouskas, K., Kouvatzi, A., Hebebrand, J., Hinney, A., Scherag, A., Pattou, F., Meyre, D., Koshimizu, T., Wolowicz, I., Tsujimoto, G., and Froguel, P. (2012) Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human, *Nature*, **483**, 350-354, <https://doi.org/10.1038/nature10798>.
38. Inchley, C. E., Larbey, C. D., Shwan, N. A., Pagani, L., Saag, L., Antão, T., Jacobs, G., Hudjashov, G., Metspalu, E., Mitt, M., Eichstaedt, C. A., Malyarchuk, B., Derenko, M., Wee, J., Abdullah, S., Ricaut, F. X., Mormina, M., Mägi, R., Villems, R., Metspalu, M., Jones, M. K., Armour, J. A., and Kivisild, T. (2016) Selective sweep on human amylase genes postdates the split with Neanderthals, *Sci. Rep.*, **6**, 37198, <https://doi.org/10.1038/srep37198>.
39. Marcadier, J. L., Boland, M., Scott, C. R., Issa, K., Wu, Z., McIntyre, A. D., Hegele, R. A., Geraghty, M. T., and Lines, M. A. (2015) Congenital sucrase-isomaltase deficiency: identification of a common Inuit founder mutation, *Can. Med. Assoc. J.*, **187**, 102-107, <https://doi.org/10.1503/cmaj.140657>.
40. Andersen, M. K., Skotte, L., Jørsboe, E., Polito, R., Stæger, F. F., Aldiss, P., Hanghøj, K., Waples, R. K., Santander, C. G., Grarup, N., Dahl-Petersen, I. K., Diaz, L. J., Overvad, M., Senftleber, N. K., Søborg, B., Larsen, C. V. L., Lemoine, C., Pedersen, O., Feenstra, B., Bjerregaard, P., Melbye, M., Jørgensen, M. E., Færgeman, N. J., Koch, A., Moritz, T., Gillum, M. P., Moltke, I., Hansen, T., and Albrechtsen, A. (2022) Loss of sucrase-isomaltase function increases acetate levels and improves metabolic health in Greenlandic cohorts, *Gastroenterology*, **162**, 1171-1182. e3, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.12.236>.
41. Malyarchuk, B. A., Derenko, M. V., and Denisova, G. A. (2017) The frequency of inactive sucrase-isomaltase variant in indigenous populations of Northeast Asia, *Russ. J. Genet.*, **53**, 1052-1054, <https://doi.org/10.1134/S1022795417090095>.
42. Козлов А. И., Малярчук Б. А., Лавряшина М. Б., Вершубская Г. Г. (2023) Нарушения усвоения сахарозы подтверждают своеобразие генетической истории эскимосов, *Вестник Московского университета. Серия XXIII. Антропология*, **2**, 82-91, <https://doi.org/10.32521/2074-8132.2023.2.082-091>.
43. Husein, D. M., Rizk, S., and Naim, H. Y. (2020) Differential effects of sucrase-isomaltase mutants on its trafficking and function in irritable bowel syndrome: similarities to congenital sucrase-isomaltase deficiency, *Nutrients*, **13**, 9, <https://doi.org/10.3390/nu13010009>.
44. Tannous, S., and Naim, H. Y. (2024) Impaired digestive function of sucrase-isomaltase in a complex with the Greenlandic sucrase-isomaltase variant, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1870**, 166947, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166947>.
45. Senftleber, N. K., Ramne, S., Moltke, I., Jørgensen, M. E., Albrechtsen, A., Hansen, T., and Andersen, M. K. (2023) Genetic loss of sucrase-isomaltase function: mechanisms, implications, and future perspectives, *Appl. Clin. Genet.*, **16**, 31-39, <https://doi.org/10.2147/TACG.S401712>.
46. Xiong, R. G., Zhou, D. D., Wu, S. X., Huang, S. Y., Saimaiti, A., Yang, Z. J., Shang, A., Zhao, C. N., Gan, R. Y., and Li, H. B. (2022) Health benefits and side effects of short-chain fatty acids, *Foods*, **11**, 2863, <https://doi.org/10.3390/foods11182863>.
47. Moltke, I., Grarup, N., Jørgensen, M. E., Bjerregaard, P., Treebak, J. T., Fumagalli, M., Korneliussen, T. S., Andersen, M. A., Nielsen, T. S., Krarup, N. T., Gjesing, A. P., Zierath, J. R., Linneberg, A., Wu, X., Sun, G., Jin, X., Al-Aama, J., Wang, J., Borch-Johnsen, K., Pedersen, O., Nielsen, R., Albrechtsen, A., and Hansen, T. (2014)

- A common Greenlandic *TBC1D4* variant confers muscle insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature*, **512**, 190-193, <https://doi.org/10.1038/nature13425>.
48. Manousaki, D., Kent, J. W., Jr, Haack, K., Zhou, S., Xie, P., Greenwood, C. M., Brassard, P., Newman, D. E., Cole, S., Umans, J. G., Rouleau, G., Comuzzie, A. G., and Richards, J. B. (2016) Toward precision medicine: *TBC1D4* disruption is common among the Inuit and leads to underdiagnosis of type 2 diabetes, *Diabetes Care*, **39**, 1889-1895, <https://doi.org/10.2337/dc16-0769>.
 49. Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C. P., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. W., and Lienhard, G. E. (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation, *J. Biol. Chem.*, **278**, 14599-14602, <https://doi.org/10.1074/jbc.C300063200>.
 50. Grarup, N., Moltke, I., Andersen, M. K., Dalby, M., Vitting-Seerup, K., Kern, T., Mahendran, Y., Jørsboe, E., Larsen, C. V. L., Dahl-Petersen, I. K., Gilly, A., Suveges, D., Dedoussis, G., Zeggini, E., Pedersen, O., Andersson, R., Bjerregaard, P., Jørgensen, M. E., Albrechtsen, A., and Hansen, T. (2018) Loss-of-function variants in *ADCY3* increase risk of obesity and type 2 diabetes, *Nat. Genet.*, **50**, 172-174, <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0022-7>.
 51. Grarup, N., Moltke, I., Andersen, M. K., Bjerregaard, P., Larsen, C. V. L., Dahl-Petersen, I. K., Jørsboe, E., Tiwari, H. K., Hopkins, S. E., Wiener, H. W., Boyer, B. B., Linneberg, A., Pedersen, O., Jørgensen, M. E., Albrechtsen, A., and Hansen, T. (2018) Identification of novel high-impact recessively inherited type 2 diabetes risk variants in the Greenlandic population, *Diabetologia*, **61**, 2005-2015, <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4659-2>.
 52. Thuesen, A. C. B., Stæger, F. F., Kaci, A., Solheim, M. H., Aukrust, I., Jørsboe, E., Santander, C. G., Andersen, M. K., Li, Z., Gilly, A., Stinson, S. E., Gjesing, A. P., Bjerregaard, P., Pedersen, M. L., Larsen, C. V. L., Grarup, N., Jørgensen, M. E., Zeggini, E., Bjørkhaug, L., Njølstad, P. R., Albrechtsen, A., Moltke, I., and Hansen, T. (2022) A novel splice-affecting *HNF1A* variant with large population impact on diabetes in Greenland, *Lancet Reg. Health Eur.*, **24**, 100529, <https://doi.org/10.1016/j.lanpe.2022.100529>.
 53. Осипова Л. П., Личман Д. В., Холлмарк Б., Карафет Т. М., Сиз П. С., Уоткинс Д. С., Хаммер М. Ф. (2020) Современная геномика в изучении проблем адаптации человека к климату в высоких широтах Сибири, *Научные результаты биомедицинских исследований*, **6**, 323-337, <https://doi.org/10.18413/2658-6533-2020-6-3-0-4>.
 54. Leonard, W. R. (2024) Pearl Memorial Lecture. Humans at the extremes: Exploring human adaptation to ecological and social stressors, *Am. J. Hum. Biol.*, **36**, e24010, <https://doi.org/10.1002/ajhb.24010>.
 55. Hallmark, B., Karafet, T. M., Hsieh, P., Osipova, L. P., Watkins, J. C., and Hammer, M. F. (2019) Genomic evidence of local adaptation to climate and diet in indigenous Siberians, *Mol. Biol. Evol.*, **36**, 315-327, <https://doi.org/10.1093/molbev/msy211>.

GENETIC FEATURES OF LIPID AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN ARCTIC PEOPLES

Review

B. A. Malyarchuk

*Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
685000 Magadan, Russia; e-mail: malyarchuk@ibpn.ru*

The long-term, over several millennia, adaptation of the ancestors of the indigenous peoples of the Far North of Asia and America to the extreme natural and climatic environments of the Arctic resulted in changes in genes controlling various metabolic processes. However, most of the genetic variability in Eskimos and Paleoasians (Chukchis and Koryaks) is related to adaptation to the traditional "Arctic" diet, which is rich in lipids and proteins but extremely poor in plant carbohydrates. The results of population genetic studies have shown that specific polymorphism variants in genes related to lipid metabolism (*CPT1A*, *FADS1*, *FADS2*, and *CYB5R2* genes) and carbohydrate metabolism (*AMY1*, *AMY2A*, and *SI* genes) are common in Eskimos and Paleoasian peoples. When deviating from the traditional diet, these polymorphism variants lead to metabolic disorders. American Eskimo-specific polymorphism variants in genes related to glucose metabolism (*TBC1D* and *ADCY* genes) significantly increase the risk of developing type 2 diabetes. All these circumstances indicate the need for large-scale genetic testing of indigenous populations of the Far North and the need to study the biochemical and physiological consequences of genetically determined changes in the activity of enzymes of lipid and carbohydrate metabolism.

Keywords: human adaptation, Arctic, lipid metabolism genes, carbohydrate metabolism genes

ЛИНИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ОТ ПАЦИЕНТА С БОЛЕЗНЬЮ ХАНТИНГТОНА КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА ЗАБОЛЕВАНИЯ: ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА

© 2024 Н. Красковская^{1*}, А. Кольцова¹, П. Парфенова¹, А. Шатрова¹, Н. Ярцева¹, В. Назаров², Е. Девяткина², М. Хотин¹, Н. Михайлова¹

¹ Институт цитологии Российской академии наук,
194064 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: ninakraskovskaya@gmail.com

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, 197022 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 22.11.2023

После доработки 21.05.2024

Принята к публикации 13.06.2024

Болезнь Хантингтона (БХ) – наследственное неизлечимое заболевание, вызванное мутацией и увеличением числа повторов CAG в гене *HTT*, кодирующем белок хантингтин (НТТ). Несмотря на многочисленные исследования, проведённые на различных клеточных и животных моделях, конкретные механизмы, объясняющие биологическую роль мутантного хантингтина (mНТТ) и его токсичность для нейронов стриатума, до настоящего времени не установлены, эффективная терапия для пациентов не разработана. Нами получена и охарактеризована новая линия дермальных фибробластов Hddf (Huntington Disease Dermal Fibroblasts) от пациента с подтверждённым диагнозом БХ. Приведены ростовые характеристики линии Hddf, окраска на канонические маркеры, проведено кариотипирование и фенотипирование клеток. Проведена прямая дифференцировка фибробластов полученной линии в индуцированные нейроны стриатума. Новая линия фибробластов может быть использована в качестве клеточной модели для изучения биологической роли mНТТ и различных проявлений патогенеза БХ как на самих фибробластах, так и на индуцированных нейрональных клетках, полученных с помощью методов репрограммирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фибробласты кожи, болезнь Хантингтона, CAG-повторы, хантингтин, полиглутамин, трансдифференцировка.

DOI: 10.31857/S0320972524070046 EDN: WNIDDL

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Хантингтона (БХ) представляет собой неизлечимое нейродегенеративное заболевание, наследуемое по аутосомно-доминантному типу и вызванное экспансией полиглутаминового повтора CAG в гене *HTT*, кодирующем белок хантингтин (НТТ). Болезнь развивается преимущественно в возрасте 30–50 лет, однако выделяют также ювенальные формы, развивающиеся в детском и подростковом возрасте. Болезнь развивается при наличии более 36 повторяющихся кодонов CAG, кодирующих аминокислоту глутамин.

Принятые сокращения: БХ – болезнь Хантингтона; ИП – индекс пролиферации.

* Адресат для корреспонденции.

Характерными симптомами являются моторные и когнитивные нарушения, депрессия, психоэмоциональные изменения. Наиболее частым симптомом БХ является хорея – характерное нарушение двигательной активности, проявляющееся в виде неконтролируемых, отрывистых движений, обусловленных повреждением области стриатума и коры головного мозга пациентов [1]. Несмотря на идентификацию генетической причины заболевания, специфические механизмы, лежащие в основе дегенерации области стриатума и коры головного мозга, остаются неизвестными.

С периода раннего эмбрионального развития мутантный хантингтин (mНТТ) присутствует практически во всех клетках организма, но его точная функция неизвестна. На клеточном уровне mНТТ вызывает нарушения в функционировании

нейронов, несущих агрегаты мутантного белка, но не установлены причины, обуславливающие его токсичность для клеток. Однозначная связь между мутацией, агрегацией и дегенеративными изменениями в клетках до сих пор не установлена. Неудачи при выборе терапевтических стратегий при лечении БХ могут быть связаны с ограниченными возможностями получения релевантных моделей БХ для воспроизведения патогенеза, наблюдаемого у людей.

Значительный вклад в современное понимание природы БХ был сделан благодаря изучению посмертной мозговой ткани пациентов, а также использованию животных и клеточных моделей патологии. Хотя животные модели *in vivo* дают возможность изучать патологию заболевания, ни одна из них не воспроизводит полностью патологическую картину, наблюдаемую у человека [2], и представления о механизмах прогрессирования БХ всё ещё остаются крайне ограниченными.

Создание клеточной модели БХ с использованием клинически значимых типов клеток пациентов может иметь решающее значение для раскрытия сложных молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе патогенеза этого заболевания. Перспективным объектом изучения могут стать дермальные фибробласты от пациентов с БХ. Дермальные фибробласты – клетки соединительной ткани кожи, которые имеют множество преимуществ: они обладают уникальными физиологическими функциями, продуцируют и ремоделируют внеклеточный матрикс, обеспечивают гомеостаз кожи, демонстрируют высокие пролиферативные характеристики, а также доступны для получения культур *in vitro* в связи с доступностью образцов кожи доноров. Дермальные фибробласты активно применяют для изучения нейродегенеративных заболеваний пациентов с наследственными мутациями, в том числе с болезнью Альцгеймера [3, 4], Паркинсона [5–7], боковым амиотрофическим склерозом [8–10] и т.д. В отличие от трансформированных клеточных линий, неиммortalизованные клеточные линии фибробластов поддерживают функции, критически важные для регуляции транскрипции *НТТ* и целостности генома [11].

Фибробласты также используются для изучения роли *mНТТ* при БХ. Согласно имеющимся литературным данным, фибробласты от пациентов с БХ отличаются морфологией, скоростью пролиферации, сниженной устойчивостью к различным факторам стресса, изменением морфологии оргanelл, для них показаны различия в уровне убиквитинизированных белков, более высокие уровни активных форм кислорода (АФК), *mНТТ* и маркера аутофагии LAMP2A [12]. Также показано различие

в транскриптомах фибробластов от пациентов с БХ и здоровых доноров [13]. В ряде исследований на дермальных фибробластах было показано, что митохондриальные и биоэнергетические дефекты способствуют прогрессированию заболевания, хотя конкретный молекулярный механизм, с помощью которого *mНТТ* влияет на энергетический обмен, остаётся неясным [14, 15]. В фибробластах, полученных от пациентов с ювенальной формой БХ, также наблюдалась повышенная активность протеасом [16].

Помимо изучения роли *mНТТ* в делящихся клетках, фибробласты от пациентов также могут выступать в качестве «стартового материала» для получения индуцированных нейронов – как при помощи технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [17–20], так и при помощи прямого репрограммирования [21–23]. В настоящий момент оба подхода активно развиваются и совершенствуются. Кроме модели для изучения заболевания, популяции индуцированных нейронов могут использоваться в качестве платформы для скрининга и оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов, успешно зарекомендовавших себя на животных моделях [24, 25]. Также возлагаются большие надежды на технологии регенеративной медицины, связанные с замещением повреждённой ткани мозга индуцированными нейронами [26].

В настоящий момент в российских коллекциях клеточных культур отсутствуют паспортизированные линии фибробластов, полученные от пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, в том числе с БХ. Цель данной работы – получение и характеристика неиммortalизованной линии дермальных фибробластов Hddf (Huntington Disease Dermal Fibroblasts) от пациента с подтверждённым диагнозом БХ. В задачи исследования входило получение образца ткани, получение культуры клеток фибробластов, их фенотипирование и кариотипирование, проведение исследований ростовых характеристик клеток, анализ репликативного старения и других характеристик, необходимых для паспортизации клеточной линии. Из дермальных фибробластов линии Hddf были получены индуцированные нейроны стриатума с использованием методики прямого репрограммирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение клеток из биоптата кожи. Перед забором ткани пациент прошёл медицинский осмотр. Получено заключение этической комиссии и информированное добровольное согласие донора. Клетки из фрагмента биоптата кожи

выделяли механическим способом – измельчали ткань хирургическим скальпелем и помещали в чашку Петри с добавлением ростовой среды, содержащей 90% DMEM/F12 («Биолот», Россия) + 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Gibco», США). Их культивировали в инкубаторе при 37 °С и 95% CO₂ + 90% влажности. Клетки пересевали с использованием раствора трипсина (0,25%-версена (0,2%) при достижении ими 80%-ной конfluence. Кратность посева 1 : 3–1 : 5. Клетки культивировали в ростовой среде без добавления антибиотиков и антимикотика, что позволило регулярно, на всех этапах выполнения работ, контролировать отсутствие контаминации культуры бактериями и грибами визуально, при помощи светового микроскопа Nikon TS100 («Nikon», Япония). Для выявления контаминации клеток микоплазмой использовали метод прямого окрашивания ДНК клеток флуоресцентным красителем Hoechst 33258 и метод посева на селективные питательные среды. Процедуру анализа проводили в соответствии с ранее описанными методиками [27, 28]. Идентификацию клеточной линии и отсутствие кросс-контаминации другими клеточными линиями проводили посредством фрагментного анализа STR-маркеров человека. Работа выполнена ООО «ГОРДИЗ» (Россия).

Кривая роста. Для характеристики пролиферативной активности клетки были посеяны в одинаковой плотности на чашки Петри диаметром 30 мм. Количество живых клеток, а также уровень их автофлуоресценции и размер оценивались на приборе CytoFLEX («Beckman Coulter», США); для анализа полученных данных использовалось программное обеспечение CytExpert software v1.2. На протяжении 5 суток (120 ч) ежедневно проводили подсчет клеток и на основании полученных данных высчитывали индекс пролиферации (ИП) популяции клеток как отношение числа клеток в текущий момент времени к исходному числу посеянных клеток и строили кривые роста клеточной популяции [29]. Для каждого экспериментального варианта было проанализировано по три параллели на каждую временную точку. Среднее время удвоения клеточной популяции высчитывалось по формуле (1):

$$a_0 = \frac{t * \ln 2}{\ln(M_t / M_0)}, \quad (1)$$

где t – время логарифмической фазы роста; M_t – количество клеток в момент, когда кривая роста выходит на плато; M_0 – количество клеток в начале логарифмической фазы роста. За логарифмическую фазу роста принимали период выраженного прироста численности клеток. За начало периода считали временную точку, ИП на которой достоверно отличался от предшествующего ИП. Окон-

чание периода соответствует временной точке, на которой ИП клеточной популяции достоверно не отличается от ИП на последующей временной точке.

Эффективность клонирования. Клетки на анализируемых пассажах высевали в чашки Петри с плотностью 2–3 кл./см² (50 клеток на чашку Петри 60 мм ϕ). Для каждого эксперимента готовили 8 чашек. Через 14 суток клетки окрашивали 1%-ным водным раствором кристалл-виолета и считали колонии. Эффективность клонирования определяли в %, как отношение числа выросших колоний (клонов) к числу посеянных клеток. Учитывали колонии, состоящие из не менее 20 клеток.

Проточная цитометрия. Анализ экспрессии поверхностных антигенов проводили с помощью проточной цитофлуориметрии на цитометре марки CytoFlex S («Beckman Coulter»), оснащённом программой CytExpert (version 2.3, «Beckman Coulter»). Клетки снимали с чашек Петри раствором трипсина-версена, отмывали раствором PBS, осаждали и доводили до концентрации 1×10^6 клеток в 1 мл буфера для окрашивания клеток (Cell staining buffer, «BioLegend», США). Иммунофенотипирование проводили путём окрашивания клеток антителами, конъюгированными с соответствующими флуорохромами (CD34, CD44, CD73, CD90, CD105 – PE-конъюгаты, и HLA-ABC, SSEA-3 – FITC-конъюгаты) в разведении, соответствующем рекомендациям фирм-производителей (табл. 1). Антитела, не обладающие специфичностью к ис-

Таблица 1. Перечень антител, используемых для проточной цитометрии

Название	Производитель	Каталожный номер
Iso PE	BD Pharmingen	554680
CD90 PE	BD Pharmingen	561970
CD73 PE	BD Pharmingen	550257
CD105 PE	BD Pharmingen	560839
CD44 PE	eBioscience	12-0441-81
CD34 PE	Beckman Coulter	IM1420
HLA-DR PE	BD Pharmingen	555812
Iso FITC	BD Pharmingen	555748
HLA-ABC FITC	Beckman Coulter	IM1838U
SSEA-3 Alexa Fluor 488, clone MC-631	Merck Millipore	FCMAB141A4

Таблица 2. Перечень антител, используемых для иммунофлуоресцентного окрашивания

Название	Производитель	Каталожный номер	Разведение
Антитело к β -тубулину III	R&D systems	MAV1195	1/1000
Антитело к MAP2	Abcam	ab281588	1/1000
Антитело к DARPP-32	Thermo Fisher Scientific	MA5-32113	1/250
Антитело к GABA	Sigma-Aldrich	A2052	1/500
Антитело к mHTT, клон mEM48	Merck Millipore	MAV5374	1/200
Антитело к виментину	Abclonal	A19607	1/2000
Антитело к нестину	Santa-Cruz Biotechnology	Sc-23927	1/50
Антитело к α -актину	Immunoglobe	0042-05	1/250
Флуорофор Alexa 488 Anti-Rabbit	Invitrogen	R37116	1/1000
Флуорофор Alexa 555 Anti-Mouse	Abcam	ab150114	1/2000
Флуорофор Alexa 488 Anti-Mouse	Abcam	ab150078	1/2000
Флуорофор Alexa 555 Anti-Rabbit	Abcam	ab150113	1/2000

следуемым антигенам, но соответствующие классу и типу антител, использовали в качестве изотипических контролей.

Кариотипирование. Для накопления клеток на стадии метафазы в питательную среду добавляли раствор демиколцина в конечной концентрации 0,1 мкг/мл («Sigma-Aldrich», США) на 3 ч. Далее проводили гипотоническую обработку смесью растворов 0,55%-ного KCl и 1%-ного цитрата Na в соотношении 1 : 1 в течение 15–20 мин при 37 °С. Фиксацию суспензии проводили смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1 в течение 15 мин трижды. Для получения препаратов метафазных пластинок суспензию фиксированных клеток раскапывали на сухие предметные стекла над водяной баней при температуре воды 50–53 °С. Анализ хромосом осуществляли с использованием стандартного GTG-метода дифференциального окрашивания хромосом на G-диски [30]. Препараты хромосом, предварительно высушенные при 37 °С, обрабатывали 0,02%-ным раствором трипсина («Difco», США) в течение 2–3 мин. Действие фермента блокировали раствором GKN в течение 15 с. Далее препараты хромосом окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза («Merck Millipore», США) на фосфатном буфере в течение 4 мин. Анализ структурных перестроек хромосом фибробластов проводили автоматически с помощью аппаратно-программного комплекса, в состав которого входят: микроскоп Axio Skop A1 ProgRes MF («Carl Zeiss Microscopy», Германия), чёрно-белая CCD-

камера высокого разрешения («Jenoptik», Германия, 1360 × 1024 пикселя) и компьютер с установленным программным обеспечением «ВидеоТест Карио 3.1».

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Перед проведением иммунофлуоресцентного окрашивания фибробласты отмывали от кондиционированной среды фосфатно-солевым буфером без Ca^{2+} и Mg^{2+} (PBS) и фиксировали в 10%-ном растворе формалина («Sigma-Aldrich») в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем проводили серию промывок раствором PBS, пермеабиллизацию 0,25%-ным раствором Triton-X100 в PBS в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем клетки 3 раза промывали PBS и инкубировали в блокирующем растворе, содержащем 3%-ный бычий сывороточный альбумин («Sigma-Aldrich»), разведённый в PBS, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с первичными антителами, разведёнными в блокирующем растворе в течение ночи при температуре +4 °С (концентрация/разведение приведены в табл. 2). После этого проводили серию промывок раствором PBS, после чего клетки инкубировали со вторичными антителами в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем проводили серию промывок раствором PBS и монтировали клетки на предметном стекле с помощью среды для заключения («Cell Signalling», США). Интенсивность флуоресценции детектировали при помощи лазерного конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV3000.

Анализ репликативного старения. Оценивали активность фермента β -галактозидазы. Клетки выращивали в чашках Петри (3,5 мм, «Nunc», Дания) до образования конfluence, а затем окрашивали с помощью набора реактивов (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, «Sigma-Aldrich») согласно инструкции. У клеток, вступающих в фазу репликативного старения, цитоплазма окрашивается в синий цвет. Анализ проводили с помощью инвертированного микроскопа («Nikon») на 7-м, 13-м, 20-м, 30-м и 40-м пассажах. Долю (%) окрашенных клеток определяли при подсчёте не менее 1000 клеток в разных полях зрения на одну временную точку.

Трансдифференцировка в нейрональном направлении. Получение индуцированных нейронов стриатума из дермальных фибробластов производили согласно методике, описанной ранее [31]. Фибробласты линии HDDF на 12-м пассаже культивировали в 6-луночном планшете до достижения монослоя. Клетки заражали лентивирусами, кодирующими микроРНК и транскрипционные факторы DLX2 и STIP2, после чего производили синхронизацию при помощи 1 мкМ рапамицина. После селекции антибиотиком фибробласты пересаживали на покровные стёкла, покрытые матригелем. Далее к клеткам добавляли лентивирус, кодирующий транскрипционный фактор MYT1L. Через 24 ч проводили смену среды на среду для репрограммирования, состоящую из Neurobasal-A, 2%-ного B-27, добавки GlutaMax, 1 мМ вальпроевой кислоты, 1 мкМ ретиноевой кислоты, 200 мкМ дибутил сAMP, 20 нг/мл нейротрофического фактора мозга, 20 нг/мл нейротрофина 3 типа, 20 нг/мл глиального нейротрофического фактора. Культивировали в течение 35–40 суток в присутствии доксицилина в конечной концентрации 1 мкг/мл, который добавляли каждые 48 ч.

Определение количества повторов CAG. Определение числа CAG-повторов в гене *HTT* осуществлялось с помощью метода ПЦР с праймингом тройных повторов и последующим разделением ПЦР-продукта с помощью фрагментного анализа. Для проведения исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из клеточной культуры дермальных фибробластов. Экстракция ДНК проводилась с использованием набора QIAamp® DNA Mini Kit («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для проведения ПЦР была синтезирована пара праймеров со следующими последовательностями: прямой – HEX-ATGAAGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCC, обратный – CGGTGGCGGCTGTTGCTGCTGCTGCTGCT, согласно методике, описанной ранее [32]. Прямой праймер граничил с 5'-концом участка CAG-повторов и отступал на три нуклеотида во избежание нарушения связывания с комплементарной по-

следовательностью ДНК, возможного ввиду наличия полиморфизма в данном участке. Обратный праймер имел способность гибридизоваться с любым участком области CAG-повторов, но наличие «хвоста», комплементарного последовательности, граничащей с 3'-концом, позволяло добиться большей специфичности к последним 5 повторам. Для увеличения специфичности был использован ступенчатый протокол ПЦР. Разделение ПЦР-продукта проведено с помощью фрагментного анализа методом капиллярного гель-электрофореза на автоматическом анализаторе «Нанофор-05» («Синтол», Россия).

Для расчёта длины CAG-повторов использована формула (2):

$$CAGn = \frac{\text{Размер фрагмента} - 47}{3}, \quad (2)$$

где размер фрагмента соответствует размеру пика с наибольшей высотой. Данная методика допускает погрешность ± 2 повтора.

Статистический анализ. Результаты представлены как среднее значение \pm ошибка среднего. Статистическое сравнение результатов, полученных в экспериментах, проводили с использованием критерия Стьюдента для сравнения двух групп и одностороннего анализа ANOVA с последующим тестом Тьюки для множественных сравнений между более чем двумя группами. Значения p указаны в подписях к рисункам. Результаты считали значимыми при значении $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биоптат кожи был получен от женщины 36 лет с подтверждённым диагнозом БХ. В результате генетического исследования пациента в последовательности гена обнаружено 47 повторов кодона CAG. Из фрагмента биоптата спустя две недели культивирования была получена первичная культура дермальных фибробластов (рис. 1, а).

В результате серии пассажей была получена клеточная линия, представленная гомогенной популяцией дермальных фибробластов и названная HDDF (Huntington Disease Dermal Fibroblasts) (рис. 1, б и в). В полученной клеточной линии не было выявлено контаминации бактериями, грибами и микоплазмой. STR-анализ подтвердил уникальность данной популяции и отсутствие кросс-контаминации другими клеточными линиями (не публикуется, информация будет размещена в паспорте клеточной линии). Также был проведён эксперимент по определению числа CAG-повторов в гене *HTT* полученной клеточной линии, выявивший количество повторов, равное 46 ± 2 .

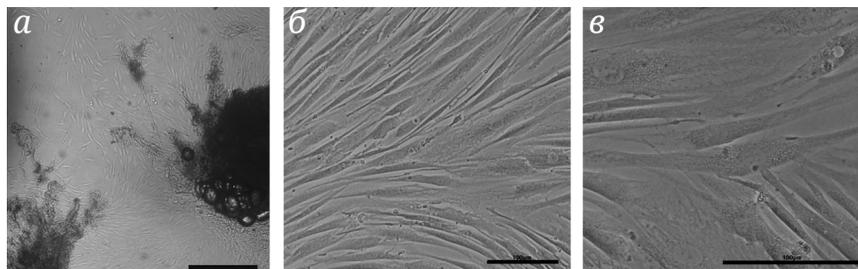


Рис. 1. Общий вид полученной линии фибробластов. *а* – Прижизненная микрофотография фрагмента биоптата и первичных фибробластов. Световая микроскопия. Масштаб 200 мкм. *б* и *в* – Прижизненные микрофотографии линии дермальных фибробластов на 7-м пассаже с увеличением 10× и 20× соответственно. Световая микроскопия. Масштаб 100 мкм

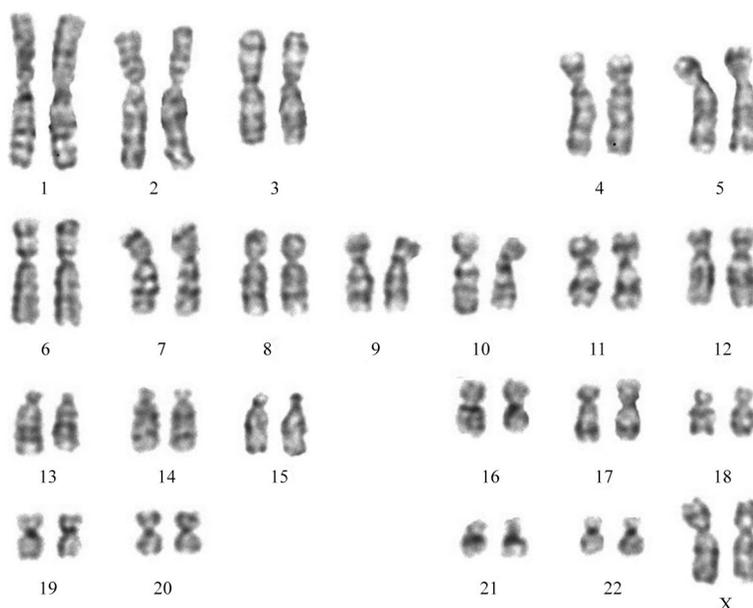


Рис. 2. Кариотип клеток линии HDDF с нормальным числом хромосом 46 XX, без структурных перестроек хромосом

Полученные фибробласты имеют характерную для данного типа клеток веретенообразную форму (рис. 1, *в*). Клетки активно пролиферируют в процессе длительного культивирования, сохраняют высокую жизнеспособность после криоконсервации, которая составляет не менее 80%.

Кариотипический анализ клеточной линии HDDF проводили на 7-м пассаже. Анализ 100 метафазных пластинок показал, что клеточная линия фибробластов от больного БХ имеет нормальный кариотип – 46 XX. Долю полиплоидных клеток определяли, исследуя 500 метафаз, и она составила 2%. Для анализа структурных перестроек хромосом (СПХ) кариотипировали 25 метафаз. В клетках линии HDDF клональных и неклональных СПХ выявлено не было (рис. 2).

Далее была проведена оценка ростовых характеристик полученной клеточной линии в процессе длительного культивирования на 7-м, 20-м, 30-м и 40-м пассажах. На основании данных проточной цитометрии были вычислены ИП клеток

для разных суток культивирования и построены кривые роста культуры. На графике чётко видна тенденция постепенного снижения ИП клеточной культуры в процессе длительного культивирования и, как следствие, увеличение времени одного удвоения клеточной популяции в фазе её логарифмического роста. На 70-м пассаже время одного удвоения клеточной популяции составило 24 ч, на 20-м пассаже – 32 ч, на 30-м пассаже – 45 ч, на 40-м пассаже – 55 ч.

На графике видно, что существенное снижение ИП в процессе культивирования наблюдается только на 40-м пассаже (рис. 3, *а*). Интересно, что клетки сохраняли высокий пролиферативный потенциал до 30-го пассажа, после чего произошло снижение пролиферативной активности. Аналогичная тенденция проявлялась и при оценке эффективности клонирования: на 7-м пассаже она составила $10 \pm 1,02\%$, на 20-м пассаже эффективность клонирования составила $23 \pm 1,4\%$, на 30-м пассаже – $11,75 \pm 2,01\%$.

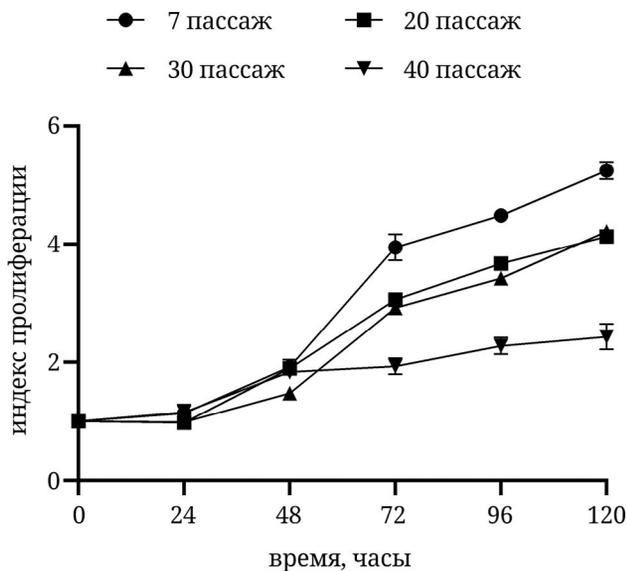


Рис. 3. Ростовые характеристики линии Hddf. График, иллюстрирующий кривую роста линии на 7-м, 20-м, 30-м и 40-м пассаже

Окраска на β -галактозидазу показала постепенное нарастание в культуре количества клеток, содержащих данный фермент. При этом интенсивность окраски вплоть до 30-го пассажа была

крайне слабой (рис. 4, в) по сравнению с интенсивностью в клетках на 40-м пассаже (рис. 4, г). Полученные данные подтверждают наличие процесса репликативного старения, характерного для всех неиммортизированных диплоидных клеточных линий, а также коррелируют с данными о постепенном снижении их пролиферативной активности в процессе длительного культивирования.

Далее было проведено фенотипирование клеток линии Hddf с помощью проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты представлены в виде панели, иллюстрирующей экспрессию поверхностных маркеров, характерных для мезенхимных стволовых клеток (рис. 5). Анализ на 7-м пассаже показал, что исследуемые клетки позитивны по основным поверхностным маркерам, характерным для мезенхимных стволовых клеток CD44 ($99,98 \pm 0,03$), CD73 ($99,97 \pm 0,05$), CD90 ($99,93 \pm 0,05$), CD105 ($99,79 \pm 0,15$), и негативны по маркерам гемопоэтических клеток, таких как CD34 ($2,25 \pm 0,26$), HLA-DR ($0,12 \pm 0,03$), SSEA-3 ($0,12 \pm 0,04$), что соответствует фенотипу мезенхимных стволовых клеток, присущему также и фибробластам.

Полученная линия фибробластов также была проанализирована при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания (на 7-м пассаже)

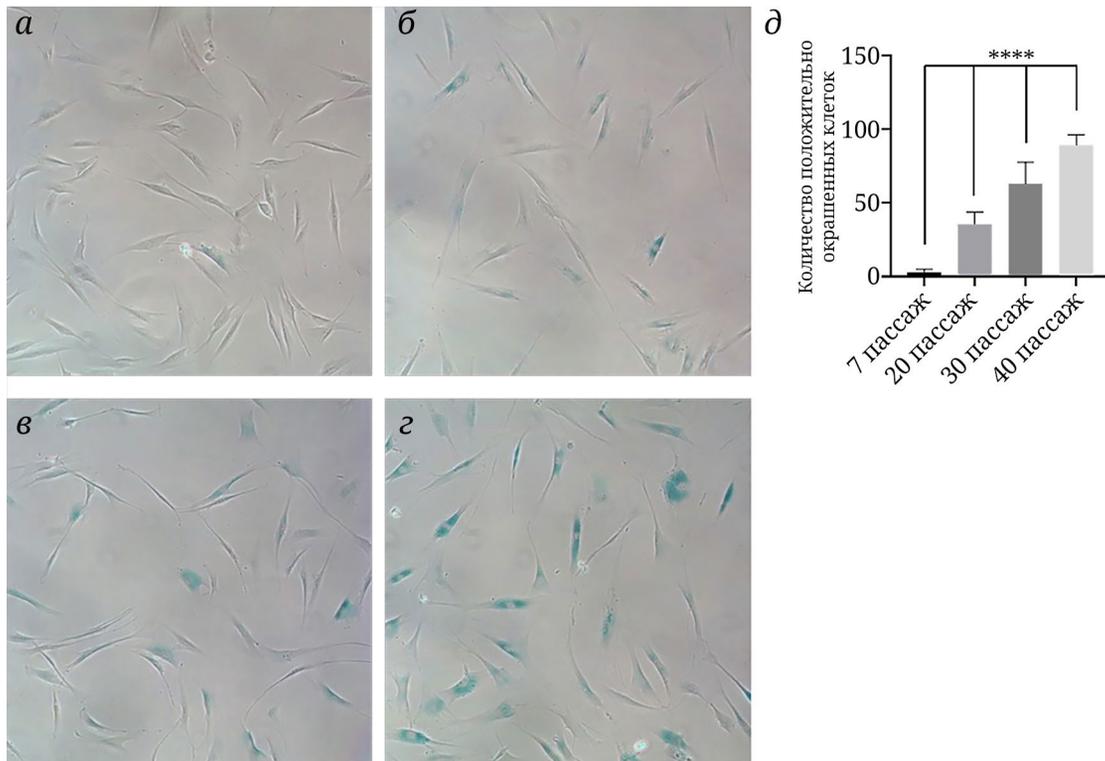


Рис. 4. Анализ репликативного старения линии Hddf на 7-м, 20-м, 30-м и 40-м пассажах. а, б, в, г – Микрофотографии, иллюстрирующие активность β -галактозидазы в клетках на 7-м, 20-м, 30-м и 40-м пассажах соответственно. д – Гистограмма, иллюстрирующая полученные результаты. Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего, **** $p < 0,001$ согласно одностороннему анализу ANOVA с апостериорным тестом Данна. На каждом пассаже было проанализировано не менее 1000 клеток

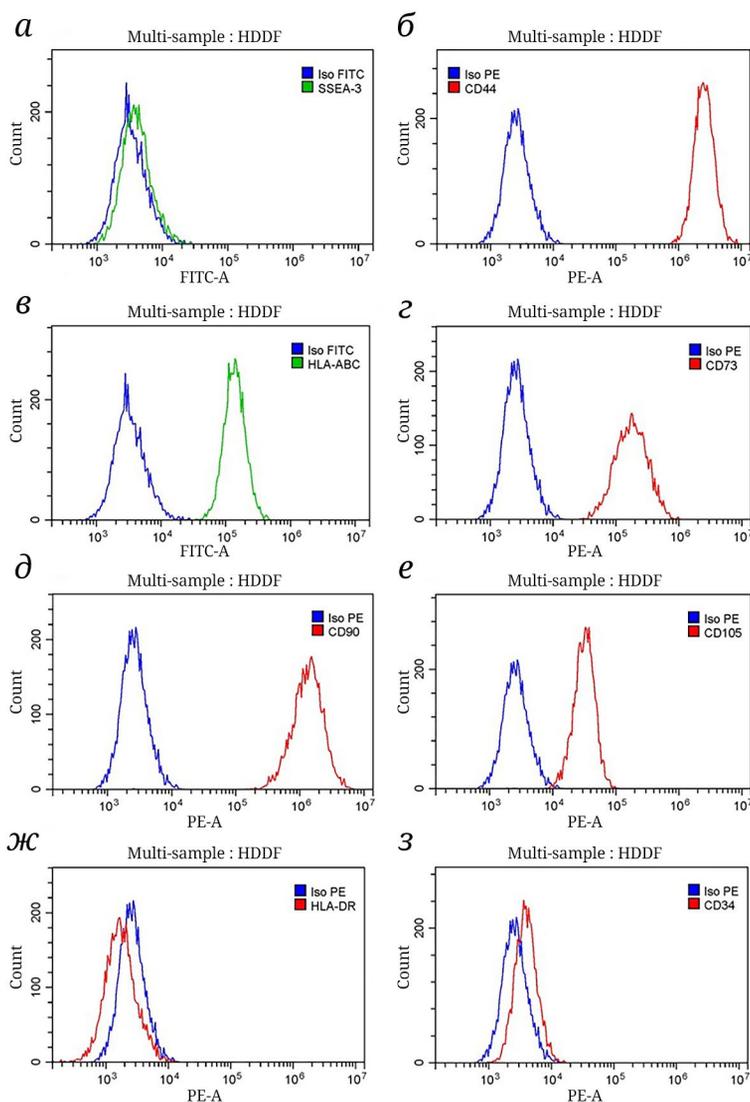


Рис. 5. Фенотипирование клеток линии HDDF при помощи проточной цитофлуориметрии (а–з)

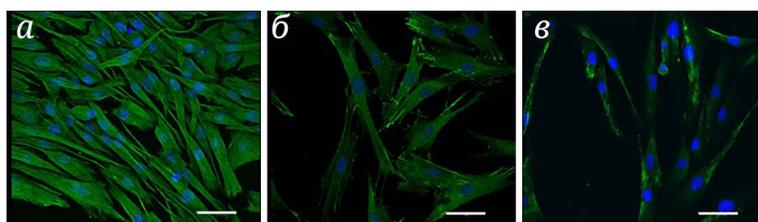


Рис. 6. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на маркеры фибробластов. а – Окрашивание антителами к виментину. б – Окрашивание антителами к α -актину. в – Окрашивание антителами к нестину. Визуализация ядер осуществлялась красителем DAPI. Конфокальная микроскопия, $\times 40$. Масштаб 50 мкм

на канонические маркеры фибробластов, такие как виментин, α -актинин (рис. 6). Также было проведено окрашивание на нестин, являющийся маркером дифференцировки в производные эктодермы. Согласно полученным результатам, подавляющее большинство клеток положительно окрашивалось на все проанализированные маркеры. На микрофотографиях клетки линии HDDF имеют

вытянутую веретенообразную форму, характерную для фибробластов и мезенхимных стволовых клеток.

Далее мы проанализировали способность фибробластов к трансдифференцировке в нейрональном направлении. Для этого был использован протокол на основе микроРНК, транскрипционных факторов и малых молекул, разработанный

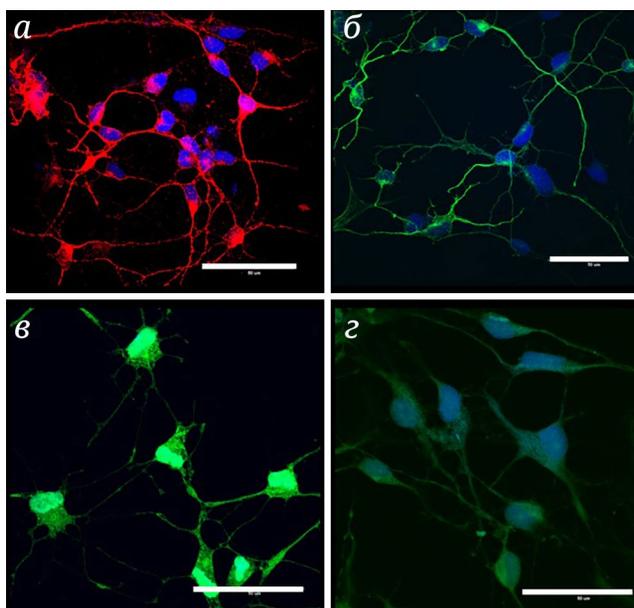


Рис. 7. Микрофотографии индуцированных нейронов стриатума, полученных из фибробластов линии HDDF. *a* – Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру MAP2. *б* – Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру TUJ-1. *в* – Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру GABA. *г* – Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркеру DARPP-32. Конфокальная микроскопия, $\times 60$. Масштаб 50 мкм

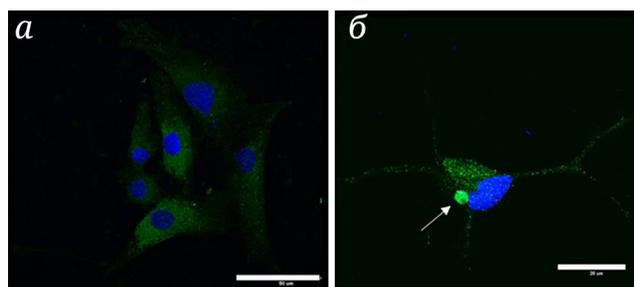


Рис. 8. Визуализация mHTT в фибробластах и индуцированных нейронах линии HDDF. *a* – Иммунофлуоресцентное окрашивание фибробластов антителами к mHTT (клон мЕМ48). Конфокальная микроскопия, $\times 60$. Масштаб 50 мкм. *б* – Иммунофлуоресцентное окрашивание индуцированных нейронов стриатума, полученных из фибробластов линии HDDF, антителами мЕМ48 (вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором Alexa 488), и окрашивание ядер красителем DAPI. Конфокальная микроскопия, $\times 60$. Масштаб 20 мкм

группой A.S. Yoo [21], с некоторыми дополнениями [31]. Фибробласты линии HDDF успешно проходили трансдифференцировку в нейрональном направлении, что подтверждается окрашиванием на маркеры TUJ-1, MAP2, GABA и DARPP-32 (рис. 7, *a* и *б*).

Наконец, мы проанализировали накопление агрегатов мутантного белка mHTT в индуцированных нейронах стриатума, полученных из дермальных фибробластов линии HDDF. На рис. 8, *a* представлены фибробласты, окрашенные антителами мЕМ48 и красителем DAPI (для визуализации ядер). mHTT распределён диффузно по цитоплазме клеток, без формирования агрегатов. В индуцированных нейронах стриатума, полученных из фибробластов линии HDDF, наблюдались агрегаты mHTT в some нейронах и в некоторых

отростках (рис. 8, *б*). Стоит отметить, что доля клеток, содержащих агрегаты, была довольно низкой. В ядрах клеток агрегаты мутантного белка обнаружены не были.

ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении нейродегенеративных заболеваний дистанция между моделированием заболеваний на животных и клиническими испытаниями особенно велика. Моделирование нейропатологий при помощи пациент-специфичных клеточных моделей может заполнить пробел между клиническими испытаниями и исследованиями на модельных организмах. Важную роль в таких исследованиях играют клеточные линии,

полученные из биологического материала пациентов. Изучение молекулярно-клеточных основ нейропатологии с использованием донорского материала от больных, несомненно, имеет свои преимущества, обусловленные учётом вклада генетического и эпигенетического статуса конкретного больного. Более того, всё больше исследователей считает необходимым валидировать модели с патологическими проявлениями заболеваний с использованием как животных, так и пациент-специфичных клеток во избежание артефактов [33, 34]. В связи с этим получение новых клеточных линий из донорского материала больных нейродегенеративными заболеваниями представляется актуальной задачей.

Дермальные фибробласты могут служить перспективными клетками для всестороннего изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Получение биоптата малоинвазивно, практически безопасно для пациента, забор ткани производится с соблюдением асептических норм, полученный материал минимально подвержен контаминации. Фибробласты хорошо переносят культивирование, обладают хорошим пролиферативным потенциалом. Всё сказанное выше обуславливает широкое применение дермальных фибробластов в научно-исследовательской практике, в том числе и при изучении БХ. Различные группы исследователей применяют фибробласты человека – как диплоидные клеточные популяции, полученные от доноров [35], так и иммортализованные клеточные линии [11] – для изучения влияния мНТТ на метаболизм клетки и пролиферативные характеристики. Кроме того, индуцированные нейроны, полученные из фибробластов, успешно используются для изучения патологических проявлений заболевания на клеточном уровне [11, 17–19, 22, 36, 37].

В отечественных биобанках и коллекциях клеточных культур линии фибробластов от пациентов с БХ в настоящий момент не представлены, что затрудняет проведение экспериментальных работ. Паспортизованная клеточная линия HDDF будет помещена в Коллекцию культур клеток позвоночных ИНИЦ РАН и станет доступной для заказа пользователями – именно в этом состояла основная цель проведённых исследований.

В нашей работе представлена характеристика линии HDDF неиммортализованных диплоидных дермальных фибробластов, полученных от пациента с БХ. Показано, что основные характеристики клеточной линии HDDF во многом соответствуют фибробластам от здоровых доноров. Клетки имеют характерную вытянутую веретенообразную форму, которая сохраняется при длительном культивировании. Экспрессия поверхностных маркеров практически полностью сопоставима

со значениями, опубликованными ранее для линии DF1, полученной из кожи век здорового донора соответствующего пола и возраста [38]. В клетках обеих линий также подтверждена экспрессия основных белков, продуцируемых в фибробластах, таких как виментин, нестин, α -актинин. Кариотип клеток линии HDDF не отличался от такового у здоровых клеток. Наши данные показали, что в клетках линии HDDF, так же как и в здоровых фибробластах, мНТТ распределён по всей цитоплазме диффузно. Была опубликована работа, описывающая образование агрегатов мНТТ, связанных с волокнами цитоскелета в фибробластах от пациентов с БХ [39], однако в клетках линии HDDF, как и в другой работе [22], видимых агрегатов не наблюдалось.

В литературе имеются противоречивые данные относительно пролиферативных характеристик фибробластов кожи от пациентов с БХ. В одной из работ показано, что эти клетки демонстрировали более высокую конfluэнтность и большее число удвоений популяции, которое превосходило контрольные значения [40]. Существенной разницы в темпах роста показано не было. Авторы также отмечали, что клетки от пациентов с БХ были меньшего размера и что из одиночных клеток развивались более крупные колонии [40]. В другой работе было отмечено, что клетки от пациентов с БХ вырастали до значительно более высокой конfluэнтности, чем контрольные клетки [41]. Однако в дальнейшем, на большей выборке клеточных линий, авторами не было выявлено существенных различий между клетками БХ и контрольными клетками ни по одному из вышеуказанных параметров. Ещё в одном исследовании авторы отмечали более эффективный рост фибробластов от пациентов с БХ при низкой плотности посева, а также экспоненциальный рост культур после рутинной трипсинизации, скорость которого была выше, чем у контрольных культур, а также способность клеток расти до значительно более высоких плотностей насыщения клеток [42]. Следует отметить, что авторам не удалось показать однозначную корреляцию между скоростью роста клеток от здоровых доноров и от пациентов с БХ, однако авторы отметили повышенную конfluэнтность в 4-х из 7 клеточных линий по сравнению с контролем. Показано, что фибробласты от пациентов с БХ лучше росли на обеднённой среде и лучше адгезировали к поверхности культурального пластика [40].

Наши данные согласуются с ранее опубликованными результатами – клетки линии HDDF характеризуются высокой пролиферативной активностью и сохраняют способность к делению до 43-го пассажа, после чего перестают делиться. Время удвоения для клеток линии HDDF на 7-м

и 20-м пассаже было меньше, чем у ранее описанной контрольной линии [38]. Клетки формируют колонии с эффективностью, соответствующей клеткам от доноров без нейропатологий, что соответствует ранее опубликованным данным [42]. Полученные данные могут указывать на взаимосвязь наличия mHTT с регуляцией клеточного цикла. Известно, что данный белок принимает участие в контроле митоза и регуляции нейрогенеза у млекопитающих [43]. Однако гипотез, объясняющих более высокий пролиферативный потенциал фибробластов от пациентов с БХ, чем у контрольных линий, до сих пор не предложено.

Выраженное репликативное старение, характерное для всех неиммортизированных клеток, наблюдалось на 40-м пассаже, что существенно позднее, чем для здоровых клеток, у которых репликативное старение наблюдается на 25-м пассаже [38]. Наши данные согласуются с ранее описанными наблюдениями, указывающими на более устойчивый к старению фенотип иммортизированных фибробластов от пациентов с БХ по сравнению с контролем [11].

Одно из самых перспективных применений фибробластов новой линии HDDF может заключаться в их использовании при получении индуцированных нейронов. Моделирование нейропатологий на индуцированных нейронах, полученных с помощью технологий репрограммирования, может значительно продвинуться в понимании патогенеза БХ и преодолеть трудности, связанные с поиском эффективных стратегий для лечения. В настоящий момент идёт активное накопление данных о влиянии mHTT непосредственно на нейроны, полученные для конкретных пациентов через нейрональную дифференцировку из iPSC либо с помощью прямого репрограммирования из дермальных фибробластов. Появились данные о транскриптомах, протеомах и секретомах нейрональных клеток, полученных от пациентов с БХ, необходимые для идентификации новых молекулярных мишеней и стратегий по купированию заболевания [17, 24, 25, 44].

Мы также продемонстрировали, что фибробласты линии HDDF могут быть дифференцированы в нейрональном направлении при помощи прямого репрограммирования для получения популяции индуцированных нейронов стриатума. Полученные индуцированные нейроны окрашивались на нейрональные маркеры MAP2, TUJ-1, GABA и DARPP-32, что свидетельствует об успеш-

ной дифференцировке. Мы показали, что в индуцированных нейронах стриатума, полученных из фибробластов новой линии HDDF, формируются агрегаты мутантного белка, что является основным гистопатологическим признаком данной нейропатологии. Полученные нами данные согласуются с ранее опубликованными результатами, свидетельствующими о том, что в индуцированных нейронах стриатума, полученных с помощью прямого репрограммирования, могут быть детектированы агрегаты mHTT [22, 36]. Таким образом, полученная нами клеточная линия HDDF может быть полезна для всестороннего изучения как биологической роли mHTT, так и его токсичности для клеток.

Вклад авторов. Н. Красковская, А. Кольцова, М. Хотин, Н. Михайлова – концепция и руководство работой; Н. Красковская, А. Кольцова, П. Парфенова, А. Шатрова, Н. Ярцева, В. Назаров, Е. Девяткина – проведение экспериментов; Н. Красковская, А. Кольцова, П. Парфенова, А. Шатрова, Н. Ярцева, В. Назаров, Е. Девяткина, М. Хотин, Н. Михайлова – обсуждение результатов исследования; Н. Красковская, А. Кольцова, П. Парфенова – написание текста; А. Шатрова, Н. Михайлова – редактирование текста статьи.

Благодарности. В работе было использовано оборудование ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН.

Финансирование. Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1063 (Н.М.), и грантом РФФИ № 22-75-00106 (Н.К.). Финансовая поддержка распределялась следующим образом: эксперименты и результаты, представленные на рис. 1–6, финансировались за счёт соглашения № 075-15-2021-1063 (Н.М.); эксперименты и результаты, представленные на рис. 7 и 8, финансировались за счёт гранта РФФИ № 22-75-00106 (Н.К.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Получено информированное добровольное согласие донора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roos, R. A. (2010) Huntington's disease: a clinical review, *Orphanet J Rare Dis.*, 5, 40, <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-40>.

2. Monk, R., and Connor, B. (2021) Cell reprogramming to model Huntington's disease: a comprehensive review, *Cells*, **10**, 1565, <https://doi.org/10.3390/cells10071565>.
3. Lopez-Toledo, G., Silva-Lucero, M. D., Herrera-Diaz, J., Garcia, D. E., Arias-Montano, J. A., and Cardenas-Aguayo, M. D. (2022) Patient-derived fibroblasts with presenilin-1 mutations, that model aspects of Alzheimer's disease pathology, constitute a potential object for early diagnosis, *Front. Aging Neurosci.*, **14**, 921573, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.921573>.
4. Xicota, L., Lagarde, J., Eysert, F., Grenier-Boley, B., Rivals, I., Botte, A., Forlani, S., Landron, S., Gautier, C., Gabriel, C., Bottlaender, M., Lambert, J. C., Chami, M., Sarazin, M., and Potier, M. C. (2023) Modifications of the endosomal compartment in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients are associated with cognitive impairment, *Transl. Psychiatry*, **13**, 54, <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02355-z>.
5. Teves, J. M. Y., Bhargava, V., Kirwan, K. R., Corenblum, M. J., Justiniano, R., Wondrak, G. T., Anandhan, A., Flores, A. J., Schipper, D. A., Khalpey, Z., Sligh, J. E., Curiel-Lewandrowski, C., Sherman, S. J., and Madhavan, L. (2017) Parkinson's disease skin fibroblasts display signature alterations in growth, redox homeostasis, mitochondrial function, and autophagy, *Front. Neurosci.*, **11**, 737, <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00737>.
6. Thomas, R., Moloney, E. B., Macbain, Z. K., Hallett, P. J., and Isacson, O. (2021) Fibroblasts from idiopathic Parkinson's disease exhibit deficiency of lysosomal glucocerebrosidase activity associated with reduced levels of the trafficking receptor LIMP2, *Mol. Brain*, **14**, 16, <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00712-3>.
7. Auburger, G., Klinkenberg, M., Drost, J., Marcus, K., Morales-Gordo, B., Kunz, W. S., Brandt, U., Broccoli, V., Reichmann, H., Gispert, S., and Jendrach, M. (2012) Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease, *Mol. Neurobiol.*, **46**, 20-27, <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8245-1>.
8. Gerou, M., Hall, B., Woof, R., Allsop, J., Kolb, S. J., Meyer, K., Shaw, P. J., and Allen, S. P. (2021) Amyotrophic lateral sclerosis alters the metabolic aging profile in patient derived fibroblasts, *Neurobiol. Aging*, **105**, 64-77, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.04.013>.
9. Konrad, C., Kawamata, H., Bredvik, K. G., Arreguin, A. J., Cajamarca, S. A., Hupf, J. C., Ravits, J. M., Miller, T. M., Maragakis, N. J., Hales, C. M., Glass, J. D., Gross, S., Mitsumoto, H., and Manfredi, G. (2017) Fibroblast bioenergetics to classify amyotrophic lateral sclerosis patients, *Mol. Neurodegener.*, **12**, 76, <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0217-5>.
10. Rubio, M. A., Herrando-Grabulosa, M., Velasco, R., Blasco, I., Povedano, M., and Navarro, X. (2022) TDP-43 cytoplasmic translocation in the skin fibroblasts of ALS patients, *Cells*, **11**, 209, <https://doi.org/10.3390/cells11020209>.
11. Hung, C. L., Maiuri, T., Bowie, L. E., Gotesman, R., Son, S., Falcone, M., Giordano, J. V., Gillis, T., Mattis, V., Lau, T., Kwan, V., Wheeler, V., Schertzer, J., Singh, K., and Truant, R. (2018) A patient-derived cellular model for Huntington's disease reveals phenotypes at clinically relevant CAG lengths, *Mol. Biol. Cell*, **29**, 2809-2820, <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0590>.
12. Fernandez-Estevez, M. A., Casarejos, M. J., Lopez Sendon, J., Garcia Caldentey, J., Ruiz, C., Gomez, A., Perucho, J., de Yebenes, J. G., and Mena, M. A. (2014) Trehalose reverses cell malfunction in fibroblasts from normal and Huntington's disease patients caused by proteasome inhibition, *PLoS One*, **9**, e90202, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090202>.
13. Marchina, E., Misasi, S., Bozzato, A., Ferraboli, S., Agosti, C., Rozzini, L., Borsani, G., Barlati, S., and Padovani, A. (2014) Gene expression profile in fibroblasts of Huntington's disease patients and controls, *J. Neurol. Sci.*, **337**, 42-46, <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.11.014>.
14. Vanisova, M., Stufkova, H., Kohoutova, M., Rakosnikova, T., Krizova, J., Klempir, J., Rysankova, I., Roth, J., Zeman, J., and Hansikova, H. (2022) Mitochondrial organization and structure are compromised in fibroblasts from patients with Huntington's disease, *Ultrastruct. Pathol.*, **46**, 462-475, <https://doi.org/10.1080/01913123.2022.2100951>.
15. Reddy, P. H., Mao, P., and Manczak, M. (2009) Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease, *Brain Res. Rev.*, **61**, 33-48, <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.04.001>.
16. Aladdin, A., Kiraly, R., Boto, P., Regdon, Z., and Tar, K. (2019) Juvenile Huntington's disease skin fibroblasts respond with elevated parkin level and increased proteasome activity as a potential mechanism to counterbalance the pathological consequences of mutant huntingtin protein, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5338, <https://doi.org/10.3390/ijms20215338>.
17. Nekrasov, E. D., Vigont, V. A., Klyushnikov, S. A., Lebedeva, O. S., Vassina, E. M., Bogomazova, A. N., Chestkov, I. V., Semashko, T. A., Kiseleva, E., Suldina, L. A., Bobrovsky, P. A., Zimina, O. A., Ryazantseva, M. A., Skopin, A. Y., Illarioshkin, S. N., Kaznacheyeva, E. V., Lagarkova, M. A., and Kiselev, S. L. (2016) Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons, *Mol. Neurodegener.*, **11**, 27, <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0092-5>.
18. Vera, E., Bosco, N., and Studer, L. (2016) Generating late-onset human iPSC-based disease models by inducing neuronal age-related phenotypes through telomerase manipulation, *Cell Rep.*, **17**, 1184-1192, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.062>.

19. Vigont, V., Nekrasov, E., Shalygin, A., Gusev, K., Klushnikov, S., Illarioshkin, S., Lagarkova, M., Kiselev, S. L., and Kaznacheyeva, E. (2018) Patient-specific iPSC-based models of Huntington's disease as a tool to study store-operated calcium entry drug targeting, *Front. Pharmacol.*, **9**, 696, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00696>.
20. Piechota, M., Latoszek, E., Liszewska, E., Hansikova, H., Klempir, J., Muhlback, A., Landwehrmeyer, G. B., Kuznicki, J., and Czeredys, M. (2023) Generation of two human iPSC lines from dermal fibroblasts of adult- and juvenile-onset Huntington's disease patients and two healthy donors, *Stem Cell Res.*, **71**, 103194, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2023.103194>.
21. Victor, M. B., Richner, M., Hermansteyne, T. O., Ransdell, J. L., Sobieski, C., Deng, P. Y., Klyachko, V. A., Nerbonne, J. M., and Yoo, A. S. (2014) Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts, *Neuron*, **84**, 311-323, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.016>.
22. Victor, M. B., Richner, M., Olsen, H. E., Lee, S. W., Monteys, A. M., Ma, C., Huh, C. J., Zhang, B., Davidson, B. L., Yang, X. W., and Yoo, A. S. (2018) Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes, *Nat. Neurosci.*, **21**, 341-352, <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0075-7>.
23. Oh, Y. M., Lee, S. W., Kim, W. K., Chen, S., Church, V. A., Cates, K., Li, T., Zhang, B., Dolle, R. E., Dahiya, S., Pak, S. C., Silverman, G. A., Perlmutter, D. H., and Yoo, A. S. (2022) Age-related Huntington's disease progression modeled in directly reprogrammed patient-derived striatal neurons highlights impaired autophagy, *Nat. Neurosci.*, **25**, 1420-1433, <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01185-4>.
24. Zhang, N., Bailus, B. J., Ring, K. L., and Ellerby, L. M. (2016) iPSC-based drug screening for Huntington's disease, *Brain Res.*, **1638**, 42-56, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.020>.
25. Eddings, C. R., Arbez, N., Akimov, S., Geva, M., Hayden, M. R., and Ross, C. A. (2019) Pridopidine protects neurons from mutant-huntingtin toxicity via the sigma-1 receptor, *Neurobiol. Dis.*, **129**, 118-129, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.05.009>.
26. Choi, K. A., Hwang, I., Park, H. S., Oh, S. I., Kang, S., and Hong, S. (2014) Stem cell therapy and cellular engineering for treatment of neuronal dysfunction in Huntington's disease, *Biotechnol. J.*, **9**, 882-894, <https://doi.org/10.1002/biot.201300560>.
27. Chen, T. R. (1977) *In situ* detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain, *Exp. Cell Res.*, **104**, 255-262, [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90089-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90089-1).
28. ATCC Collection (1985) *ATCC quality control methods for cell lines*, Rockville, Md.
29. Седова Г. П. (2008) Количественные аспекты злокачественного роста, *Математическая морфология*, **7**.
30. Ozkinay, C., and Mitelman, F. (1979) A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes, *Hereditas*, **90**, 1-4, <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1979.tb01287.x>.
31. Kraskovskaya, N., Bolshakova, A., Khotin, M., Bezprozvanny, I., and Mikhailova, N. (2023) Protocol Optimization for Direct Reprogramming of Primary Human Fibroblast into Induced Striatal Neurons, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, <https://doi.org/10.3390/ijms24076799>.
32. Назаров В. Д., Лапин С. В., Гавриченко А. В., Хуторов Д. В., Лобачевская Т. В., Хальчицкий С. Е., Брачунов С. П., Красаков И. В., Виссарионов С. В., Баиндурашвили А. Г., Эмануэль В. Л., Тотолян А. А. (2017) Выявление экспансии тринуклеотидных повторов при болезни Гентингтона, *Медицинская генетика*, **3**, 24-29.
33. Mustaly-Kalimi, S., Gallegos, W., Marr, R. A., Gilman-Sachs, A., Peterson, D. A., Sekler, I., and Stutzmann, G. E. (2022) Protein mishandling and impaired lysosomal proteolysis generated through calcium dysregulation in Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2211999119, <https://doi.org/10.1073/pnas.2211999119>.
34. Ayabe, T., Takahashi, C., Ohya, R., and Ano, Y. (2022) beta-Lactolin improves mitochondrial function in Aβeta-treated mouse hippocampal neuronal cell line and a human iPSC-derived neuronal cell model of Alzheimer's disease, *FASEB J.*, **36**, e22277, <https://doi.org/10.1096/fj.202101366RR>.
35. Brandstaetter, H., Kruppa, A. J., and Buss, F. (2014) Huntingtin is required for ER-to-Golgi transport and for secretory vesicle fusion at the plasma membrane, *Dis. Model Mech.*, **7**, 1335-1340, <https://doi.org/10.1242/dmm.017368>.
36. Liu, Y., Xue, Y., Ridley, S., Zhang, D., Rezvani, K., Fu, X. D., and Wang, H. (2014) Direct reprogramming of Huntington's disease patient fibroblasts into neuron-like cells leads to abnormal neurite outgrowth, increased cell death, and aggregate formation, *PLoS One*, **9**, e109621, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109621>.
37. Huntington's disease Consortium (2020) Bioenergetic deficits in Huntington's disease iPSC-derived neural cells and rescue with glycolytic metabolites, *Hum. Mol. Genet.*, **29**, 1757-1771, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy430>.
38. Крылова Т. А., Мусорина А. С., Зенин В. В., Кольцова А. М., Кропачева И. В., Турилова В. И., Яковлева Т. К., Полянская Г. Г. (2016) Получение и характеристика неиммortalизованных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста, *Цитология*, **58**, 850-864.

39. Pierzynowska, K., Gaffke, L., Cyske, Z., and Wegrzyn, G. (2019) Genistein induces degradation of mutant huntingtin in fibroblasts from Huntington's disease patients, *Metab. Brain Dis.*, **34**, 715-720, <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00405-4>.
40. Archer, F. J., and Mancall, E. L. (1983) Cultured fibroblasts in Huntington's disease. II. Effects of glucosamine, *Arch. Neurol.*, **40**, 24-27, <https://doi.org/10.1001/archneur.1983.04050010044010>.
41. Barkley, D. S., Hardiwidjaja, S., and Menkes, J. H. (1977) Abnormalities in growth of skin fibroblasts of patients with Huntington's disease, *Ann. Neurol.*, **1**, 426-430, <https://doi.org/10.1002/ana.410010505>.
42. Scudiero, D. A., Meyer, S. A., Clatterbuck, B. E., Tarone, R. E., and Robbins, J. H. (1981) Hypersensitivity to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in fibroblasts from patients with Huntington disease, familial dysautonomia, and other primary neuronal degenerations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6451-6455, <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6451>.
43. Godin, J. D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B. C., Dietrich, P., Volvert, M. L., Guillemot, F., Dragatsis, I., Bellaïche, Y., Saudou, F., Nguyen, L., and Humbert, S. (2010) Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis, *Neuron*, **67**, 392-406, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.027>.
44. Garcia, V. J., Rushton, D. J., Tom, C. M., Allen, N. D., Kemp, P. J., Svendsen, C. N., and Mattis, V. B. (2019) Huntington's disease patient-derived astrocytes display electrophysiological impairments and reduced neuronal support, *Front. Neurosci.*, **13**, 669, <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00669>.

DERMAL FIBROBLAST LINES FROM A PATIENT WITH HUNTINGTON'S DISEASE AS A PROMISING MODEL FOR STUDYING THE PATHOGENESIS OF THE DISEASE: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION

**N. Kraskovskaya^{1*}, A. Koltsova¹, P. Parfenova¹, A. Shatrova¹, N. Yartseva¹,
V. Nazarov², E. Devyatkina², M. Khotin¹, and N. Mikhailova¹**

¹ *Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences,
194064 St. Petersburg, Russia; e-mail: ninakraskovskaya@gmail.com*

² *Pavlov First St. Petersburg State Medical University, 197022 St. Petersburg, Russia*

Huntington's disease (HD) is an inherited, incurable disease caused by a mutation and expansion of CAG repeats in the *HTT* gene encoding the huntingtin protein (mHTT). Despite numerous studies conducted on various cellular and animal models, specific mechanisms explaining the biological role of mHTT and its toxicity to striatal neurons have not yet been established, and effective therapy for patients has not been developed. We obtained and characterized a new line of dermal fibroblasts HDDF (Huntington Disease Dermal Fibroblasts) from a patient with a confirmed diagnosis of HD. The growth characteristics of the HDDF line, staining for canonical markers, karyotyping and cell phenotyping were performed. Direct differentiation of fibroblasts from the resulting line into induced striatal neurons was carried out. The new fibroblast line can be used as a cell model to study the biological role of mHTT and various manifestations of HD pathogenesis both in fibroblasts themselves and in induced neuronal cells obtained using reprogramming methods.

Keywords: skin fibroblasts, Huntington's disease, CAG repeats, huntingtin, polyglutamine, transdifferentiation

СОДЕРЖАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ КАРОТИНОИДОВ В КЛЕТКАХ КРИОТОЛЕРАНТНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Chloromonas reticulata*

© 2024 О.В. Дымова*, В.С. Паршуков, И.В. Новаковская, Е.Н. Патова

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 167982 Сыктывкар, Республика Коми, Россия;
электронная почта: dymovao@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 30.09.2023

После доработки 30.05.2024

Принята к публикации 03.06.2024

Снежные (криотолерантные) водоросли часто образуют красные (розовые) пятна в горных экосистемах на снежниках по всему миру, однако об их физиологии и химическом составе мало известно. Нами изучен состав пигментов и содержание каротиноидов в зеленых (вегетативных) клетках *Chloromonas reticulata*, выращенных в лабораторных условиях, и в клетках, которые были собраны с поверхности красного снега на Приполярном Урале. В составе фотосинтетических пигментов среди каротиноидов присутствовали неоксантин, виолаксантин, антераксантин, зеаксантин, лютеин и β -каротин. Также был обнаружен кетокаротиноид астаксантин, обладающий способностью к высокой биологической активности. Установлено, что культивирование водоросли *C. reticulata* при низкой положительной температуре (6 °C) и умеренной освещенности 250 мкмоль квантов/(м²·с) способствовало накоплению всех идентифицированных каротиноидов, включая экстрапластидный астаксантин. В дополнение к пигментам в клетках водоросли накапливались жирные кислоты. Полученные данные дополняют эколого-физиологическую характеристику вида и позволяют рассматривать изученную микроводоросль как потенциально перспективный вид для получения каротиноидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Chloromonas reticulata*, зеленая микроводоросль, каротиноиды, астаксантин, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DOI: 10.31857/S0320972524070052 EDN: WNIBLN

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли – большая и разнообразная группа микроорганизмов, обитающих в самых разных местообитаниях, включая водоемы, почвы, каменистые субстраты и ледники [1, 2]. В природных экосистемах водоросли играют ключевую роль в качестве основных продуцентов органических веществ [3] и все больше привлекают внимание научного сообщества как возобновляемый источник биотоплива, водорода, омега-3 жирных кислот и других полезных соединений [4–7].

Фотосинтетические микроорганизмы очень эффективны в преобразовании солнечного света и обладают необыкновенной способностью адаптироваться к росту в различных условиях среды. Высокая фотосинтетическая активность микро-

водорослей вносит значительный вклад в обеспечение основных условий для жизни на нашей планете [8, 9]. Фотосинтез и направленность метаболизма и, следовательно, биохимический состав клеток сильно зависят от температуры и условий освещенности. По имеющимся в литературе данным, водоросли различаются по физиологическим и биохимическим реакциям на температуру, интенсивности и качеству света, а также источникам минерального питания [10–12].

Водоросли содержат различные пигменты, включая каротиноиды (Кар). Из 200 обнаруженных в водорослях природных Кар почти 30 вовлечены в процессы фотосинтеза [13]. Микроводоросли являются источниками таких Кар, как β -каротин (β -кар) и вторичные Кар, например, астаксантин (Аст). Так, β -кар впервые был получен про-

Принятые сокращения: Аст – астаксантин; Кар – каротиноиды; β -кар – β -каротин; ЖК – жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ФАР – фотосинтетически активная радиация.

* Адресат для корреспонденции.

мышленным путем из микроводоросли *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco [4]. Yang et al. [14] исследовали антиоксидантные свойства астаксантина (каротиноида красного цвета), получаемого из зеленой водоросли *Haematococcus pluvialis* Flotow. Было показано, что добавление богатого Аст экстракта в рацион мышей улучшает уровень холестерина и липидный обмен, а также смягчает прогрессирование атеросклероза. Водоросль *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová et Eliás также производит несколько вторичных кетокаротиноидов со значительной долей Аст и кантаксантина [15]. *Asterarcys quadricellularis* (Behre) E. Hegewald et A.W.F. Schmidt может продуцировать до 35 мкг Кар (β -кар, лютеин, Аст и кантаксантин) на мг сухой массы [16]. Согласно данным Chekanov et al. [17], в клетках водорослей *Bracteacoccus aggregatus* Tereg и *Coelastrella aeroterrestica* Tschaiikner, Gärtner & Kofler преобладают такие каротиноиды, как Аст и β -кар.

В условиях высокой инсоляции и низких температур, которые наблюдаются на скоплениях снега и льда в высокогорьях, микроводоросли способны накапливать вторичные Кар, не участвующие в фотосинтезе, физиологическое значение которых изучено недостаточно. Полагают, что эти соединения могут выполнять ряд функций и в первую очередь защищать клетки микроводорослей от окислительного стресса, подавляя повреждение синглетным кислородом [18, 19]. Большинство из синтезируемых такими водорослями Кар являются высокоценными биологически активными соединениями, проявляющими свойства иммуностимуляторов, УФ- и радиопротекторов, антиканцерогенов, регуляторов деятельности нервной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем человека и животных [20–22]. В связи с этим проводятся активные исследования по поиску среди криотолерантных микроводорослей видов, перспективных для использования в биотехнологии. Особое внимание исследователей направлено на поиск продуцентов астаксантина (3,3'-дигидрокси-4,4'-диоксо- β -каротин) – красного пигмента из группы кислородсодержащих вторичных Кар. Наличие хромофорных групп (сопряженных двойных связей и хиноидных группировок в кольцах) придает пигменту красный цвет. По антиоксидантной активности Аст на порядок превышает в системах *in vivo* β -кар и α -токоферол [23]. Самым богатым источником природного Аст считается зеленая микроводоросль *H. pluvialis*, накапливающая до 3–5% от сухой массы при действии неблагоприятных условий окружающей среды [24]. Водоросли, обитающие в полярных и горных регионах, также способны синтезировать Аст [1, 18, 25–29]. Благодаря накоплению этого пигмента они при массовом развитии окрашивают поверх-

ность ледников и снежников в красный цвет. Такое явление получило название «красный снег» и встречается по всему миру [18, 25–30], включая северные регионы Урала [31]. В высокогорьях Урала наиболее часто это явление наблюдается в летний период. Нами неоднократно из проб окрашенного в красный цвет снега при культивировании в лабораторных условиях был выделен штамм зеленой водоросли *Chloromonas reticulata* (Goroschankin) Gobi [32].

Целью данной работы было изучить пигментный состав и содержание индивидуальных каротиноидов в клетках микроводоросли *C. reticulata*, выделенной из «красного» снега снежников Приполярного Урала. Полученные результаты позволят оценить способность клеток микроводорослей адаптироваться к изменениям условий обитания и выявить способы защиты фотосинтетического аппарата от стрессовых воздействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия культивирования микроводоросли. Использован штамм *C. reticulata* – одноклеточная, одноядерная водоросль с эллипсоидными или яйцевидными клетками длиной 11–20 мкм и шириной 5–15 мкм, чашевидным хлоропластом с перфорациями, без пиреноида (рис. 1, а–в) из коллекции живых культур водорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН (СΥΚΟΑ Ch-054-11). Водоросль была выделена в июле 2010 года из пробы, собранной с поверхности снега, окрашенного в красный цвет, на Приполярном Урале (65°13'45.5"с.ш., 60°13'19.4"в.д.). Пробы отбирали из верхнего слоя снега на глубине до 5 мм и помещали в стерильные пластиковые пробирки на 15 мл («Greiner Bio-One», Австрия). У штамма изучены морфологические, эколого-географические и молекулярно-генетические особенности [32]. Нуклеотидные последовательности представлены в GenBank под номерами KF361494 (18S рибосомальной РНК, кодируемой ядром) и MF033356 (ITS1-5.8S-SITS2 рРНК).

Эксперимент по изучению состава и содержания Кар в клетках микроводоросли *C. reticulata* при разных условиях культивирования состоял из трех этапов. На первом этапе наращивали биомассу водоросли. Для этого брали 1 мл культуры *C. reticulata* с поглощением при 680 нм, равным 0,4, и 100 мл питательной среды BG 11 (рН = 7,1) [33, 34]. Культивирование водоросли проводили в 250-мл флаконах («Greiner Bio-One») в течение двух недель на шейкере («Elmi», Латвия) со скоростью 150 об./мин при плотности потока фотосинтетически активной радиации (ФАР) 45 мкмоль/(м²·с) и температуре 22 °С. Соотноше-

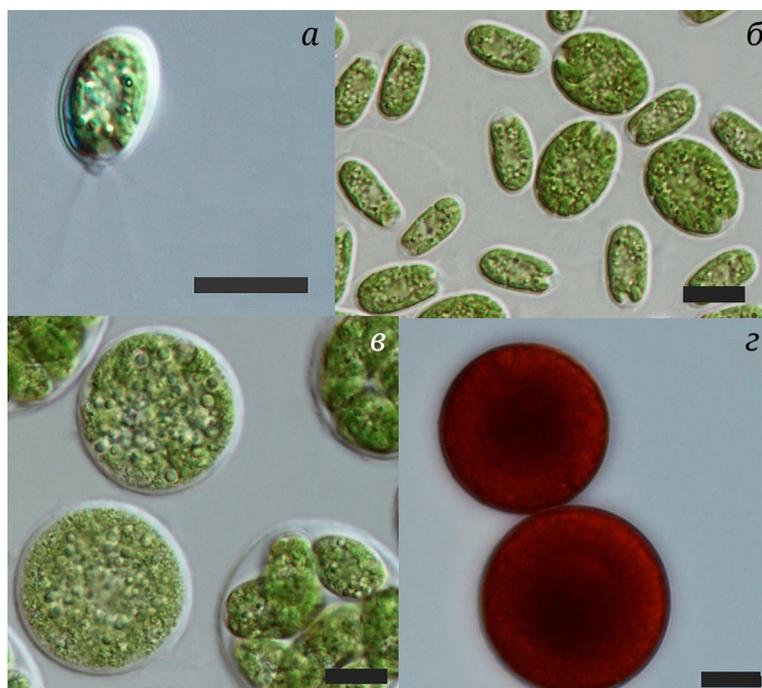


Рис. 1. Клетки водоросли *Chloromonas reticulata* и клетки, собранные с поверхности окрашенного снега на Приполярном Урале: *а* – подвижная клетка *C. reticulata* со жгутиками, масштабная линейка – 10 мкм; *б* – вегетативные клетки *C. reticulata*, масштабная линейка – 10 мкм; *в* – старые клетки *C. reticulata*, масштабная линейка – 10 мкм; *г* – красные клетки, собранные со снежной поверхности, масштабная линейка – 10 мкм. Фото И.В. Новаковской

ние день/ночь – 12/12 ч. По достижении поглощения, равного 0,4 при 680 нм, проводили отбор проб культуры для анализа пигментов в качестве контроля.

На втором этапе культуру, выращенную на первом этапе, охлаждали до +6 °С и продолжали культивировать при постоянном барботировании среды отфильтрованным атмосферным воздухом с помощью компрессора ОХУBoost APR-150 («Aquael», Польша) в режиме 2,0 литр/мин при плотности потока ФАР 50 мкмоль/(м²·с). Объем питательной среды в культуре перед вторым этапом эксперимента доводили до 100 мл. Инкубацию в таких условиях проводили в течение 4 суток, после этого отбирали пробы.

Известно, что для поддержания выработки Аст требуется свет, хотя он также может накапливаться в темноте, но с меньшей скоростью [25, 35]. Поэтому на третьем этапе эксперимента клетки водоросли продолжали культивировать в 100 мл среды при более высокой плотности потока ФАР – 250 мкмоль/(м²·с) и температуре 6 °С в течение 10 суток, после чего вновь отбирали пробы. Экспериментальная установка (рис. 2) состояла из компрессора (1), трубки (2), колбы с водой (3), колбы с микроводорослями (4), источников света (5): светодиодные лампы LED-A60-15W/SPSB/E27/CL PLP30WH 50 мкмоль/(м²·с) и LED-A60-15W/SPSB/E27/CL PLP30GR (Китай) 250 мкмоль/(м²·с). На всех

трех этапах эксперимента использовали одну и ту же культуру водоросли, но во избежание стресса клеток от нехватки основных минеральных элементов перед каждым этапом доводили количество питательной среды в колбе до 100 мл.

Дополнительно был проведен анализ состава Кар в «красных» клетках (рис. 1, г), собранных с поверхности «окрашенного» снега на Приполярном Урале (в месте отбора пробы, из которой была выделена *C. reticulata*). Следует отметить, что в современной альгологии, изучающей водоросли снега и льда, существует проблема выделения живых культур из покоящихся клеток, и для некоторых недавно описанных видов (например, виды рода *Sanguina*) неизвестны вегетативные стадии [36].

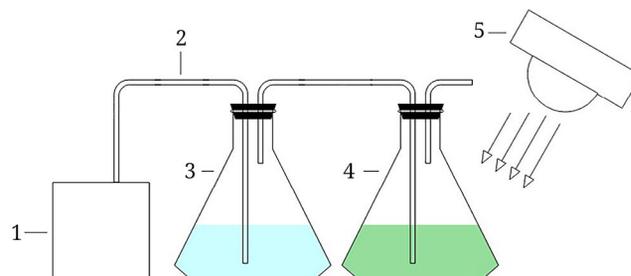


Рис. 2. Схема установки. 1 – компрессор; 2 – трубка соединительная; 3 – колба с водой; 4 – колба с микроводорослями; 5 – источники света: лампы LED-A60-15W/SPSB/E27/CL PLP30WH 50 мкмоль/(м²·с) и LED-A60-15W/SPSB/E27/CL PLP30GR (Китай) 250 мкмоль/(м²·с)

При отборе проба была заморожена в холодильной установке при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и в замороженном виде транспортирована в лабораторию для дальнейшего анализа.

Анализ состава каротиноидов методом ВЭЖХ. До идентификации состава Кар зафиксированные пробы хранили в жидком азоте при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Экстракцию замороженного осадка клеточной суспензионной культуры проводили с использованием диметилсульфоксида, осадок осаждали центрифугированием. Супернатант, содержащий экстракт хлорофиллов и Кар из клеток микроводорослей, инкубировали в течение 15 мин при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ и непрерывном перемешивании. Подготовленный таким образом экстракт анализировали методом ВЭЖХ с обращенной фазой в соответствии с модифицированным методом [37] на жидкостном хроматографе («Knauer», Германия). Хроматографическая система включала: детектор Knauer Smartline UV Detector 2500, насос Knauer Smartline Pump 1000. Для разделения использовали хроматографическую колонку $4,0 \times 250\text{ мм}$ с сорбентом Диасфер-110-C18NT («БиоХимМак», Россия) с размером пор 5 мкм . Пигменты элюировали при градиентном режиме в течение 38 мин в системе растворителей А (ацетонитрил/метанол/вода в соотношении 75/12/4) и В (метанол/этилацетат в соотношении 68/32) со скоростью потока элюента по программе градиента: 0 мин – элюент А ($1\text{ см}^3/\text{мин}$); 16 мин – элюент А ($2\text{ см}^3/\text{мин}$); 21 мин – элюент В ($2\text{ см}^3/\text{мин}$); 28 мин – элюент А ($2\text{ см}^3/\text{мин}$). Температура колонки составляла $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Пигменты детектировали путем регистрации поглощения элюата при 440 нм . Для расчета количественного состава пигментов использована абсолютная градуировка (метод внешнего стандарта). Кар идентифицировали, используя стандарты и времена удержания. Прием и обработку хроматографических данных выполняли с помощью компьютерной программы «EuroChrom for Windows». Стандарты чистых веществ (фотосинтетических пигментов) были получены от фирм «Sigma» и «Fluka» (США).

Анализ состава жирных кислот (ЖК) выполнен методом газовой хроматографии в ЦКП «Хроматография» ИБ Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар). ЖК определяли в виде их метиловых эфиров после проведения кислотного метанолиза липидов с последующей этерификацией выделившихся кислот по следующей методике: в стеклянную виалу (15 см^3) с анализируемым образцом ($100\text{--}200\text{ мг}$) вносили 5 см^3 метанола и $0,7\text{ см}^3$ соляной кислоты (36,5%). Вials герметично закрывали винтовыми крышками и выдерживали в термостате в течение 1,5 ч при температуре $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего охлаждали до комнатной температуры. После охлаждения в каждую виалу добавляли

5 см^3 дистиллированной воды, $0,5\text{ см}^3$ толуола, содержащего внутренний стандарт ($0,1\text{ мг}/\text{см}^3$ гептакозана) и экстрагировали в течение 5 мин. Полученный экстракт анализировали на газовом хроматографе «Кристалл-5000.2» с пламенно-ионизационным детектором («Хроматэк», Россия), используя кварцевую капиллярную колонку HP-FFAP («Agilent», США) $30\text{ м} \times 0,32\text{ мм} \times 0,25\text{ мкм}$; газ-носитель – гелий (ос.ч.); давление газа-носителя на входе колонки – 60 кПа ; программирование температуры колонки: $110\text{ }^{\circ}\text{C} - 5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин} - 260\text{ }^{\circ}\text{C}$; скорость потока водорода – $20\text{ см}^3/\text{мин}$; скорость потока воздуха – $200\text{ см}^3/\text{мин}$; деление потока – $1/30$. Температура детектора $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, испарителя – $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. Количественное определение индивидуальных кислот проводили методом внутреннего стандарта с использованием смеси FAME Mix («Supelco», США), содержащей 26 метиловых эфиров ЖК. Погрешность измерения содержания кислот для достоверной вероятности $P = 0,95$ составляла $15\text{--}20\%$.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполнены с трехкратной биологической и двукратной аналитической повторами. Статистическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 10 («Statsoft Inc.», США) с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Р-Величину рассчитывали при заданном уровне значимости $\alpha = 0,05$. Результаты представляют среднее значение (M) \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что фотосинтетический аппарат зеленых одноклеточных водорослей аналогичен таковому высших растений. Хроматографическое разделение экстрактов зеленых клеток *C. reticulata* (рис. 1, б), выращенных в лабораторных условиях, и красных (покоящихся) клеток (рис. 1, г), собранных с поверхности «цветущего» снега на Приполярном Урале, показало, что в составе фотосинтетических Кар были обнаружены неоксантин, виолаксантин, антраксантин, лютеин, β -каротин и следовые количества зеаксантина (табл. 1; рис. 3, а). При этом β -кар преобладал и в покоящихся клетках (до 90%), и в зеленых клетках *C. reticulata* (до 38%). Пигментный состав клеток *C. reticulata* сходен с другими зелеными водорослями [38–40].

В составе вторичных (нефотосинтетических) Кар был обнаружен астаксантин – пигмент, ответственный за красный цвет (рис. 3, б). Известно, что в природе АСТ может присутствовать в клетках не только в свободной форме, но и в форме ди- и моноэфиров (в водорослях – до 70% в виде

Таблица 1. Содержание индивидуальных каротиноидов в зеленых (I) и красных (II) клетках *Chloromonas reticulata*, мкг/г сухой массы ($n = 4-6$)

Клетки	Пигменты							
	Нео	Вио	Ант	Лют	Зеа	β-кар	Аст	Сумма Кар
I	223 ± 15 ^a	168 ± 10 ^a	48 ± 3 ^a	210 ± 37 ^a	39 ± 9 ^a	450 ± 132 ^a	37 ± 5 ^a	1174 ± 145 ^a
II	9 ± 3 ^b	9 ± 3 ^b	7 ± 1 ^b	60 ± 9 ^b	2 ± 1 ^b	840 ± 129 ^b	22 ± 7 ^b	946 ± 148 ^b

Примечание. Обозначения: Нео – неоксантин; Вио – виолаксантин; Ант – антраксантин; Лют – лютеин; Зеа – зеаксантин; β-кар – β-каротин; Аст – астаксантин; Кар – каротиноиды; I – зеленые клетки *C. reticulata*, выращенные в лабораторных условиях; II – красные (покоящиеся) клетки, собранные с поверхности «цветущего» снега на Приполярном Урале.

^{a,b} Достоверность изменений параметра между вариантами клеток I и II (ANOVA, тест Дункана, $\alpha = 0,05$).

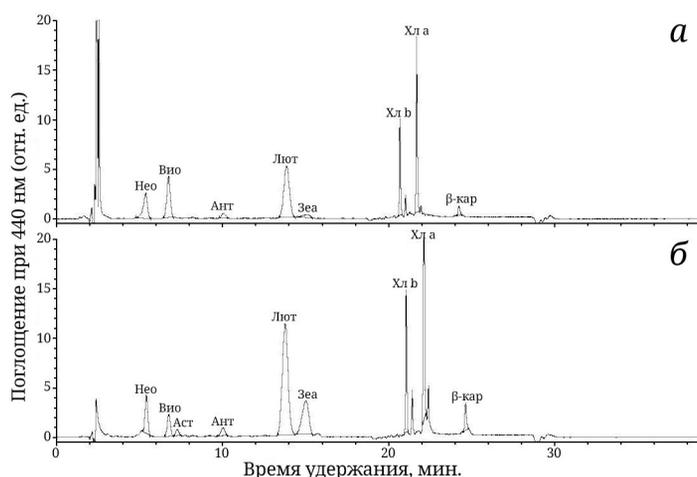


Рис. 3. Профиль элюции при ВЭЖХ-разделении пигментов, экстрагированных из вегетативных (зеленых) клеток *Chloromonas reticulata*. Варианты: а – низкая температура и свет 50 мкмоль/(м²·с); б – низкая температура и свет 250 мкмоль/(м²·с). Пигменты: Нео – неоксантин; Вио – виолаксантин; Аст – астаксантин; Ант – антраксантин; Лют – лютеин; Зеа – зеаксантин; β-кар – β-каротин; Хл а – хлорофилл а; Хл б – хлорофилл б. Детекция осуществлялась путем регистрации поглощения подвижной фазы при 440 нм

моноэфира) [41]. Большое количество свободного и этерифицированного АСТ находится в цитоплазматических липидных глобулах [25, 42]. По мнению Ben-Amotz et al. [43], β-кар, который накапливался в липидных глобулах, также можно рассматривать как вторичный Кар. Преобладание β-кар в красных клетках согласуется с данными других авторов [43–45] о накоплении этого пигмента при воздействии стрессовых условий на микроводоросли.

Пик вторичных Кар (Аст) был идентифицирован при удержании на 7–8 мин прохождения хроматограммы (рис. 3, б; рис. 4). Присутствие Аст было обнаружено как в покоящихся красных, так и в зеленых клетках *C. reticulata* (табл. 1). Наличие в красных клетках большого количества β-кар указывает на способность этого каротиноида накапливаться в качестве предшественника синтеза Аст в природных условиях. Так, достаточно высокое для продуцентов Аст содержание β-кар было отмечено у *Scenedesmus rubescens*, что, по мнению Челебиевой [46], является характерной

чертой стресс-реакции некоторых видов микроводорослей.

При пониженной температуре на фоне умеренной освещенности в клетках *C. reticulata* отме-

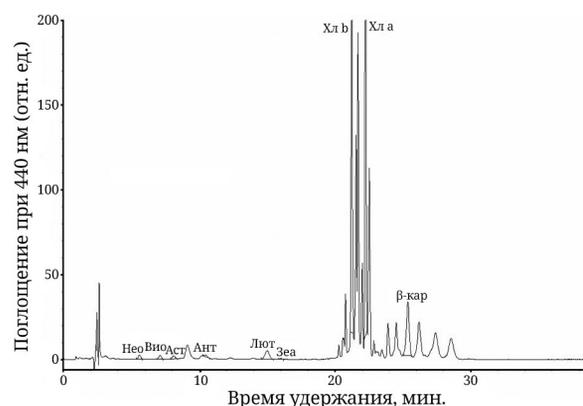


Рис. 4. Профиль элюции при ВЭЖХ-разделении пигментов, экстрагированных из покоящихся (красных) клеток *Chloromonas reticulata*. Остальные обозначения, как на рис. 3

Таблица 2. Относительное содержание каротиноидов (%) в клетках *Chloromonas reticulata* при 22 °C и 45 мкмоль/(м²·с) – контроль; при 6 °C и 50 мкмоль/(м²·с) – опыт 1; при 6 °C и 250 мкмоль/(м²·с) – опыт 2

Вариант	Нео	Вио	Аст	Ант	Лют	Зеа	β-кар	DEPS
Контроль	8,5 ± 2,8 ^a	13,8 ± 4,3 ^a	–	2,4 ± 1,0 ^a	50,1 ± 15,8 ^a	1,1 ± 0,5 ^a	24,1 ± 8,8 ^a	13 ± 3 ^a
Опыт 1	6,4 ± 0,3 ^a	18,1 ± 0,4 ^b	2,8 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	48,0 ± 1,0 ^a	1,8 ± 0,1 ^a	20,0 ± 0,3 ^a	15 ± 1 ^a
Опыт 2	7,5 ± 1,8 ^b	4,6 ± 1,4 ^a	3,8 ± 0,8 ^b	2,0 ± 0,8 ^b	47,4 ± 11,3 ^b	15,0 ± 8,4 ^b	20,0 ± 5,0 ^b	72 ± 6 ^b

Примечание. Обозначения пигментов, как в табл. 1; DEPS – величина степени дезоксидации (%); знак «–» – не обнаружено. Разные надстрочные символы (a, b) обозначают достоверность изменений параметра между контрольным и опытными вариантами культивирования (ANOVA, тест Дункана, $\alpha = 0,05$); $n = 4-6$.

чали значительное накопление пластидных Кар, и особенно зеаксантина (до 50% от суммы Кар), и внепластидного Аст (до 4% от суммы Кар) (табл. 2; рис. 3, б). Например, штамм зеленой каротиногенной микроводоросли *Bracteacoccus aggregatus* VM5/15 может продуцировать до 13,1% β-кар и 47,9% Аст от сухой массы клеток [39]. Виды рода *Coelastrella* способны накапливать Аст, кантаксантин и ЖК до ~30% от сухой массы (содержание Аст в зависимости от вида и условий культивирования может быть от 0,20 ± 0,03 до 7,95 ± 0,85 мг/г) [40]. На примере зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus* [47], накапливающей зеаксантин, было показано, что этот ксантофилл в светособирающем комплексе II фотосинтетического аппарата (ССКII ФСА) способен замещать виолаксантин и лютеин [48].

Как установлено в работе Chekanov et al. [38], клетки зеленой микроводоросли *H. pluvialis* на вегетативной (зеленой) стадии культивирования накапливали Аст на уровне 4% от сухой массы клеток, достигая при длительном стрессе 5,5%. Аст накапливался преимущественно в виде моно- и диэфиров ЖК семейств C16 и C18.

Низкотемпературный стресс для водорослей является одной из эффективных стратегий увеличения полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). При адаптации к низкой температуре микроводоросли увеличивают выработку ПНЖК для поддержания текучести мембраны [11, 49]. В нашей работе характеристика *C. reticulata* была дополнена изучением состава ЖК липидной фракции зеленых (ЗК) и красных (КК) клеток. В ЖК-профиле экстракта ЗК преобладали из насыщенных ЖК: пальмитиновая (C16:0) – 32%; из ненасыщенных: олеиновая (C18:1) – 22%; линолевая (C18:2) и линоленовая (C18:3) кислоты – до 40%. ЖК-спектр экстракта КК отличался накоплением ненасыщенных ЖК: олеиновой (C18:1), линолевой (C18:2) и линоленовой (C18:3) – 36%. Для отдела Chloropyta характерно высокое содержание ненасыщенных ЖК. Преобладание олеиновой кислоты (C18:1) в лабораторных культурах и в полевых цистах [50], по-видимому, отражает

ее важность как предшественника в синтезе ПНЖК (например, линолевой и/или α-линоленовой кислот). Это означает, что выработка ПНЖК определяется присутствием олеиновой кислоты. Линоленовая (C18:3), наряду с линолевой (C18:2), являются незаменимыми ЖК, их получают только из пищи. Наличие этих ненасыщенных ЖК, особенно в КК, важно для биотехнологических целей с применением в фармацевтической и пищевой отраслях. Снежные водоросли также служат питанием для адаптированных к холоду организмов.

Полученные на примере *C. reticulata* данные свидетельствуют о возможном функционировании двух механизмов фотопротекции. Зеаксантин-зависимый механизм участвует в тепловой диссипации избыточно поглощенной (не использованной на фотосинтез из-за пониженной температуры) световой энергии [51]. Другой механизм – накопление Аст – обеспечивает снижение поступления энергии к хлоропласту путем его экранирования [52, 53]. Так, вторичные Кар могут обеспечивать фотозащиту, пассивно поглощая фотоны до того, как они достигнут фотосинтетических пигментов. Этот способ защиты требует, чтобы Кар были расположены между источником света и фотосинтетическим аппаратом, т.е. во внетилакоидном пространстве. Еще одним условием эффективности вторичных Кар в качестве фотозащитных средств является то, что они одновременно поглощают свет при той же длине волны, используемой для возбуждения фотосенсибилизатора [54]. Следует отметить, что участие виолаксантинового цикла в индукции нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла ФСII (NPQ) в гематоцистах *H. pluvialis*, образовавшихся при комбинированном стрессе с высоким освещением и недостатком питательных веществ, остается под вопросом, хотя при стрессе с высоким освещением у *H. pluvialis* была зарегистрирована значительная повышенная регуляция этого механизма [55].

В ходе исследования впервые получены сведения о составе каротиноидов в красных клетках,

вызывающих цветение снега на Приполярном Урале. В таких клетках сумма Кар достигала 950 мкг/г сухой массы. Из них преобладающим был β -каротин (до 90%). При этом в зеленых клетках штамма *C. reticulata* (SYKOA Ch-054-11), который ранее был выделен из красного снега на Приполярном Урале, в условиях культивирования при температуре 6 °C и интенсивности освещения 250 мкмоль квантов/(м²·с) концентрация Кар повышалась до 2000 мкг/г сухой массы, что в 3,5 раза выше, чем в контроле, и на полтора порядка выше по сравнению с показателями, полученными в эксперименте с низкой освещенностью. В дополнение к пигментам изученный вид накапливает полиненасыщенные жирные кислоты. С физиологической точки зрения, приспособленность *C. reticulata* к обитанию на снежниках Приполярного Урала остается неизвестной, а низкое содержание Аст в клетках из проб красного снега, по-видимому, можно объяснить их невысокой способностью поглощать УФ-излучение и экранировать избыточную радиацию. С практической точки зрения, способность к индукции синтеза Кар, включая Аст, указывает на биотехнологический потенциал исследуемого штамма. В целом, результаты работы дополняют современные представления о пигментном составе и некоторых осо-

бенностях вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей сведениями о ранее не исследованном в данном аспекте виде *C. reticulata*. Дальнейшие исследования будут направлены на подбор условий, обеспечивающих рост культуры и индуцирующих накопление каротиноидов и других биологически активных соединений (содержания липидного состава, полифенолов) в клетках данного вида микроводорослей.

Вклад авторов. О.В. Дымова, Е.Н. Патова – концепция и руководство работой, обсуждение результатов исследования и написание текста; В.С. Паршуков, И.В. Новаковская – проведение экспериментов и обработка результатов исследования.

Финансирование. Финансирование исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственных заданий Института биологии Коми НЦ УрО РАН (№№ 122040600021-4 и 122040600026-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hoffmann, L. (1989) Algae of terrestrial habitats, *Bot. Rev.*, **55**, 77-105.
- AlgaeBase. In World-Wide Electronic Publication; National University of Ireland: Galway, Ireland, 2023, URL: <https://www.algaebase.org>.
- Masojídek, J., Torzillo, G., and Koblížek, M. (2013) Photosynthesis in microalgae, in *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 2nd ed (Richmond, A., and Hu, Q., eds) Chichester, Wiley-Blackwell, Chap. 2, pp. 21-35, <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>.
- Borowitzka, M. A. (2013) High-value products from microalgae – their development and commercialisation, *J. Appl. Phycol.*, **25**, 743-756, <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>.
- Mulders, K. J. M., Lamers, P. P., Martens, D. E., and Wijffels, R. H. (2014) Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities, *J. Phycol.*, **50**, 229-242, <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>.
- Solovchenko, A. E. (2013) Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae, *Russ. J. Plant Physiol.*, **60**, 1-13, <https://doi.org/10.1134/s1021443713010081>.
- Puchkova, T. V., Khapchaeva, S. A., Zotov, V. S., Lukyanov, A. A., and Solovchenko, A. E. (2021). Marine and freshwater microalgae as sustainable source cosmeceuticals, *Marine Biol. J.*, **6**, 67-81, <https://doi.org/10.21072/mbj.2021.06.1.06>.
- Chen, H., Qiu, T., Rong, J., He, C., and Wang, Q. (2015) Microalgal biofuel revisited: an informatics-based analysis of developments to date and future prospects, *Appl. Energy*, **155**, 585-598, <https://doi.org/10.1016/wj.apenergy.2015.06.055>.
- Vecchi, V., Barera, S., Bassi, R., and Dall'Osto, L. (2020) Potential and challenges of improving photosynthesis in Algae, *Plants*, **9**, 67, <https://doi.org/10.3390/plants9010067>.
- Remias, D., Lütz-Meindl, U., and Lütz, C. (2005) Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*, *Eur. J. Phycol.*, **40**, 259-268, <https://doi.org/10.1080/09670260500202148>.
- Prochazkova, L., Remias, D., Holzinger, A., Resanka, T., and Nedbalova, L. (2021) Ecophysiological and ultrastructural characterisation of the circumpolar orange snow alga *Sanguina aurantia* compared to the cosmopolitan red snow alga *Sanguina nivaloides* (Chlorophyta), *Polar Biol.*, **44**, 105-117, <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02778-0>.

12. Holzinger, A., and Karsten, U. (2013) Dessication stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms, *Front. Plant Sci.*, **4**, 327, <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00327>.
13. Gong, M., and Bassi, A. (2016) Carotenoids from microalgae: a review of recent developments, *Biotechnol. Adv.*, **34**, 1396-1412, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>.
14. Yang, Y., Seo, J. M., Nguyen, A., Pham, T. X., Park, H. J., Park, Y., Kim, B., Bruno, R. S., and Lee, J. (2011) Astaxanthin rich extract from the green alga *Haematococcus pluvialis* lowers plasma lipid concentrations and enhances antioxidant defense in apolipoprotein E knockout mice, *J. Nutr.*, **141**, 1611-1617, <https://doi.org/10.3945/jn.111.142109>.
15. Minyuk, G., Chelebieva, E., Chubchikova, I., Dantsyuk, N., Drobetskaya, I., Sakhon, E., Chekanov, K., and Solovchenko, A. (2017) Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrrella rubescens* (Scenedesmaceae, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids, *Algae*, **32**, 245-259, <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6>.
16. Singh, D. P., Khattar, J. S., Rajput, A., Chaudhary, R., and Singh, R. (2019) High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions, *PLoS One*, **14**, e0221930, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221930>.
17. Chekanov, K., Fedorenko, T., Kublanovskaya, A., Litvinov, D., and Lobakova, E. (2019) Diversity of carotenogenic microalgae in the White Sea polar region, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **96**, fiz183, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz183>.
18. Wang, B., Zarka, A., Trebst, A., and Boussiba, S. (2003) Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance, *J. Phycol.*, **39**, 1116-1124, <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x>.
19. Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., and Florou-Paneri, P. (2013) Functional properties of carotenoids originating from algae, *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 5-11, <https://doi.org/10.1002/jsfa.5902>.
20. Palozza, P., and Krinsky, N. I. (1992) Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model, *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 291-295, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90675-m](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90675-m).
21. Lorenz, R. T., and Cysewski, G. R. (2000) Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin, *Trends Biotechnol.*, **18**, 160-167, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01433-5).
22. Guerin, M., Huntley, M., and Olaizola, M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition, *Trends Biotechnol.*, **21**, 210-216, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7).
23. Naguib, Y. (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1150-1154, <https://doi.org/10.1021/jf991106k>.
24. Lemoine, Y., and Schoefs, B. (2010) Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress, *Photosynth. Res.*, **106**, 155-177, <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3>.
25. Boussiba, S. (2000) Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response, *Physiol. Plant.*, **108**, 111-117, <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x>.
26. Williams, W. E., Gorton, H. L., and Vogelmann, T. C. (2003) Surface gas-exchange processes of snow algae, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 562-566, <https://doi.org/10.1073/pnas.02355601>.
27. Hoham, R. W., Berman, J. D., Rogers, H. S., Felio, J. H., Ryba, J. B. and Miller, P. R. (2006) Two new species of green snow algae from Upstate New York, *Chloromonas chenangoensis* sp. nov. and *Chloromonas tughillensis* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae) and the effects of light on their life cycle development, *Phycologia*, **45**, 319-330, <https://doi.org/10.2216/04-103.1>.
28. Hoham, R. W., and Remias, D. (2020) Snow and glacial algae: a review, *J. Phycol.*, **56**, 264-282, <https://doi.org/10.1111/jpy.12952>.
29. Zheng, Y., Xue, C., Chen, H., He, C., and Wang, Q. (2020) Low-temperature adaptation of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* is associated with the photosynthetic system regulatory process, *Front. Microbiol.*, **11**, 1233, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01233>.
30. Suzuki, P., Detain, A., Park, Y., Viswanath, K., Wijffels, R. H., Leborgne-Castel, N., Procházková, L., Hulatt, C. J. (2023) Phylogeny and lipid profiles of snow-algae isolated from Norwegian red-snow microbiomes, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **99**, 1-18, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad057>.
31. Новаковская И. В., Патова Е. Н., Макеева Е. Г. (2022) Снежные водоросли и цианобактерии ряда районов Урала и Западного Саяна, *Теор. Прикл. Экол.*, **3**, 149-156, <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-3-149-156>.
32. Novakovskaya, I. V., Patova, E. N., Boldina, O. N., Patova, A. D., and Shadrin D. M. (2018) Molecular phylogenetic analyses, ecology and morphological characteristics of *Chloromonas reticulata* (Goroschankin) Gobi which causes red blooming of snow in the Subpolar Urals, *Cryptogamie, Algologie*, **39**, 199-213, <https://doi.org/10.7872/crya/v39.iss2.2018.199>.
33. Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel M., and Cohen-Bazire G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales), *Bacteriol. Rev.*, **35**, 171-205, <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>.

34. Andersen, R. A. (2005) *Algal Culturing Techniques*, Elsevier, New York, NY, USA, pp. 589.
35. Droop, M. R. (1955) Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis*, *Nature*, **175**, 42, <https://doi.org/10.1038/175042A0>.
36. Procházková, L., Leya, T., Křížková, H., and Nedbalová, L. (2019) *Sanguina nivaloides* and *Sanguina aurantia* gen. et spp. nov. (Chlorophyta): the taxonomy, phylogeny, biogeography and ecology of two newly recognized algae causing red and orange snow, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **95**, fiz064, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz064>.
37. Dymova, O., Khrystin, M., Miszalski, Z., Kornas, A., Strzalka, K., and Golovko, T. (2018) Seasonal variations of leaf chlorophyll-protein complexes in the wintergreen herbaceous plant *Ajuga reptans* L., *Func. Plant Biol.*, **45**, 519-527, <https://doi.org/10.1071/FP17199>.
38. Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., and Solovchenko, A. (2014) Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white Sea Coastal Rocks (Russia), *Mar. Drugs*, **12**, 4504-4520, <https://doi.org/10.3390/md12084504>.
39. Chekanov, K., Litvinov, D., Fedorenko, T., Chivkunova, O., and Lobakova, E. (2021) Combined production of astaxanthin and β -carotene in a new strain of the microalga *Bracteacoccus aggregatus* BM5/15 (IPPAS C-2045) cultivated in photobioreactor, *Biology*, **10**, 643, <https://doi.org/10.3390/biology10070643>.
40. Corato, A., Le, T. T., Baurain, D., Jacques, P., Remacle, C., and Franck, F. A. (2022) Fast-growing oleaginous strain of *Coelastrella* capable of astaxanthin and canthaxanthin accumulation in phototrophy and heterotrophy, *Life*, **12**, 334, <https://doi.org/10.3390/life12030334>.
41. Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety of use of colouring agents in animal nutrition – PART I. General Principles and Astaxanthin, (2005), *EFSA J.*, **291**, 1-40, URL: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/291>.
42. Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N., and Nagai, S. (1992) Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions, *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 17-20, [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90261-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90261-R).
43. Ben-Amotz, A., Katz, A., and Avron, M. (1982) Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae), *J. Phycol.*, **18**, 529-537, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1982.tb03219.x>.
44. Grung, M., D'Souza, F. M. L., Borowitzka, M., and Liaaen-Jensen, S. (1992) Algal Carotenoids 51. Secondary Carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters, *J. Appl. Phycol.*, **4**, 165-171, <https://doi.org/10.1007/BF02442465>.
45. Czygan, F. (1970) Blood-rain and blood-snow: nitrogen-deficient cells of *Haematococcus pluvialis* and *Chlamydomonas nivalis*, *Arch. Mikrobiol.*, **74**, 69-76, <https://doi.org/10.3354/meps08849>.
46. Челебиева Э. С. (2014) Особенности вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей, Автореф. дис. канд. биол. наук, Институт биологии южных морей, Севастополь.
47. Bishop, N.I., Bulga, B., and Senger, H. (1998) Photosynthetic capacity and quantum requirement of three secondary mutants of *Scenedesmus obliquus* with deletions in carotenoid biosynthesis, *Bot. Acta.*, **111**, 231-235, <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1998.tb00700.x>.
48. Polle, J. E., Niyogi, K. K., and Melis, A. (2001) Absence of lutein, violaxanthin and neoxanthin affects the functional chlorophyll antenna size of photosystem-II but not that of photosystem-I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Physiol.*, **42**, 482-491, <https://doi.org/10.1093/pcp/pce058>.
49. Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., and Huner, N. P. A (2006) Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments, *Microbiol. Mol. Biol. R.*, **70**, 222-252, <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006>.
50. Spijkerman, E., Wacker, A., Weithoff, G., and Leya, T. (2012) Elemental and fatty acid composition of snow algae in Arctic habitats, *Front. Microbiol.*, **3**, 380, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00380>.
51. Demmig-Adams, B., and Adams, W. W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis, *Trends Plant Sci.*, **1**, 21-26, [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80019-7).
52. Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E., Kennicutt II, M. C., Iturriaga, R., Harvey, H. R., Hohan, R. W., and Macko S. A. (1993) Evidence for photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae, *J. Phycol.*, **29**, 427-434, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1993.tb00143.x>.
53. Соловченко А. Е., Мерзляк М. Н. (2008) Экранирование видимого и УФ излучения как фотозащитный механизм растений, *Физиол. Раст.*, **55**, 803-822.
54. Rau, W. (1988) Functions of carotenoids other than in photosynthesis, in *Plant Pigments* (Goodween, T. W., ed) Academic Press, London, pp. 231-255.
55. Gu, W., Li, H., Zhao, P., Yu, R., Pan, G., Gao, S., Xie, X., Huang, A., He, L., and Wang, G. (2014) Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae (*Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*) reveals two different high light-responsive strategies, *Sci. Rep.*, **4**, 1-12, <https://doi.org/10.1038/srep06661>.

**THE CONTENT OF PRIMARY AND SECONDARY
CAROTENOIDS IN THE CELLS OF THE CRYOTOLERANT
MICROALGAE *Chloromonas reticulata***

O. V. Dymova*, V. S. Parshukov, I. V. Novakovskaya, and E. N. Patova

*Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
167982 Syktyvkar, Komi Republic, Russia; e-mail: dymovao@ib.komisc.ru*

Snow (cryotolerant) algae often form red (pink) spots in mountain ecosystems on snowfields around the world, but little is known about their physiology and chemical composition. The content and composition of pigments in the cells of the cryotolerant green microalgae *Chloromonas reticulata* have been studied. An analysis of the carotenoids content in green (vegetative) cells grown in laboratory conditions and in red resting cells collected from the snow surface in the Subpolar Urals was carried out. There were photosynthetic pigments – carotenoids such as neoxanthin, violaxanthin, anteraxanthin, zeaxanthin, lutein and β -carotene. Among the carotenoids, the ketocarotenoid astaxanthin, which has a high biological activity, was also found. It was established that the cultivation of algae at low positive temperature (+6 °C) and moderate illumination (250 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) contributed to the accumulation of all identified carotenoids, including extraplastidic astaxanthin. In addition to the pigments, fatty acids accumulated in the algae cells. The data obtained allow us to consider the studied microalgae as a potentially promising species for the production of carotenoids.

Keywords: *Chloromonas reticulata*, green microalgae, carotenoids, astaxanthin, high-performance liquid chromatography

МИОЗИН И ТОНКИЙ ФИЛАМЕНТ МИОКАРДА – МИШЕНИ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ СВИНЦА И КАДМИЯ

© 2024 О.П. Герцен*, Ю.К. Потоскуева, А.Е. Цыбина,
Т.А. Мячина, Л.В. Никитина

*Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
620078 Екатеринбург, Россия; электронная почта: o.p.gerzen@gmail.com*

Поступила в редакцию 18.05.2024

После доработки 10.06.2024

Принята к публикации 11.06.2024

Свинец и кадмий – это тяжёлые металлы, которые широко распространены в окружающей среде и вносят значительный вклад в сердечно-сосудистую заболеваемость и смертность. С помощью окрашивания Leadmium Green мы показали, что двухвалентные катионы свинца и кадмия способны проникать внутрь кардиомиоцита, распределяясь по всей клетке. Методом искусственной подвижной системы мы показали, что скорость скольжения актина и нативного тонкого филамента по миозину снижается при повышении концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} . Для остановки движения тонкого филамента по миозину требовались значительно меньшие концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} (0,6 мМ), чем для остановки движения актина по миозину (1,1–1,6 мМ). Для остановки движения актина по миозину требовалась более низкая концентрация Cd^{2+} (1,1 мМ) по сравнению с Pb^{2+} (1,6 мМ) и комбинацией $Pb^{2+} + Cd^{2+}$ (1,3 мМ). При этом не было найдено отличий в воздействии ионов свинца и кадмия на относительную силу, развиваемую головками миозина, и количество осевших на миозин актиновых филаментов. Скорость скольжения актина по миозину левого предсердия, правого и левого желудочков одинаково изменялась при воздействии одной и той же дозы одного и того же металла. Таким образом, мы впервые показали, что Pb^{2+} и Cd^{2+} могут оказывать прямое воздействие на функцию миозина и тонкого филамента, при этом Cd^{2+} оказывает более токсичное влияние, нежели Pb^{2+} .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: миозин, тонкий филамент, свинец, кадмий, сердечная мышца.

DOI: 10.31857/S0320972524070068 EDN: WNFGAG

ВВЕДЕНИЕ

Мышечное сокращение происходит благодаря скольжению тонких и толстых филаментов друг относительно друга [1]. Толстые филаменты состоят главным образом из миозина, тогда как тонкие филаменты в основном состоят из актина, тропомиозина и субъединиц тропонина: Т, I, С [2]. Миозин сердца млекопитающих содержит шесть полипептидных цепей, а именно – две тяжёлые цепи миозина (ТЦМ), две существенные (ЛЦМ 1) и две регуляторные (ЛЦМ 2) лёгкие цепи. ТЦМ миокарда представлены двумя изоформами: α -ТЦМ и β -ТЦМ, которые отличаются АТРазной активностью [3]. ЛЦМ 1 и ЛЦМ 2 также представлены

двумя изоформами, названными в зависимости от камеры сердца: предсердные или желудочковые, каждая из которых вносит различный вклад в кинетику миозина [4].

Двухвалентные катионы, такие как кальций и магний, играют ключевую роль в сокращении сердца. ЛЦМ 2 связывает ионы Ca^{2+} [5] и Mg^{2+} [6]. Mg^{2+} также необходим для АТРазной активности миозина, поскольку АТР-связывающий карман миозина связывает комплекс АТР- Mg^{2+} , обеспечивая необходимую энергию для генерации силы [7]. Тропонин С обладает способностью связывать Ca^{2+} , запуская процесс скольжения тонких и толстых филаментов друг относительно друга [8].

Свинец и кадмий, будучи широко распространёнными в окружающей среде ксенобиотиками, вносят значительный вклад в сердечно-сосудистую заболеваемость и смертность. В 2019 году из-за воздействия свинца были потеряны более 1 миллиона жизней и 21,7 миллиона лет жизни с поправкой на инвалидность (DALY) [9].

Принятые сокращения: ЛЦМ 1 – существенная лёгкая цепь миозина; ЛЦМ 2 – регуляторная лёгкая цепь миозина; НТФ – нативный тонкий филамент; ТЦМ – тяжёлые цепи миозина.

* Адресат для корреспонденции.

На свинец приходится 4,6% глобального бремени сердечно-сосудистых заболеваний [9], при этом по кадмию глобальных статистических данных нет.

Свинец и кадмий могут иметь разные степени окисления (Pb⁰, Pb²⁺, Pb⁴⁺, Cd⁰, Cd¹⁺, Cd²⁺) и попадают в организм в форме различных соединений [10], при этом в организме их наиболее распространённая форма – со степенью окисления +2. Период полувыведения Pb²⁺ и Cd²⁺ из организма составляет около 10–30 лет [11, 12]. Pb²⁺ и Cd²⁺ способны накапливаться в миокарде [13–15], и помимо потенциальных опосредованных эффектов, связанных с гипертонией [16, 17], атеросклерозом [18] или почечной дисфункцией [19], они могут оказывать прямое влияние на миокард [20–22]. Ионы свинца и кадмия вызывают окислительный стресс, приводящий к повреждению эндотелия сосудов и кардиомиоцитов [23–25], вмешиваются в нормальный клеточный цикл, стимулируя апоптоз [26, 27], и, действуя на кальциевые каналы L-типа, изменяют кальциевую активацию, замедляют деполяризацию [28] и способствуют развитию аритмии [20]. Было показано, что длительное воздействие ионов свинца и кадмия на организм снижает скорость скольжения актина по миозину миокарда, вызывает сдвиг соотношения изоформ ТЦМ, а воздействие ионов свинца значительно снижает фосфорилирование ЛЦМ 2 в предсердиях [29–33].

Размер и ионная форма многих тяжёлых металлов позволяют им связываться с -SH-группами белков [34], тем самым потенциально вытесняя незаменимые ионы, такие как Ca²⁺, Zn²⁺ и Mg²⁺ [35–37]. В частности, Pb²⁺ и Cd²⁺ могут влиять на АТФазную активность миозина [38], а также на функцию белков семейства EF-hand, таких как скелетный тропонин С [39] и кальмодулин [40, 41]. В то время как сердечный тропонин С и сердечная ЛЦМ 2, будучи членами семейства EF-hand, способны связывать Ca²⁺ и Mg²⁺ [6], остаётся неясным, обладают ли похожие двухвалентные катионы, такие как Pb²⁺ и Cd²⁺, сродством к ним. Поэтому всестороннее изучение влияния Pb²⁺ и Cd²⁺ на функциональные характеристики сократительных и регуляторных белков миокарда представляется необходимым.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Все эксперименты проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU и были одобрены Этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН. Взрослых крыс линии Wistar в возрасте 24–26 недель перед использованием в экспериментах содержали в стандартных условиях. Перед изоляцией сердца животные были анестезированы внутримышеч-

ной инъекцией 0,3 мл/кг Zoletil® 100 («Virbac», Карро, Франция) и 1 мл/кг ксилазина 2%-ного («Alfasan», Вурден, Нидерланды), гепаринизированы 5000 МЕ/кг гепарином натрия («Эллара», Россия).

Выделение кардиомиоцитов желудочка. Единичные кардиомиоциты были выделены из левого желудочка крыс с использованием комбинированного метода перфузии по Лангендорфу и внутрикамерных инъекций, как было описано ранее [42]. Суспензии кардиомиоцитов хранили в модифицированном HEPES-буферном растворе Tyrode (140,0 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,0 mM MgSO₄, 10,0 mM HEPES, 11,1 mM D-глюкозы и 1,8 mM CaCl₂, pH 7,35) при комнатной температуре (22 ± 2 °C) и использовали в течение 4–6 ч. Выделенные кардиомиоциты перед использованием в экспериментах выдерживали в покое не менее 30 мин.

Измерения внутриклеточных [Pb²⁺] и [Cd²⁺]. Для регистрации внутриклеточного [Pb²⁺] (или [Cd²⁺]) суспензии кардиомиоцитов крысы инкубировали с 2,5 мкМ Leadmium Green AM («Molecular Devices», Сан-Хосе, Калифорния, США) и 0,1%-ным Pluronic® F-127 («AAT Bioquest», США) при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин, а затем промывали HEPES-буферным раствором Tyrode. Интенсивность испускаемой флуоресценции, возбуждаемой оптически при 488 нм, регистрировали при 463–614 нм с использованием системы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (LSM 710, «Carl Zeiss», Йена, Германия). Для измерения изменений внутриклеточного [Pb²⁺] (или [Cd²⁺]) стимулированные кардиомиоциты инкубировали при 36 ± 1 °C в растворе, содержащем Pb²⁺ (или Cd²⁺), в течение 10 мин. Клетки стимулировали полем с частотой 1 Гц. Изменение сигнала флуоресценции рассчитывали и использовали как показатель изменения внутриклеточных [Pb²⁺] и [Cd²⁺]. Анализ конфокальных 2D-изображений окрашенных кардиомиоцитов проводили с использованием программного обеспечения FIJI ImageJ (National Institutes of Health, Бетесда, Мэриленд, США).

Экстракция белка. Для основной части экспериментов миозин выделяли из левого желудочка сердца быка [43]. Для сравнения влияния Pb²⁺ и Cd²⁺ на актин-миозиновое взаимодействие в различных камерах сердца миозин экстрагировали из левого предсердия, правого и левого желудочков свиньи [43]. Актин был выделен из быстрых скелетных мышц кролика [44]. Нативный тонкий филамент (НТФ) выделяли из левого желудочка свиньи [45].

SDS-PAGE. Состав ТЦМ определяли методом полиакриламидного гель-электрофореза с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) [46]. Состав ЛЦМ и НТФ определяли по Laemmli [47].

Искусственная подвижная система. Характеристики актин-миозинового взаимодействия исследовали с помощью искусственной подвижной системы [48] с модификациями, а именно – из состава всех используемых растворов были исключены вещества с активными -SH-группами (например, дитиотреитол), т.к. они активно связывают свинец и, в меньшей степени, кадмий. В проточной камере объемом 50 мкл по миозину двигались актиновые филаменты в присутствии АТФ или НТФ в присутствии АТФ и кальция. Чтобы изучить прямое влияние Pb^{2+} и Cd^{2+} , мы добавляли растворы $PbCl_2$ и $CdCl_2$ в проточную камеру в различных концентрациях. С помощью программы GMimPro (Mashanov and Molloy, 2007) регистрировали скольжение филаментов по миозину – анализировали не менее 10 записей, в каждой из которых регистрировали не менее 8–10 филаментов.

Для изучения влияния Pb^{2+} и Cd^{2+} на характеристики актин-миозинового взаимодействия мы анализировали скорость скольжения актина по миозину левого желудочка быка и фракцию подвижных филаментов (количество двигающихся филаментов по отношению к их общему числу) при различных концентрациях этих ионов, а также скорость скольжения НТФ левого желудочка свиньи по миозину левого желудочка свиньи. Для сравнения влияния Pb^{2+} и Cd^{2+} на актин-миозиновое взаимодействие в разных камерах сердца мы изучали скорость скольжения актина по миозину левого предсердия, правого и левого желудочков сердца свиньи.

Для исследования количества осевших на миозин левого желудочка быка актиновых филаментов мы использовали высокие концентрации $PbCl_2$ и $CdCl_2$ (1,5–3,5 мМ), при которых движения не наблюдалось.

Относительную силу, развиваемую головками миозина, определяли с использованием смеси миозина левого желудочка быка и нециклирующего NEM-модифицированного миозина [49] в различных соотношениях. NEM-модифицированный миозин прикреплялся к актину и служил грузом, препятствующим скольжению. Мера относительной силы определялась как доля нециклирующего NEM-модифицированного миозина, необходимая для остановки скольжения актина по миозину.

Статистический анализ. Зависимость скорости скольжения актина по миозину левого желудочка быка анализировали по двухфазной кривой «концентрация-эффект» (OriginPro). Статистический анализ и построение графиков проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса и программы PrizmaGraph или OriginPro, различия считали статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерение внутриклеточного $[Pb^{2+}]$ и $[Cd^{2+}]$. В течение 10 мин наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции на 43% после обработки $PbCl_2$ и на 15% после обработки $CdCl_2$, что подтверждает проникновение двухвалентных катионов свинца и кадмия внутрь кардиомиоцитов (рис. 1).

Состав тяжёлых и лёгких цепей миозина. Тяжёлые цепи миозина (ТЦМ) левого желудочка быка были представлены β -изоформой, а существенные (ЛЦМ 1) и регуляторные (ЛЦМ 2) лёгкие цепи миозина были представлены желудочковыми изоформами. В миокарде свиньи ТЦМ в левом предсердии были представлены 26% α -ТЦМ и 74% β -ТЦМ, в правом желудочке – 100% β -ТЦМ и в левом желудочке – 100% β -ТЦМ. В левом предсердии присутствовали предсердные изоформы ЛЦМ 1 и ЛЦМ 2, а в правом и левом желудочках – желудочковые изоформы ЛЦМ 1 и ЛЦМ 2. НТФ левого желудочка свиньи включал актин, тропомиозин и тропонин.

Характеристики актин-миозинового взаимодействия в присутствии ионов свинца и кадмия. Скорость скольжения актина по миозину снижалась с увеличением концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} (рис. 2), следуя двухфазной кривой «концентрация-эффект». Для остановки движения требовались различные концентрации каждого металла: 1,6 мМ Pb^{2+} , 1,1 мМ Cd^{2+} и 1,3 мМ для их комбинации. Полумаксимальные ингибирующие концентрации (IC_{50}) показали два значения для каждого металла из-за двухфазного характера кривых. Для кривой зависимости скорости от концентрации Pb^{2+} значения IC_{50} для фаз I и II составили 0,255 мМ и 1,251 мМ соответственно. Для кривой зависимости скорости от концентрации Cd^{2+} значения IC_{50} для фаз I и II составили 0,359 мМ и 0,956 мМ, для комбинации ионов – 0,176 мМ и 0,989 мМ соответственно (рис. 2, табл. 1).

Зависимость фракции подвижных филаментов от концентрации ионов свинца и кадмия также имела вид двухфазной кривой. Концентрации металлов для достижения нулевой фракции были те же, что и для остановки движения. Однако IC_{50} для фаз I и II различались и составляли соответственно 0,12 мМ и 1,012 мМ для Pb^{2+} , 0,269 мМ и 1,052 мМ для Cd^{2+} , 0,954 мМ и 1,272 мМ для их комбинации (рис. 2, табл. 1).

Мера относительной силы, развиваемой головками миозина, определялась как доля нециклирующего NEM-модифицированного миозина, необходимая для полной остановки движения. Для контрольного миозина эта доля составила 62%, а в присутствии Pb^{2+} , Cd^{2+} и их комбинации – 62%, 63% и 66% соответственно (рис. 3, а, б, в).

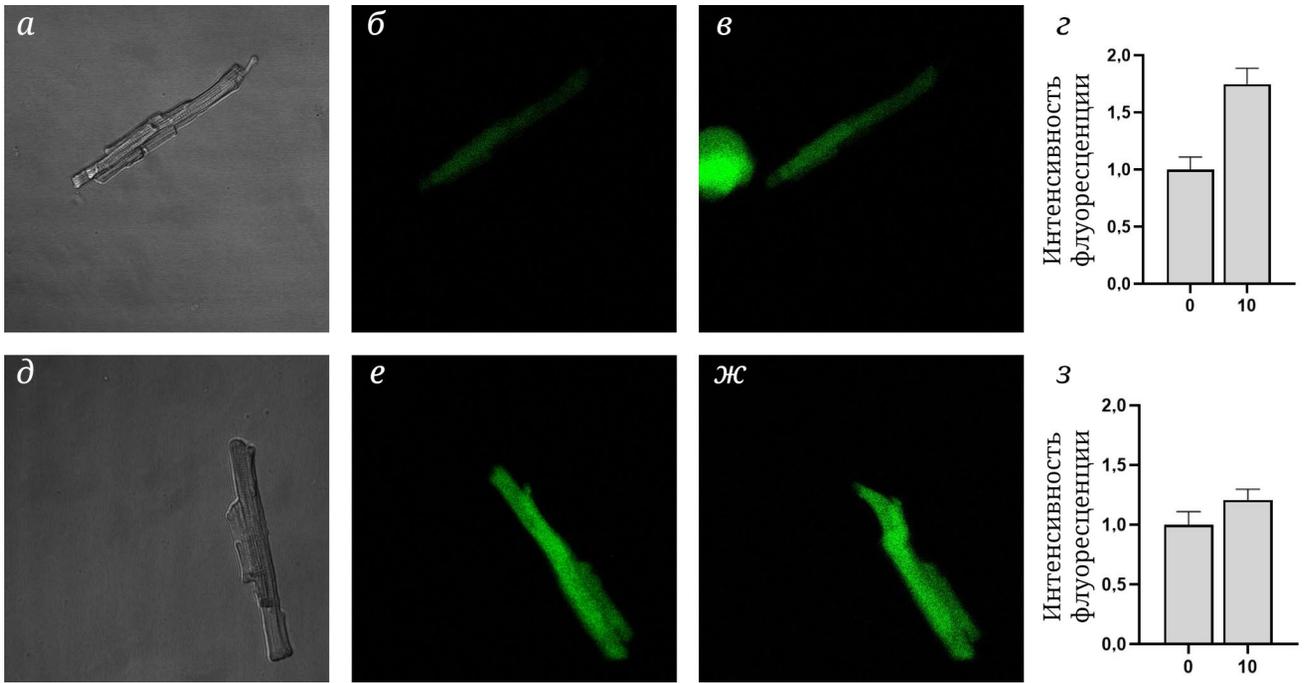


Рис. 1. Кардиомиоцит левого желудочка крысы, окрашенный Leadmium Green, в светлопольном режиме (а), на 0-й (б) и 10-й минуте (в) обработки $PbCl_2$ во флуоресцентном режиме; нормированная интенсивность флуоресценции на 0-й и 10-й минуте обработки $PbCl_2$ (з), данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Кардиомиоцит левого желудочка крысы, окрашенный Leadmium Green, в светлопольном режиме (д), на 0-й (е) и 10-й минуте (ж) обработки $CdCl_2$ во флуоресцентном режиме; нормированная интенсивность флуоресценции на 0-й и 10-й минуте обработки $CdCl_2$ (з), данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение

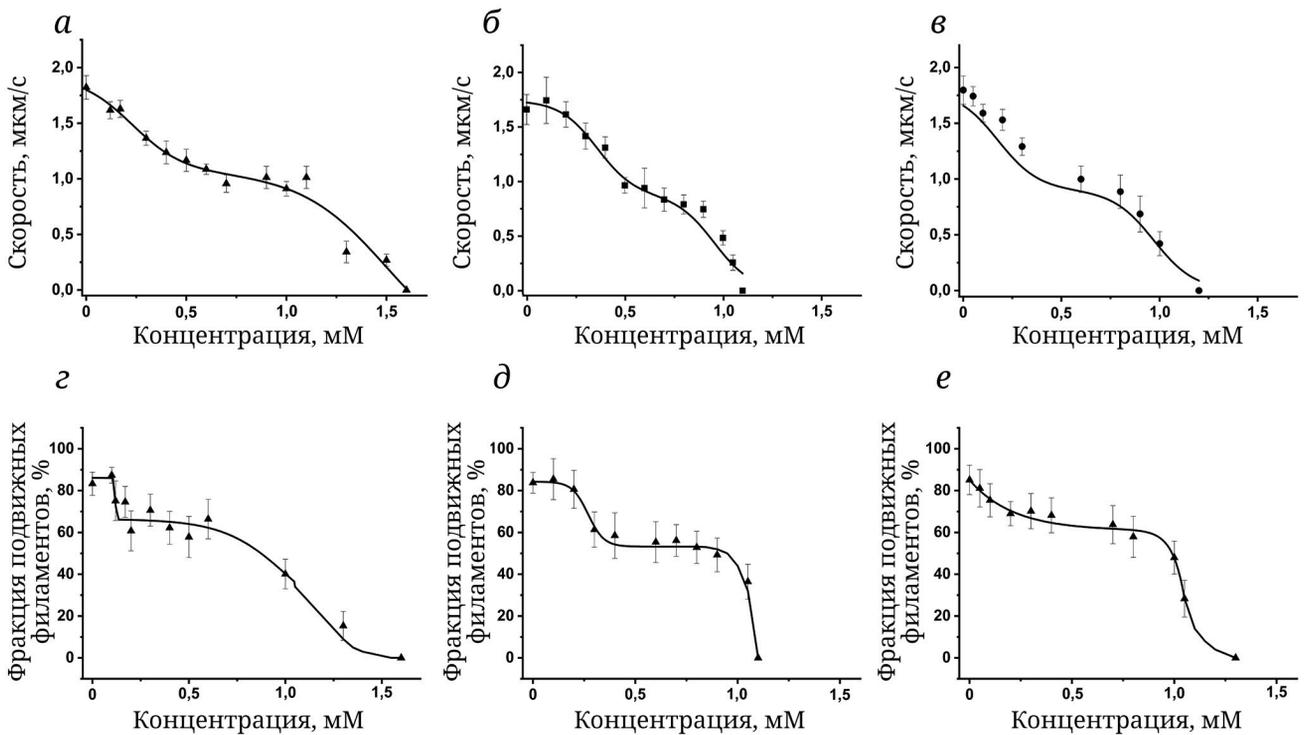


Рис. 2. Зависимость скорости скольжения актина по миозину от концентрации $PbCl_2$ (а), $CdCl_2$ (б) и комбинации $PbCl_2$ и $CdCl_2$ (1 : 1) (в); зависимость фракции подвижных филаментов от концентрации $PbCl_2$ (з), $CdCl_2$ (д) и комбинации $PbCl_2$ и $CdCl_2$ (1 : 1) (е)

Таблица 1. Характеристики кривых «концентрация-эффект» в присутствии ионов свинца и кадмия

	Скорость			Фракция подвижных филаментов		
	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺ + Cd ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺ + Cd ²⁺
Концентрация, необходимая для остановки движения, мМ	1,6	1,1	1,3	1,6	1,1	1,3
IC ₅₀ фазы I, мМ	0,255	0,359	0,176	0,120	0,269	0,754
IC ₅₀ фазы II, мМ	1,251	0,956	0,989	1,012	1,052	1,272

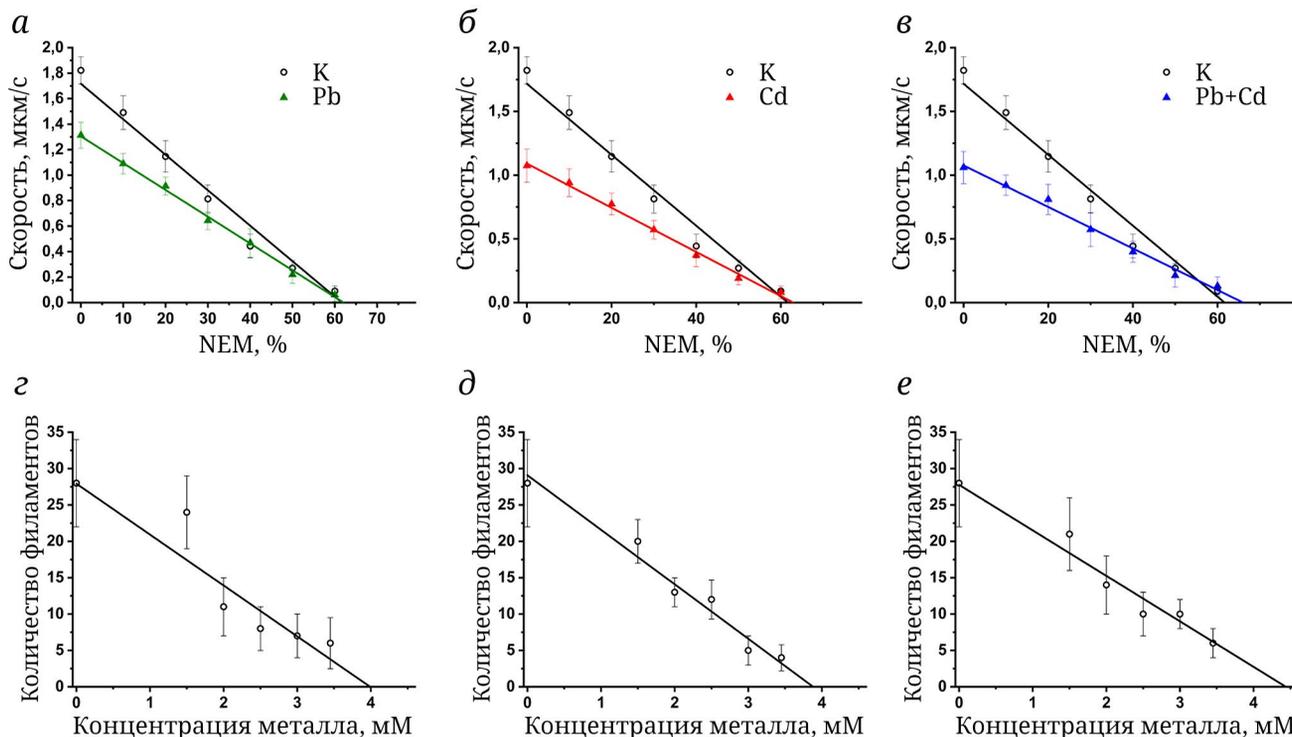


Рис. 3. Зависимость скорости скольжения актина по миозину от доли NEM-модифицированного миозина в контрольной группе (К), при добавлении 0,5 мМ PbCl₂ (а), 0,5 мМ CdCl₂ (б) и 0,5 мМ комбинации PbCl₂ и CdCl₂ (1 : 1) (в). Количество филаментов в поле зрения экспериментальной записи при добавлении PbCl₂ (г), CdCl₂ (д) и комбинации PbCl₂ и CdCl₂ (1 : 1) (е)

При добавлении высоких концентраций исследуемых металлов (1,5–3,5 мМ) количество осевших на миозин актиновых филаментов снижалось пропорционально увеличению концентрации ионов (рис. 3, г, д, е). Значимых отличий между группами найдено не было.

Скорость скольжения актина по миозину разных камер сердца в присутствии ионов свинца и кадмия. Добавление 0,1 мМ PbCl₂ не оказывало значимого влияния на скорость скольжения актина по миозину всех исследуемых отделов сердца. При добавлении 0,5 мМ PbCl₂ скорость скольжения актина по миозину левого предсердия, правого и левого желудочка снижалась на 5%, 12% и 2% соответственно. При этом добавление 0,1 мМ CdCl₂ снижало скорость на 27%, 25%

и 25%, а 0,5 мМ CdCl₂ – на 47%, 43% и 55% для левого предсердия, правого и левого желудочка соответственно (рис. 4).

Скорость скольжения актина и НТФ по миозину в присутствии ионов свинца, кадмия и их комбинации. Добавление 0,1 мМ CdCl₂ снижало скорость скольжения актина по миозину на 26%, а добавление 0,1 мМ PbCl₂ и комбинации металлов не оказывало значимого влияния на эту скорость. Добавление 0,5 мМ PbCl₂ не оказывало значимого влияния, а добавление 0,5 мМ CdCl₂ и комбинации металлов снижало скорость скольжения актина по миозину на 56% и 45% соответственно (рис. 5, а).

При этом добавление 0,1 мМ PbCl₂, CdCl₂ и их комбинации снижало скорость скольжения НТФ

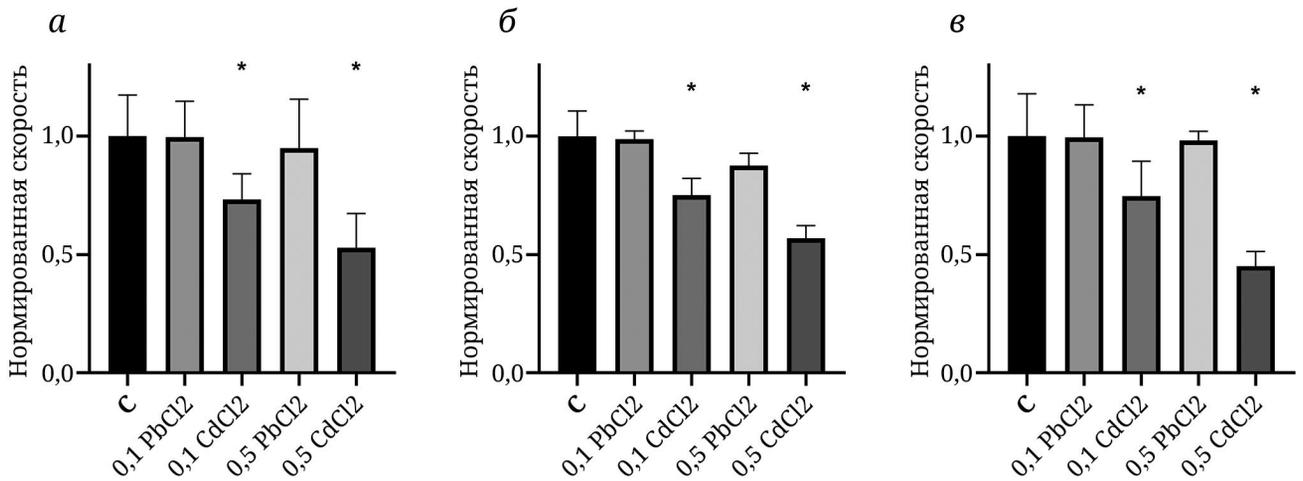


Рис. 4. Нормированная скорость скольжения актина по миозину предсердий (а), правого (б) и левого (в) желудочка свиньи в присутствии 0,1 мМ и 0,5 мМ PbCl₂ или CdCl₂. * Статистически значимые отличия от контрольной группы (*p* < 0,05)

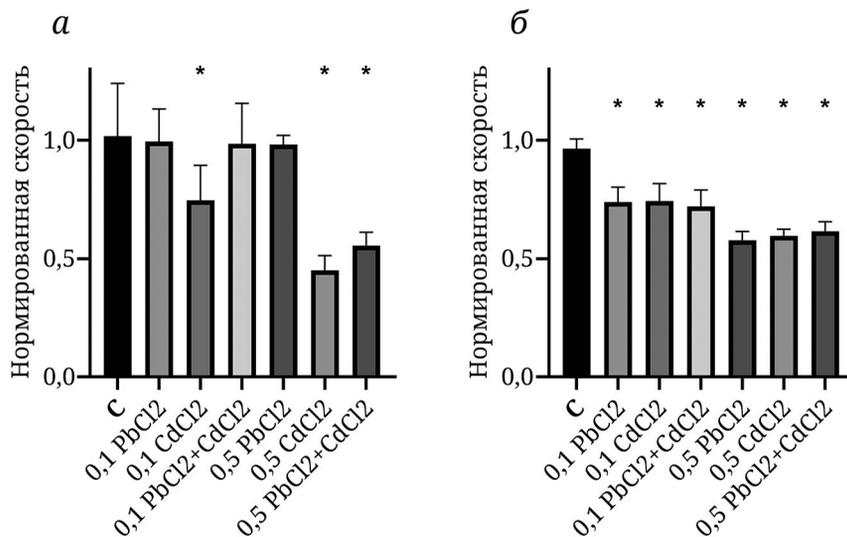


Рис. 5. Нормированная скорость скольжения актина (а) и НТФ левого желудочка свиньи (б) по миозину левого желудочка свиньи в присутствии 0,1 мМ и 0,5 мМ PbCl₂, CdCl₂ или их комбинации. * Статистически значимые отличия от контрольной группы (*p* < 0,05)

по миозину на 19%, 23% и 25% соответственно. А при добавлении 0,5 мМ PbCl₂, CdCl₂ и их комбинации скорость скольжения НТФ по миозину снижалась на 40%, 38% и 36% соответственно (рис. 5, б). При этом при добавлении 0,6 мМ PbCl₂, CdCl₂ или их комбинации движение полностью останавливалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние ионов свинца и кадмия на функцию миозина и тонкого филамента. Pb²⁺ и Cd²⁺ могут накапливаться в миокарде [13, 14] и изменять профиль потенциала действия кардиомио-

цитов [21, 28]. Двухвалентные катионы свинца и кадмия способны проникать в кардиомиоциты через различные транспортные каналы [50], однако дальнейшая миграция и распределение по клетке были показаны только для ионов свинца [21]. Наши результаты впервые предоставляют экспериментальные доказательства того, что не только Pb²⁺, но и Cd²⁺ способен проникать в кардиомиоциты и распределяться по всей клетке. Следовательно, оба металла, в том числе благодаря их способности связываться с -SH-группами белков [34], имеют потенциальную возможность взаимодействовать с металл-связывающими сайтами сократительных и регуляторных белков миокарда [50].

Миозин сердца содержит два сайта связывания металлов – АТР-связывающий карман, который связывает Mg^{2+} в комплексе Mg -АТР [7], и ЛЦМ 2, которая, будучи членом семейства EF-hand, способна связывать Ca^{2+} и Mg^{2+} [6]. Важно понимать, что АТР-связывающий карман, помимо комплекса Mg -АТР, может также связывать комплекс Ca -АТР [7, 51, 52], следовательно, на эти сайты связывания гипотетически могут воздействовать и другие двухвалентные катионы. Кроме того, было показано, что АТР-активность миозина изменяется в присутствии Pb^{2+} и Cd^{2+} [22, 38, 39].

Скелетный тропонин С и кальмодулин, принадлежащие к семейству EF-hand, могут связывать ряд двухвалентных катионов, включая Pb^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} [39, 41]. Оптимальное связывание катионов с белками семейства EF-hand происходит при ионном радиусе в диапазоне между ионными радиусами Mg^{2+} (0,81 Å) и Ca^{2+} (1,06 Å) [53].

Учитывая эффективный ионный радиус Cd^{2+} (0,97 Å) и Pb^{2+} (1,19 Å), мы предполагаем, что первоочередной мишенью для этих ионов среди белков саркомера миокарда может служить входящий в состав тонкого филамента тропонин С – член семейства EF-hand, который в норме связывает только Ca^{2+} . Ранее было показано, что скелетный тропонин С может взаимодействовать с Pb^{2+} и Cd^{2+} [39, 54]. Второй мишенью может служить ЛЦМ 2, которая связывает как Mg^{2+} , так и Ca^{2+} . К третьей мишени – АТР-связывающему карману миозина, который в норме связывает только Mg^{2+} – двухвалентные катионы свинца и кадмия должны иметь меньшее сродство в силу большей разности эффективных ионных радиусов.

Мы исследовали характеристики взаимодействия миозина с актином и НТФ, состоящим из актина, тропонина и тропомиозина, при различных концентрациях хлорида свинца и кадмия. Снижение скорости скольжения актина по миозину происходило при увеличении концентрации ионов вплоть до полной остановки движения при концентрациях в диапазоне 1,1–1,6 мМ. При этом кривая зависимости скорости от концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} имеет вид двухфазной кривой, что гипотетически может быть обусловлено наличием у миозина двух потенциальных мишеней для связывания исследуемых ионов: АТР-связывающего кармана и ЛЦМ 2.

Эксперимент с НТФ проходил при наличии Ca^{2+} в растворе, что в теории должно было ослабить действие Pb^{2+} и Cd^{2+} за счёт конкуренции. При низких концентрациях металлов снижение скорости скольжения НТФ по миозину действительно происходило немного медленнее, чем при скольжении актина, но при увеличении дозы до 0,6 мМ происходила остановка движения, что подтверждает более высокую чувствительность

тонкого филамента к Pb^{2+} и Cd^{2+} по сравнению с миозином.

Отдельного обсуждения заслуживает сравнение скорости скольжения актина по миозину разных камер сердца. Известно, что в миокарде предсердий и правого желудочка Pb^{2+} и Cd^{2+} могут накапливаться в более высокой концентрации, чем в левом желудочке [55], а в наших предыдущих работах было показано, что скорость скольжения тонкого филамента по миозину предсердий и правого желудочка более подвержена изменениям при хронической интоксикации свинцом [33]. Таким образом, несмотря на то что миозин предсердий и желудочков имеет различные изоформы ЛЦМ 2, при данных концентрациях Pb^{2+} и Cd^{2+} различий в характеристиках актин-миозинового взаимодействия найдено не было.

Сравнение токсического влияния ионов свинца и кадмия. По данным ВОЗ свинец, среди прочих химических веществ, оказывает наиболее серьёзное влияние на функцию сердца и вызывает сердечно-сосудистые заболевания [9]. При этом кадмию уделяется значительно меньше внимания, и глобальных статистических данных по влиянию кадмия на функцию сердца нет [9]. Наши исследования показывают, что прямое воздействие ионов кадмия на функцию миозина миокарда значительно более токсично, чем такое у ионов свинца: при скольжении актина по миозину Cd^{2+} останавливает движение при концентрации 1,1 мМ, тогда как для Pb^{2+} требуется концентрация 1,6 мМ. Cd^{2+} имеет меньший ионный радиус по сравнению с Pb^{2+} , поэтому его токсичность в данном случае предсказуема. Стоит отметить, что для полной остановки скольжения актина по миозину требуется концентрация комбинации металлов 1,3 мМ, что выше, чем для Cd^{2+} , но ниже, чем для Pb^{2+} . Это указывает не на суммарный эффект воздействия Pb^{2+} и Cd^{2+} , а на конкурентные отношения между этими ионами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свинец и кадмий в форме двухвалентных катионов способны проникать и распределяться по всему кардиомиоциту, что создаёт для них возможность связываться с белками и ухудшать их функцию.

Мы показали, что для остановки движения тонкого филамента по миозину требуются значительно меньшие концентрации Pb^{2+} и Cd^{2+} , чем для остановки движения актина по миозину. Прямое воздействие Pb^{2+} и Cd^{2+} может быть обусловлено потенциальным взаимодействием с белками семейства EF-hand тропонином С и ЛЦМ 2, а также с АТР-связывающим карманом,

при этом тропонин С является их первоочередной мишенью. Наши исследования показывают, что прямое воздействие Cd²⁺ на функцию миозина может быть значительно более токсичным, чем воздействие свинца.

Таким образом, мы впервые показали, что Pb²⁺ и Cd²⁺ могут оказывать прямое воздействие на функцию миозина и тонкого филамента, изменяя механические свойства миокарда на молекулярном уровне и увеличивая риск сердечно-сосудистых заболеваний. Учитывая способность Pb²⁺ и Cd²⁺ к накоплению в миокарде, это является серьезной проблемой для населения, проживающего в экологически неблагоприятных условиях. Поэтому исследование механизмов влияния двухвалентных катионов свинца и кадмия на функцию миозина и НТФ не только вносит вклад в копилку фундаментальных знаний, но и может быть использовано для дальнейшей разработки эффективных стратегий профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Вклад авторов. Герцен О.П., Никитина Л.В. – концептуализация и руководство работой; Потоскуева Ю.К., Цыбина А.Е., Мячина Т.А., Герцен О.П. – проведение экспериментов и обсуждение результатов исследования; Потоскуева Ю.К., Мячина Т.А., Герцен О.П. – написание текста; Герцен О.П., Никитина Л.В. – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-74-00128).

Благодарности. Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования ИИФ УрО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haselgrove, J. C., and Huxley, H. E. (1973) X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle, *J. Mol. Biol.*, **77**, 549-568, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90222-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90222-2).
2. Gordon, A. M., Homsher, E., and Regnier, M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle, *Physiol. Rev.*, **80**, 853-924, <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>.
3. Walklate, J., Ferrantini, C., Johnson, C. A., Tesi, C., Poggesi, C., and Geeves, M. A. (2021) Alpha and beta myosin isoforms and human atrial and ventricular contraction, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 7309-7337, <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03971-y>.
4. Yamashita, H. (2003) Myosin light chain isoforms modify force-generating ability of cardiac myosin by changing the kinetics of actin-myosin interaction, *Cardiovasc. Res.*, **60**, 580-588, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.09.011>.
5. Da Silva, A. C. R., Kendrick-Jones, J., and Reinach, F. C. (1995) Determinants of ion specificity on EF-hands sites, *J. Biol. Chem.*, **270**, 6773-6778, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6773>.
6. Sitbon, Y. H., Yadav, S., Kazmierczak, K., and Szczesna-Cordary, D. (2020) Insights into myosin regulatory and essential light chains: a focus on their roles in cardiac and skeletal muscle function, development and disease, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **41**, 313-327, <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09517-x>.
7. Walker, B. C., Walczak, C. E., and Cochran, J. C. (2021) Switch-1 instability at the active site decouples ATP hydrolysis from force generation in myosin II, *Cytoskeleton*, **78**, 3-13, <https://doi.org/10.1002/cm.21650>.
8. Gordon, A. M., Regnier, M., and Homsher, E. (2001) Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin “rocks and rolls,” *Physiology*, **16**, 49-55, <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.2.49>.
9. World Health Organization (2019) *The Public Health Impact of Chemicals: Knowns and Unknowns*. Data Addendum for 2019.
10. Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., and Yang, L. (2016) A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **23**, 8244-8259, <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>.
11. Rosin, A. (2009) The long-term consequences of exposure to lead, *Isr. Med. Assoc. J.*, **11**, 689-694.
12. Suwazono, Y., Kido, T., Nakagawa, H., Nishijo, M., Honda, R., Kobayashi, E., Dochi, M., and Nogawa, K. (2009) Biological half-life of cadmium in the urine of inhabitants after cessation of cadmium exposure, *Biomarkers*, **14**, 77-81, <https://doi.org/10.1080/13547500902730698>.
13. Ali, S., Awan, Z., Mumtaz, S., Shakir, H. A., Ahmad, F., Ulhaq, M., Tahir, H. M., Awan, M. S., Sharif, S., Irfan, M., and Khan, M. A. (2020) Cardiac toxicity of heavy metals (cadmium and mercury) and pharmacological intervention by vitamin C in rabbits, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **27**, 29266-29279, <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09011-9>.

14. Davuljigari, C. B., and Gottipolu, R. R. (2020) Late-life cardiac injury in rats following early life exposure to lead: reversal effect of nutrient metal mixture, *Cardiovasc. Toxicol.*, **20**, 249-260, <https://doi.org/10.1007/s12012-019-09549-2>.
15. Tai, Y.-T., Chou, S.-H., Cheng, C.-Y., Ho, C.-T., Lin, H.-C., Jung, S.-M., Chu, P.-H., and Ko, F.-H. (2022) The preferential accumulation of cadmium ions among various tissues in mice, *Toxicol. Rep.*, **9**, 111-119, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.01.002>.
16. Borné, Y., Barregard, L., Persson, M., Hedblad, B., Fagerberg, B., and Engström, G. (2015) Cadmium exposure and incidence of heart failure and atrial fibrillation: a population-based prospective cohort study, *BMJ Open*, **5**, e007366, <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-007366>.
17. Ruiz-Hernandez, A., Navas-Acien, A., Pastor-Barriuso, R., Crainiceanu, C. M., Redon, J., Guallar, E., and Tellez-Plaza, M. (2017) Declining exposures to lead and cadmium contribute to explaining the reduction of cardiovascular mortality in the US population, 1988-2004, *Int. J. Epidemiol.*, **46**, 1903-1912, <https://doi.org/10.1093/ije/dyx176>.
18. Messner, B., Knoflach, M., Seubert, A., Ritsch, A., Pfaller, K., Henderson, B., Shen, Y. H., Zeller, I., Willeit, J., Laufer, G., Wick, G., Kiechl, S., and Bernhard, D. (2009) Cadmium is a novel and independent risk factor for early atherosclerosis mechanisms and *in vivo* relevance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **29**, 1392-1398, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.190082>.
19. Fatima, G., Raza, A. M., Hadi, N., Nigam, N., and Mahdi, A. A. (2019) Cadmium in human diseases: it's more than just a mere metal, *Indian J. Clin. Biochem.*, **34**, 371-378, <https://doi.org/10.1007/s12291-019-00839-8>.
20. Ferreira De Mattos, G., Costa, C., Savio, F., Alonso, M., and Nicolson, G. L. (2017) Lead poisoning: acute exposure of the heart to lead ions promotes changes in cardiac function and Cav1.2 ion channels, *Biophys. Rev.*, **9**, 807-825, <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0303-5>.
21. Ferreira, G., Santander, A., Chavarría, L., Cardozo, R., Savio, F., Sobrevia, L., and Nicolson, G. L. (2022) Functional consequences of lead and mercury exposomes in the heart, *Mol. Aspects Med.*, **87**, 101048, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101048>.
22. Fiorese, M., Furieri, L. B., Simões, M. R., Ribeiro, R. F., Jr, Meira, E. F., Fernandes, A. A., Stefanon, I., and Vassallo, D. V. (2013) Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **46**, 178-185, <https://doi.org/10.1590/1414-431X20122190>.
23. Javorac, D., Tatović, S., Anđelković, M., Repić, A., Baralić, K., Djordjevic, A. B., Mihajlović, M., Stevuljević, J. K., Đukić-Čosić, D., Čurčić, M., Antonijević, B., and Bulat, Z. (2022) Low-lead doses induce oxidative damage in cardiac tissue: Subacute toxicity study in Wistar rats and Benchmark dose modelling, *Food Chem. Toxicol.*, **161**, 112825, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112825>.
24. Patra, R. C., Rautray, A. K., and Swarup, D. (2011) Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration, *Vet. Med. Int.*, **2011**, 1-9, <https://doi.org/10.4061/2011/457327>.
25. Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., and Krishna Rao, K. M. (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 1434-1443, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010>.
26. Chou, S.-H., Lin, H.-C., Chen, S.-W., Tai, Y.-T., Jung, S.-M., Ko, F.-H., Pang, J.-H. S., and Chu, P.-H. (2023) Cadmium exposure induces histological damage and cytotoxicity in the cardiovascular system of mice, *Food Chem. Toxicol.*, **175**, 113740, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113740>.
27. Li, C., Shi, L., Peng, C., Yu, G., Zhang, Y., and Du, Z. (2021) Lead-induced cardiomyocytes apoptosis by inhibiting gap junction intercellular communication via autophagy activation, *Chem. Biol. Interact.*, **337**, 109331, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109331>.
28. Shen, J., Wang, X., Zhou, D., Li, T., Tang, L., Gong, T., Su, J., and Liang, P. (2018) Modelling cadmium-induced cardiotoxicity using human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 4221-4235, <https://doi.org/10.1111/jcmm.13702>.
29. Katsnelson, B. A., Klinova, S. V., Gerzen, O. P., Balakin, A. A., Lookin, O. N., Lisin, R. V., Nabiev, S. R., Privalova, L. I., Minigalieva, I. A., Panov, V. G., Katsnelson, L. B., Nikitina, L. V., Kuznetsov, D. A., and Protsenko, Y. L. (2020) Force-velocity characteristics of isolated myocardium preparations from rats exposed to subchronic intoxication with lead and cadmium acting separately or in combination, *Food Chem. Toxicol.*, **144**, 111641, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111641>.
30. Klinova, S. V., Minigalieva, I. A., Protsenko, Y. L., Sutunkova, M. P., Ryabova, I. V., Gerzen, O. P., Nabiev, S. R., Balakin, A. A., Lookin, O. N., Lisin, R. V., Kuznetsov, D. A., Privalova, L. I., Panov, V. G., Chernyshov, I. N., Katsnelson, L. B., Nikitina, L. V., and Katsnelson, B. A. (2021) Analysis of changes in the rat cardiovascular system under the action of lead intoxication and muscular exercise, *Hyg. Sanit.*, **100**, 1467-1474, <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1467-1474>.
31. Protsenko, Y. L., Klinova, S. V., Gerzen, O. P., Privalova, L. I., Minigalieva, I. A., Balakin, A. A., Lookin, O. N., Lisin, R. V., Butova, K. A., Nabiev, S. R., Katsnelson, L. B., Nikitina, L. V., and Katsnelson, B. A. (2020) Changes

- in rat myocardium contractility under subchronic intoxication with lead and cadmium salts administered alone or in combination, *Toxicol. Rep.*, **7**, 433-442, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.03.001>.
32. Protsenko, Y. L., Katsnelson, B. A., Klinova, S. V., Lookin, O. N., Balakin, A. A., Nikitina, L. V., Gerzen, O. P., Minigalieva, I. A., Privalova, L. I., Gurchich, V. B., Sutunkova, M. P., and Katsnelson, L. B. (2018) Effects of subchronic lead intoxication of rats on the myocardium contractility, *Food Chem. Toxicol.*, **120**, 378-389, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.034>.
 33. Gerzen, O. P., Nabiev, S. R., Klinova, S. V., Minigalieva, I. A., Sutunkova, M. P., Katsnelson, B. A., and Nikitina, L. V. (2022) Molecular mechanisms of mechanical function changes of the rat myocardium under subchronic lead exposure, *Food Chem. Toxicol.*, **169**, 113444, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113444>.
 34. Tang, N., Liu, X., Jia, M.-R., Shi, X.-Y., Fu, J.-W., Guan, D.-X., and Ma, L. Q. (2022) Amine- and thiol-bifunctionalized mesoporous silica material for immobilization of Pb and Cd: Characterization, efficiency, and mechanism, *Chemosphere*, **291**, 132771, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132771>.
 35. De Souza, I. D., De Andrade, A. S., and Dalmolin, R. J. S. (2018) Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning, *Crit. Rev. Toxicol.*, **48**, 375-386, <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387>.
 36. Kirberger, M., and Yang, J. J. (2008) Structural differences between Pb²⁺- and Ca²⁺-binding sites in proteins: Implications with respect to toxicity, *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 1901-1909, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.06.014>.
 37. Yu, H., Zhen, J., Xu, J., Cai, L., Leng, J., Ji, H., and Keller, B. B. (2020) Zinc protects against cadmium-induced toxicity in neonatal murine engineered cardiac tissues via metallothionein-dependent and independent mechanisms, *Acta Pharmacol. Sin.*, **41**, 638-649, <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0320-y>.
 38. Vassallo, D. V., Lebarch, E. C., Moreira, C. M., Wiggers, G. A., and Stefanon, I. (2008) Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **41**, 789-795, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008000900008>.
 39. Chao, S., Bu, C.-H., and Cheung, W. Y. (1990) Activation of troponin C by Cd²⁺ and Pb²⁺, *Arch. Toxicol.*, **64**, 490-496, <https://doi.org/10.1007/BF01977632>.
 40. Chao, S. H., Suzuki, Y., Zysk, J. R., and Cheung, W. Y. (1984) Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius, *Mol. Pharmacol.*, **26**, 75-82.
 41. Shirran, S. L., and Barran, P. E. (2009) The use of ESI-MS to probe the binding of divalent cations to calmodulin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **20**, 1159-1171, <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.02.008>.
 42. Butova, X. A., Myachina, T. A., and Khokhlova, A. D. (2021) A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart, *MethodsX*, **8**, 101189, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101189>.
 43. Margossian, S. S., and Lowey, S. (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle, *Methods Enzymol.*, **85**, 55-71, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85009-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85009-x).
 44. Pardee, J. D., and Spudich, J. A. (1982) Purification of muscle actin, *Methods Enzymol.*, **85**, 164-181, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85020-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85020-9).
 45. Li, A., Nelson, S. R., Rahmanseresht, S., Braet, F., Cornachione, A. S., Previs, S. B., O'Leary, T. S., McNamara, J. W., Rassier, D. E., Sadayappan, S., Previs, M. J., and Warshaw, D. M. (2019) Skeletal MyBP-C isoforms tune the molecular contractility of divergent skeletal muscle systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 21882-21892, <https://doi.org/10.1073/pnas.1910549116>.
 46. Gerzen, O. P., Potoskueva, Iu. K., Permyakova, Yu. V., Grebenshchikova, A. V., Selezneva, I. S., and Nikitina, L. V. (2022) SDS-PAGE for myosin heavy chains: fast and furious, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **58**, S92-S97, <https://doi.org/10.1134/S0022093022070109>.
 47. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
 48. Nikitina, L. V., Kopylova, G. V., Shchepkin, D. V., Nabiev, S. R., and Bershitsky, S. Y. (2015) Investigations of molecular mechanisms of actin-myosin interactions in cardiac muscle, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1748-1763, <https://doi.org/10.1134/S0006297915130106>.
 49. Haeberle, J. R., and Hemric, M. E. (1995) Are actin filaments moving under unloaded conditions in the in vitro motility assay? *Biophys. J.*, **68**, 306S-310S; discussion 310S-311S.
 50. Gerzen, O. P., Votnova, V. O., Potoskueva, I. K., Tzybina, A. E., and Nikitina, L. V. (2023) Direct effects of toxic divalent cations on contractile proteins with implications for the heart: unraveling mechanisms of dysfunction, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10579, <https://doi.org/10.3390/ijms241310579>.
 51. Ge, J., Gargey, A., Nesmelova, I. V., and Nesmelov, Y. E. (2019) CaATP prolongs strong actomyosin binding and promotes futile myosin stroke, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **40**, 389-398, <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09556-4>.
 52. Polosukhina, K., Eden, D., Chinn, M., and Highsmith, S. (2000) CaATP as a substrate to investigate the myosin lever arm hypothesis of force generation, *Biophys. J.*, **78**, 1474-1481, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76700-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76700-2).

53. Snyder, E. E., Buoscio, B. W., and Falke, J. J. (1990) Calcium(II) site specificity: effect of size and charge on metal ion binding to an EF-hand-like site, *Biochemistry*, **29**, 3937-3943, <https://doi.org/10.1021/bi00468a021>.
54. Kopp, S. J., Bárány, M., Erlanger, M., Perry, E. F., and Perry, H. M. (1980) The influence of chronic low-level cadmium and/or lead feeding on myocardial contractility related to phosphorylation of cardiac myofibrillar proteins, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 48-56, [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(80\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(80)90007-1).
55. Ćirović, A., and Tasić, N. (2023) Accumulation of metal(loid)s in myocardial tissue and the mechanisms underlying their cardiotoxic effects, *Med. Podml.*, **74**, 21-25, <https://doi.org/10.5937/mp74-46164>.

CARDIAC MYOSIN AND THIN FILAMENT AS A TARGET FOR LEAD AND CADMIUM DIVALENT CATIONS

O. P. Gerzen*, I. K. Potoskueva, A. E. Tzybina, T. A. Myachina, and L. V. Nikitina

*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
620078 Ekaterinburg, Russia; e-mail: o.p.gerzen@gmail.com*

Lead and cadmium, which are heavy metals widely distributed in the environment, significantly contribute to cardiovascular morbidity and mortality. Using Leadmium Green dye, we have shown that lead and cadmium enter the cardiomyocytes, distributing throughout the cell. Using an *in vitro* motility assay, we have shown that the sliding velocity of actin and native thin filaments over myosin decreases with increasing concentrations of Pb^{2+} and Cd^{2+} . Significantly lower concentrations of Pb^{2+} and Cd^{2+} (0.6 mM) were required to stop the movement of thin filaments over myosin compared to stopping actin movement over the same myosin (1.1-1.6 mM). A lower concentration of Cd^{2+} (1.1 mM) needed to stop actin movement over myosin compared to the $Pb^{2+}+Cd^{2+}$ combination (1.3 mM) and lead alone (1.6 mM). There were no differences found in the lead and cadmium cations' effects on the relative force developed by myosin heads or the number of actin filaments bound to myosin. The sliding velocity of actin over myosin in the left atrium, right and left ventricles changed equally when exposed to the same dose of the same metal. Thus, we have demonstrated for the first time that Pb^{2+} and Cd^{2+} can directly affect myosin and thin filament function, with Cd^{2+} exerting a more toxic influence on myosin function compared to Pb^{2+} .

Keywords: myosin, thin filament, lead, cadmium, cardiac muscle

РАЗНОНАПРАВЛЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *TRIM* В ОТВЕТЕ ВРОЖДЕННОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Обзор

© 2024 В.В. Ненашева, Е.А. Степаненко*, В.З. Тарантул

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: katishsha@mail.ru

Поступила в редакцию 01.03.2024

После доработки 30.04.2024

Принята к публикации 08.06.2024

Мультигенное семейство *TRIM* является важным компонентом врожденной иммунной системы. Долгое время считалось, что основная функция генов этого семейства заключается в антивирусной защите организма хозяина. Менее изученным оставался вопрос об их участии в ответе иммунной системы на бактериальную инвазию. Настоящий обзор представляет собой первый комплексный анализ механизмов действия генов семейства *TRIM* в ответе на бактериальные инфекции, который расширяет существующие представления о роли *TRIM* в работе врожденной иммунной системы. При инфицировании разными видами бактерий отдельные белки *TRIM* регулируют в клетках воспалительный, интерфероновый и другие ответы иммунной системы, влияют на процессы аутофагии и апоптоза. Механизмы работы белков *TRIM* в ответе на бактериальную инфекцию, как и при вирусной инфекции, часто включают одно из основных свойств этих белков – убиквитинирование, а также различные белок-белковые взаимодействия как с бактериальными белками, так и с белками клеток хозяина. При этом, наряду с антибактериальным действием, некоторые белки *TRIM*, наоборот, могут способствовать развитию инфекции. При общей схожести механизмов, используемых разными членами семейства *TRIM* в ответ на вирусные и бактериальные инфекции, конечный результат действия этих белков иногда существенно различается. Новые данные по влиянию белков *TRIM* на бактериальные инфекции вносят важный вклад в более детальное понимание функционирования врожденной иммунной системы животных и человека при взаимодействии с патогенами. Эти данные могут быть также использованы для поиска новых мишеней для антибактериальной защиты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гены *TRIM*, бактерии, врожденный иммунитет.

DOI: 10.31857/S0320972524070076 **EDN:** WNDPJG

ВВЕДЕНИЕ

Врожденная иммунная система млекопитающих защищает организм от заболеваний бактериальной, вирусной или грибковой природы путем узнавания и удаления патогенов при помощи множества различных молекулярных процессов. Первым этапом в активации этой системы явля-

ется взаимодействие рецепторов распознавания паттерна (PRR) (толл-подобные рецепторы (TLR), лектины С-типа, NOD-подобные рецепторы (NLR), RIG-I-подобные рецепторы и AIM2-подобные рецепторы) с консервативными структурами патогенов – патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP) (липиды, белки и нуклеиновые кислоты). PAMP обычно имеют уникальные

Принятые сокращения: *ISG* – интерферон-стимулируемый ген; *LPS* – липополисахарид; *MAPK* – митоген-активируемые протеинкиназы; *NLR* – NOD-подобные рецепторы; *NLRP3* – NOD-подобный рецепторный белок 3; *PAMP* – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; *PRR* – рецепторы распознавания паттерна; *SUMO* – малый убиквитин-подобный белок-модификатор; *TLR* – толл-подобные рецепторы; *TRIM* – трехчастный мотив.

* Адресат для корреспонденции.

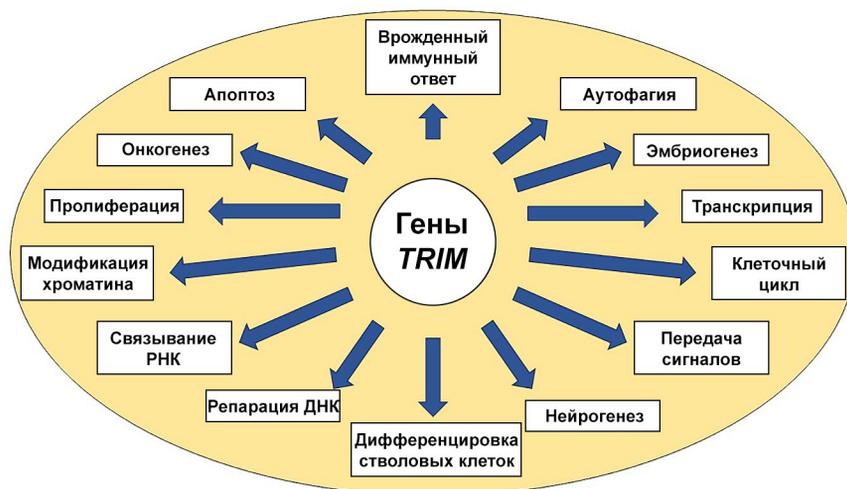


Рис. 1. Основные функции генов семейства *TRIM* в клетке

молекулярные или субмолекулярные характеристики, отсутствующие в клетках хозяина, благодаря чему иммунные клетки распознают их при помощи PRR [1, 2]. Взаимодействие PRR с патогеном инициирует различные иммунные ответы, в том числе продукцию цитокинов и инициацию провоспалительной и адаптивной иммунных реакций, а также высвобождение интерферонов (IFN), которые индуцируют экспрессию сотен интерферон-стимулируемых генов (*ISG*) [3], необходимых для подавления инфекции.

Хотя на сегодняшний день основные компоненты врожденного иммунитета достаточно хорошо изучены, очевидно, что имеет место гораздо более сложная схема взаимодействия многочисленных факторов, регулирующих сигнальные пути врожденной иммунной системы и экспрессию генов при воздействии разных патогенов. В частности, многие *ISG*, к которым относятся и большинство генов семейства трехчастных мотивов (*TRIM*), играют важную роль в передаче сигнала от рецепторов врожденного иммунитета в клетке к транскрипционным факторам (в частности, NF-κB, AP-1, IRF3, IRF7 и др.), запускающим ответ врожденной иммунной системы на патогены [4].

Семейство генов *TRIM* кодирует свыше 80 различных белков, объединенных консервативной структурой, состоящей из трех доменов: RING, B-box и CC, которые вместе образуют мотив RBCC, находящийся на N-конце. Домен RING является цинк-связывающим и обеспечивает E3-убиквитинлигазную активность, а также способен катализировать прямой перенос SUMO (малый убиквитин-подобный белок-модификатор) и ISG15 на специфические белковые субстраты. Домены типа B-box, как и RING, тоже являются цинк-связывающими и могут проявлять E3-убиквитинлигазную

активность [5]. Однако основная предполагаемая роль доменов B-box – участие в создании необходимой структуры белка при димеризации и олигомеризации мономеров белков *TRIM* совместно с доменом CC, а также при осуществлении *TRIM* E3-убиквитинлигазной реакции [6]. C-Концевой регион белков *TRIM* может содержать один или несколько типичных мотивов, в зависимости от представленности которых семейство белков *TRIM* было разделено на 11 подгрупп (C1–C11) [7]. Различные C-концевые мотивы определяют вариативность свойств, которые проявляют белки семейства *TRIM* [7–10]. В настоящее время установлено, что белки семейства *TRIM* принимают участие во множестве биологических процессов в клетках (рис. 1), и нарушения в их работе могут приводить к развитию различных патологий [7, 9, 11, 12].

Впервые белки *TRIM* привлекли к себе внимание исследователей в качестве важных участников противовирусной защиты организма [13–17]. Было показано, что некоторые из этих белков могут напрямую взаимодействовать с компонентами вирусов и подавлять их размножение. Кроме того, белки этого семейства способны опосредованно регулировать сигнальные пути врожденного иммунитета в ответ на вирусную инфекцию [18]. Однако роль белков *TRIM* в ответе иммунной системы на различные бактериальные инфекции долгое время оставалась малоизученной. Только недавно стали появляться данные об изменении экспрессии множества генов *TRIM* при различных бактериальных инфекциях [19, 20], что предполагает их вовлеченность в ответ иммунной системы на эти патогены. Так, Chen et al. [19] показали, что у пациентов с туберкулезом, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis*, из 72 проанализированных генов семейства *TRIM* экспрессия 20 генов

была подавлена по сравнению со здоровыми пациентами. Сходные результаты были получены и на макрофагах, инфицированных *Mycobacterium smegmatis* [19]. Stepanenko et al. [20] показали, что после инфекции такими бактериями, как *Pseudomonas aeruginosa* и *Chlamydia* spp., большинство из 75 проанализированных генов *TRIM* активировались в клетках A549 и в легких мышей и подавлялись в линиях U937 и PC3 человека и лимфатических узлах мышей. Это свидетельствует в пользу того, что множество генов семейства *TRIM* вовлечены в реакцию врожденного иммунитета на различные бактериальные инфекции. В данном обзоре мы анализируем разнообразные механизмы участия мультигенного семейства *TRIM* в регуляции сигнальных путей врожденного иммунитета при бактериальных инфекциях и проводим их сравнение с механизмами, работающими при антивирусном ответе. Особенности функционирования генов *TRIM* в ходе иммунного ответа на бактериальные инвазии обобщены в конце обзора.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА *TRIM* В ОТВЕТ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

В табл. 1 обобщены имеющиеся к началу 2024 года данные, указывающие на вовлеченность почти двух десятков членов семейства *TRIM* в иммунные ответы на различные типы бактериальных инфекций и на воздействие липополисахаридов (LPS), которые имитируют взаимодействие с грамотрицательными (G⁻) бактериями.

В процессе эволюции иммунной системы млекопитающих были выработаны различные

механизмы, призванные препятствовать развитию микробной инфекции и регулировать воспалительные ответы. Бактерии, со своей стороны, также используют множество различных механизмов, чтобы обеспечить свое выживание, модулируя ключевые сигнальные пути хозяина и влияя на посттрансляционные модификации ключевых белков, чтобы ослабить врожденный иммунный ответ хозяина [21]. Такое «перетягивание каната» [22] проявляется в том, что в процессе эволюции у бактерий появилось различное эффективное молекулярное «оружие» для борьбы с врожденным иммунитетом, в частности, обширный набор эффекторов вирулентности, используемых для подавления иммунитета хозяина путем захвата процесса убиквитинирования хозяина, в котором участвуют белки *TRIM* [23].

Подавляющее большинство белков *TRIM* действуют как E3-убиквитинлигазы и катализируют прямой перенос убиквитина, а также SUMO и ISG15 на специфические белковые субстраты [24]. Убиквитинирование представляет собой посттрансляционный процесс ковалентного присоединения молекулы убиквитина, состоящей из 76 аминокислот, к белкам-субстратам [25, 26]. Процесс сумоилирования заключается в присоединении небольшого белка убиквитин-подобного модификатора SUMO [27]. Наконец, ISGилирование представляет собой конъюгацию белка ISG15 с белком-мишенью [28].

Некоторые белки *TRIM* (7, 8, 29, 38, 56, 65) изменяют убиквитинирование и сумоилирование белков-мишеней при ответе на различные бактериальные инфекции (см. табл. 1). Использование ISGилирования белками *TRIM* в ответе на бактериальную инфекцию к настоящему моменту не было обнаружено.

Таблица 1. Молекулярные механизмы действия белков семейства *TRIM* в ответ на бактериальные инфекции

TRIM	Бактерии/LPS	Механизм действия
TRIM7	LPS	повышает продукцию TNF α , IL-6 и IFN- β в макрофагах [37]
	<i>Listeria monocytogenes</i>	положительно регулирует накопление аутофагосом, способствуя K63-убиквитинированию ATG7 и подавлению инфекции [71]
TRIM8	LPS; <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	подавляет TLR3/4-опосредованный врожденный иммунный ответ и воспалительный ответ (TNF α , IL-6, Rantes и IFN- β), осуществляя K6- и K33-убиквитинирование TRIF [30]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	способствует K63-убиквитинированию TAK1, что приводит к активации NF- κ B, выработке провоспалительных цитокинов и усилению инфекции у мышей [32]
	LPS	усиливает LPS-индуцированное воспаление (TNF α , IL-6, IL-1 β) посредством активации NF- κ B в эпителиальных клетках легких [31]
	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i>	экспрессия гена в легких инфицированных мышей и в человеческих промоноцитах U-937 повышается при инфекциях [20]

Таблица 1 (продолжение)

TRIM	Бактерии/LPS	Механизм действия
TRIM14	<i>L. monocytogenes</i>	ингибирует инфекцию при помощи нетранскрипционного механизма, вероятнее всего, прямым взаимодействием с патогеном [83]
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	взаимодействует с cGAS и TBK1, способствуя активации STAT3, ограничению сигналинга IFNAR и подавлению интерферонового ответа [61]
TRIM16	<i>M. tuberculosis</i>	взаимодействует с Галектином 3 и ключевыми регуляторами аутофагии ULK1 и Beclin 1, что приводит к активации селективной аутофагии и защите клеток от инфекции [73]
TRIM20	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	бактериальный фактор вирулентности YopE активирует инфламмосомы с TRIM20/пирин, что приводит к снижению титра бактерии [41]
	<i>Yersinia pestis</i>	бактериальный фактор вирулентности YopM взаимодействует с TRIM20, что приводит к ингибированию работы инфламмосом и усилению вирулентности бактерии [41]
	<i>Clostridium difficile</i>	при инфекции активируются инфламмосомы с TRIM20 и секреция макрофагами IL-1 β и IL-18 [40]
	<i>Francisella novicida</i>	стимулирует AIM2-опосредованную передачу сигналов воспаления и гибель инфицированных клеток [81]
TRIM21	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	способствует внутриклеточной нейтрализации бактерий, покрытых антителами (ADIN) [75]; накопление TRIM21 в лизосомах при инфекции приводит к усилению гибели инфицированных макрофагов [74]
TRIM22	<i>M. tuberculosis</i>	подавляет инфекцию, усиливая аутофагию через сигнальный путь NF- κ B/Beclin 1 [76]
TRIM25	<i>M. tuberculosis</i>	способствует выживанию микобактерий в клетках, усиливая p38 и подавляя NF- κ B сигнальные пути продукции воспалительных цитокинов [52]
TRIM27	<i>M. tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i>	стимулирует апоптоз в макрофагах [49]; снижает выживаемость микобактерий за счет усиления воспалительного ответа, активируя сигнальный путь JNK/p38 и подавляя активацию NF- κ B [49]
	LPS	снижает апоптоз и ингибирует активность сигнального пути TLR4/NF- κ B в легочных фибробластах [36]
TRIM28	<i>Helicobacter pylori</i>	регулирует фосфорилирование TAK1, I κ B-киназ, IKK α /IKK β и MAP-киназ, активность NF- κ B и экспрессию IL-8 в зараженных эпителиальных клетках [35]
	LPS	сумоилирует NLRP3, защищая его от протеасомной деградации, и активирует инфламмосомы [45]
TRIM29	LPS; <i>Haemophilus influenzae</i>	способствует разрушению NEMO через K48-убиквитинирование, что приводит к ингибированию экспрессии IFN-I и провоспалительных цитокинов [63]
TRIM31	LPS; <i>Shigella flexneri</i>	индуцирует ATG5/7-независимое образование аутолизосом в эпителиальных клетках; напрямую взаимодействует с фосфатидилэтаноламином с последующей стимуляцией образования аутолизосом и удаления патогена из клеток кишечника [72]
	<i>H. pylori</i>	негативно регулирует активацию инфламмосом NLRP3 и секрецию IL-1 β , подавляя накопление поврежденных митохондрий и активных форм кислорода, а также ускоряя аутофагию и поддерживая лизосомальную функцию при инфекции [46]

Таблица 1 (окончание)

TRIM	Бактерии/LPS	Механизм действия
TRIM32	LPS; <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	направляет TRIF для TAX1BP1-опосредованной селективной аутофагии, таким образом негативно регулируя иммунный ответ TLR3/4 и транскрипцию воспалительных генов, защищая от инфекции <i>S. enterica</i> и воздействия LPS [78]
	<i>M. tuberculosis</i>	способствует разрушению патогена посредством аутофагии [79]
	<i>L. monocytogenes</i>	снижает рекрутирование клеток врожденного иммунитета и их способность уничтожить бактерии за счет снижения продукции iNOS и секреции хемокинов [51]
	<i>Streptococcus suis</i>	способствует выживанию бактерий в крови, вызывая более высокий уровень бактериемии и чрезмерный провоспалительный иммунный ответ [50]
TRIM38	LPS; <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	негативно влияет на TLR3/4-опосредуемые интерфероновый (I типа) и воспалительный (TNF α и IL-1 β) ответы; способствует K48-полиубиквитинированию TRIF с последующей протеасомной деградацией [33]
TRIM56	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	бактериальный эффектор SopA усиливает убиквитинирование TRIM56, активируя способность этого белка стимулировать экспрессию IFN- β через RIG-I и MDA5 рецепторы [62]; бактериальный эффектор SopA при взаимодействии убиквитинирует TRIM56 и способствует его протеасомной деградации [85]
TRIM60	LPS; <i>L. monocytogenes</i>	способствует развитию инфекции, подавляя образование и активацию TAK1-сигналом, вызываемую сумоилированием TAB2 и последующей активацией митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK) и NF- κ B [34]
TRIM65	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	бактериальный эффектор SopA усиливает убиквитинирование TRIM65, активируя способность этого белка стимулировать экспрессию IFN- β через MDA5 [62]; бактериальный эффектор SopA убиквитинирует TRIM65 и способствует его протеасомной деградации [85]
	LPS	с помощью K48-убиквитинирования и деградации VCAM-1 подавляет воспаление в легких [47]; экспрессия гена подавляется путем активации сигнального пути MAPK [48]
TRIM72	<i>P. aeruginosa</i>	в мышинных альвеолярных макрофагах ингибирует фагоцитоз, управляемый рецептором комплемента CR1g; гиперэкспрессия гена способствует развитию инфекции, усиливая активацию NF- κ B [53]

Однако механизмы работы TRIM при бактериальных инфекциях не исчерпываются их E3-убиквитинлигазой активностью. Далее мы остановимся на основных процессах, в которых принимают участие TRIM в ответ на бактериальные патогены, и сравним их с ответом на вирусные инфекции.

Воспалительный ответ. Воспаление в ответ на инфекцию патогенами является важным механизмом врожденного иммунного ответа. При этом в функции врожденного иммунитета входит как активация, так и подавление чрезмерного воспаления, которое приводит к повреждению клеток и тканей. В последнее время установлено, что

многие гены *TRIM* играют важную роль в регуляции воспаления при бактериальной инфекции.

После запуска иммунного ответа на бактериальную инфекцию, осуществляемого TLR, включается сигнальный путь транскрипционного фактора NF- κ B. NF- κ B активирует транскрипцию генов, кодирующих многие провоспалительные цитокины и хемокины (в первую очередь TNF α и IL-1 β) [29]. При бактериальных инфекциях в этом процессе активно и, что удивительно, разнонаправленно участвуют отдельные белки TRIM (рис. 2).

Так, например, в ответ на воздействие LPS и инфекцию *Salmonella enterica* serovar Typhimurium у мышей TRIM8 осуществляет K6- и K33-полиуби-

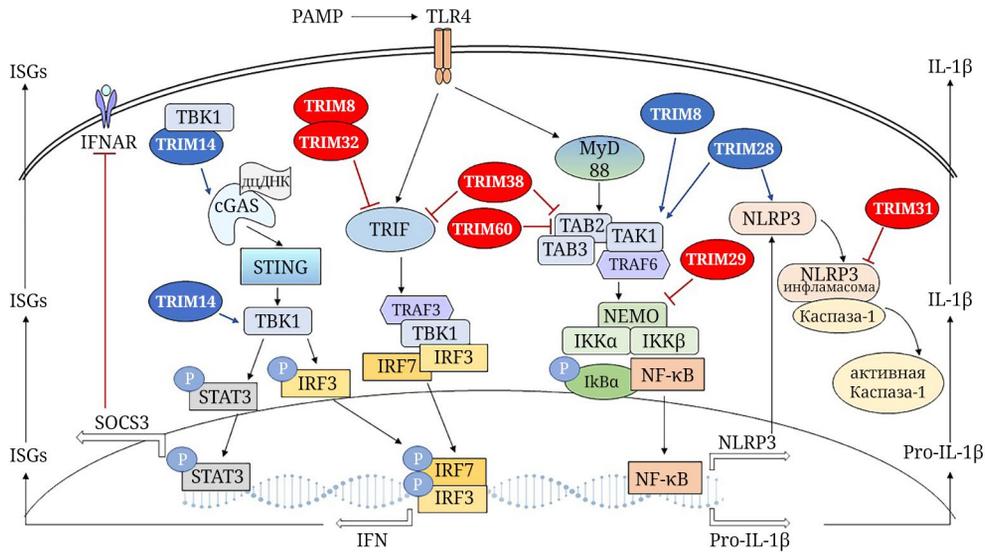


Рис. 2. Регуляция воспалительного ответа врожденного иммунитета белками TRIM при бактериальных инфекциях. Белки TRIM в красных кружках подавляют иммунный ответ, в темно-синих – усиливают иммунный ответ

квитинирование TRIF, что нарушает его взаимодействие с TBK1 и подавляет TLR3/4-опосредованный врожденный иммунный ответ (индукцию TNF α , IL-6, Rantes и IFN- β) [30]. Подавление экспрессии гена *TRIM8* приводило к повышенной восприимчивости мышей к сальмонеллезной инфекции и потере веса. Также *TRIM8* усиливает LPS-индуцированное воспаление (TNF α , IL-6, IL-1 β) посредством активации NF- κ B в эпителиальных клетках легких [31].

В то же время при инфекции *P. aeruginosa* подавление экспрессии гена *TRIM8* снижало K63-полиубиквитинирование TAK1, что приводило к подавлению сигнального пути NF- κ B выработки провоспалительных цитокинов и уменьшению количества бактерий на роговице мышей [32]. Таким образом, в зависимости от типа заражающих бактерий *TRIM8* по-разному убиквитинирует разные целевые белки, что приводит к противоположному действию этого белка на бактериальную инфекцию у мышей.

Нокаут гена *TRIM38* при инфекции *S. enterica* или при обработке мышей LPS приводил к повышенной смертности у животных [33]. Было установлено, что *TRIM38* отрицательно регулирует передачу сигналов TLR3/4, катализируя K48-полиубиквитинирование и протеасомную деградацию адаптерного белка TRIF. Во время поздней фазы инфекции IFN-I индуцирует накопление *TRIM38*, который способствует лизосомально-зависимой деградации TAB2 (уже независимо от E3-убиквитинлигазной активности) и отрицательно регулирует передачу сигналов TNF α и IL-1 β . Таким образом, накопление *TRIM38* под действием IFN-I, который вырабатывается для защиты от микроб-

ной инфекции, способствует прекращению ответа врожденного иммунитета на поздней фазе, чтобы предотвратить вредные эффекты повышенной воспалительной реакции.

Под действием LPS на мышей *TRIM60* сумоилирует TAB2, в результате чего нарушается образование комплекса TRAF6/TAB2/TAK1 и подавляется активация нижестоящих сигнальных путей митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) и NF- κ B [34]. В эпителиальных клетках, зараженных *Helicobacter pylori*, *TRIM28* участвует в активации NF- κ B, регулируя фосфорилирование TAK1, I κ B-киназ IKK α /IKK β и МАРК [34] (рис. 2). Кроме того, *TRIM28* способствует усилению экспрессии IL-8 [35]. *TRIM27* способен защищать клетки от действия LPS, ингибируя TLR4/NF- κ B и воспалительный ответ [36]. *TRIM7*, напротив, способствует накоплению воспалительных цитокинов TNF α , IL-6 и IFN- β , индуцируемому LPS в макрофагах, через TLR4-опосредованные сигнальные пути, в том числе с участием МАРК, NF- κ B и IRF3 [37] (рис. 2).

Важнейшими компонентами врожденного иммунного ответа являются инфламмосомы, которые распознают сигналы опасности в цитоплазме клеток и запускают воспалительный сигнальный каскад, приводящий к пироптозу – одному из видов программируемой клеточной гибели [38]. В результате воздействия PAMP сенсоры воспаления образуют мультибелковый комплекс, который активирует каспазу-1. Это приводит к расщеплению субстратов, передаче воспалительных сигналов и гибели воспалительных клеток. *TRIM20*/пирин представляет собой уникальный сенсор, запускающий сборку инфламмосомы в ответ на бактериальные токсины или эффекторы [39].

У TRIM20 домен RING заменен на домен пирин с сохранением остальных доменов семейства TRIM. Было установлено, что энтеротоксин *Clostridium difficile* активирует образование инфламмосом с участием TRIM20 и секрецию воспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18, что приводит к подавлению инфекции [40]. При инфицировании макрофагов бактерией *Yersinia pseudotuberculosis* наблюдали как активацию TRIM20-инфламмосомы белком бактерии YopE, так и ингибирование работы инфламмосомы и усиление вирулентности бактерии, которое осуществлялось в результате прямого взаимодействия бактериального эффектора YopM с TRIM20 [41, 42].

Инфламмосома NLRP3 участвует в защите организма при многих инфекционных заболеваниях посредством модулирования секреции воспалительных цитокинов. Это олигомерный комплекс, который состоит из адаптера ASC, NOD-подобного рецепторного сенсора NLRP3 и каспазы-1 [43]. Активация инфламмосомы NLRP3 приводит к секреции воспалительных медиаторов IL-1 β и IL-18 [44] и подавлению инфекции. В этом процессе участвует белок TRIM28, который под действием LPS на макрофаги мыши сумоилирует и таким образом сохраняет NLRP3, противодействуя подавлению воспалительного ответа [45] (рис. 2). Повышенный клеточный уровень NLRP3 облегчает сборку инфламмосом и усиливает их активацию. Также при инфекции *H. pylori* TRIM31 уменьшает активацию инфламмосом NLRP3 и секрецию IL-1 β , подавляя накопление поврежденных митохондрий и активные формы кислорода, ускоряя аутофагию и поддерживая лизосомальную функцию [46] (рис. 2).

Существуют и другие механизмы участия белков TRIM в индукции воспалительных процессов. Так, при обработке мышей LPS TRIM65 селективно убиквитинирует белок VCAM-1 с его последующей деградацией, а нокаут *TRIM65* у мышей приводит к усилению их гибели из-за повышенной воспалительной реакции [47, 48]. При инфицировании макрофагов *M. tuberculosis* или *Mycobacterium bovis* TRIM27 способствует активации сигнального пути JNK/p38, что усиливает экспрессию воспалительных генов, снижая выживаемость бактерий [49].

Нокаут гена *TRIM32* у мышей снижал уровень бактериемии *Streptococcus suis* [50] и *L. monocytogenes* [51] и продукцию воспалительных цитокинов у инфицированных животных [50, 51], способствуя повышению их выживаемости. При инфицировании *Trim32*^{-/-}-мышей *L. monocytogenes* усиливались синтез индуцируемой NO-синтазы и секреция хемокинов, что приводило к повышенному привлечению нейтрофилов и макрофагов для элиминации бактерий [51]. Было обнаружено, что TRIM25 может способствовать инфекции

M. tuberculosis, усиливая сигнальный путь p38 и подавляя сигнальные пути NF- κ B и продукцию провоспалительных цитокинов [52]. TRIM72 активировал NF- κ B и воспалительный ответ и подавлял фагоцитоз бактерий в макрофагах посредством связывания с рецептором компонента CR1g, что способствовало развитию инфекции *P. aeruginosa* [53]. Интересно, что при вирусной инфекции TRIM72, напротив, способен снижать уровни воспалительных цитокинов и NLRP3-инфламмосом [54].

Таким образом, у животных и человека белки TRIM обладают способностью регулировать воспалительные пути врожденного иммунитета в ответ на бактериальное заражение, однако часто их действие может иметь пробактериальный эффект, возможно, возникший в процессе эволюции в ходе выработки бактериями способов противодействия иммунной системе.

Интерфероновый ответ. IFN представляют собой цитокины, которые индуцируются в ответ на распознавание чужеродного материала рецепторами врожденного иммунитета. Белки IFN обладают мощной противовирусной и противомикробной активностью и являются мишенями для различных патогенов. Факторы IRF3 и IRF7 активируют экспрессию генов *IFN* вследствие запуска сигнальных путей врожденного иммунитета. В этом процессе активно участвует киназа TBK1, которая через IRF3 запускает IFN I типа и вместе с IKK ϵ активирует NF- κ B [55, 56]. IFN передают сигналы аутокринным и паракринным образом через соответствующие рецепторы, активируя сигнальные каскады JAK/STAT, что приводит к экспрессии сотен *ISG*.

Хотя роль *IFN* и *ISG* широко изучалась в контексте вирусной инфекции, данные об их роли при бактериальных инфекциях достаточно противоречивы [22]. Показано, что *IFN-I* может индуцироваться многими бактериальными патогенами, такими как *H. pylori*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Y. pseudotuberculosis*, *M. tuberculosis* и *L. monocytogenes* [57], но при этом действие IFN, кроме положительных эффектов, может приводить к негативным последствиям для хозяина в зависимости от типа и штамма бактерий [22, 58]. Накопление IFN и усиление воспаления, индуцируемые некоторыми бактериями, по-видимому, необходимы для их развития и выживания.

Многие гены *TRIM* относятся к *ISG* и одновременно к генам, индуцирующим интерфероновый ответ [4, 10, 59]. Одним из них является *TRIM14*, который играет множественную роль в регуляции IFN I типа. Белок TRIM14 взаимодействует или с белком MAVS [60], что приводит к стимуляции экспрессии IFN I типа при вирусной инфекции, или с cGAS и/или с TBK1/STAT3,

что способствует блокировке интерферонового рецептора IFNAR и подавлению интерферонового ответа [61]. В макрофагах с нокаутом гена *TRIM14* наблюдалась гипериндукция *IFN-β* и ряда *ISG*, в частности *iNOS*, что приводило к подавлению репликации *M. tuberculosis* [61].

При инфекции *L. monocytogenes* TRIM32 увеличивает секрецию хемокинов, включая *IFN-β* и *IFN-γ*, что снижает рекрутирование клеток врожденного иммунитета к очагам инфекции и способствует выживанию *L. monocytogenes* [51]. В ответ на инфекцию *Str. suis* TRIM32 также способствует увеличению выработки *IFN-γ* [50]. При этом у инфицированных *Trim32^{-/-}*-мышей снижался уровень бактериальной нагрузки по сравнению с мышами дикого типа. Дефицит TRIM32 повышал проницаемость гематоэнцефалического барьера и рекрутирование воспалительных моноцитов на ранних стадиях инфекции *Str. suis*, ограничивая развитие септического шока [50].

У мышей с делецией *TRIM38* после воздействия LPS и при инфекции *S. enterica* усиливалась TLR3- и TLR4-опосредованная индукция *IFN-I* и продукция провоспалительных цитокинов TNFα и IL-6 [33]. При этом мыши *Trim38^{-/-}* были более восприимчивы к *S. enterica*-индуцированной смерти.

S. enterica выработала специфическую адаптацию для запуска воспалительных реакций в кишечном тракте, которая не зависит от стимуляции PRR консервативными бактериальными продуктами. Эффекторный бактериальный белок SopA использует свою E3-убиквитинлигазную активность для усиления выработки *IFN-β* путем прямого воздействия на белки TRIM56 и TRIM65 [62].

При инфекции *Haemophilus influenzae* в макрофагах TRIM29 K48-убиквитинирует белок NEMO, что способствует его деградации и последующему подавлению экспрессии *IFN-I*, воспалительных цитокинов и сигнального пути NF-κB [63] (рис. 2). Следует отметить, что при вирусных инфекциях TRIM29 также снижает продукцию интерферонов и воспалительных цитокинов, хотя и с помощью других механизмов: в ответ на ДНК вирусов (TRIM29 K48-убиквитинирует белок STING [64]) и на вирусную двухцепочечную РНК (TRIM29 K11-убиквитинирует белок MAVS) [65]. При этом нокаут гена *TRIM29* у мышей при вирусной инфекции способствовал выживанию животных [64, 65], в отличие от инфекции бактерией *Haem. influenzae* [63].

Таким образом, известные на сегодняшний день данные свидетельствуют в пользу того, что регуляция генами семейства *TRIM* интерферонового ответа, которая в целом носит противовирусный характер, в условиях бактериальной инфекции часто ведет к снижению выживаемости организма.

Аутофагия и апоптоз. В ответ на бактериальные инфекции многие гены *TRIM* оказывают воздействие на процесс аутофагии, который контролирует приспособленность клеток к условиям среды как в нормальных, так и в стрессовых условиях и играет важную роль во врожденной системе защиты от вирусных и бактериальных инфекций [66–68]. В результате аутофагии происходит эндоцитарная деградация внутриклеточных белков, а также разрушение внутриклеточных патогенов с помощью аутофагосом, слитых с лизосомами [66]. Активация аутофагии во время инфекции не только обеспечивает защиту от вторгшихся патогенов с помощью лизосомальной деградации, но также регулирует передачу сигналов для других путей врожденного иммунитета [69]. Бактерии, в свою очередь, научились манипулировать аутофагией, чтобы избежать иммунных атак и использовать аутофагию для своих целей [70].

Ранее было установлено, что многие белки TRIM являются важнейшими компонентами механизма аутофагии у млекопитающих, в том числе в ходе антивирусной защиты [7, 8]. В последние годы появилось множество сообщений о том, что белки TRIM также принимают участие в этом процессе при бактериальных инфекциях. При этом они как рецепторы могут напрямую узнавать свои мишени (селективная аутофагия или ксенофагия) [68].

Так, установлено, что белки TRIM способны регулировать функции аутофагических белков ATG при бактериальной инфекции (рис. 3). Например, TRIM7 в ответ на инфекцию *L. monocytogenes* осуществляет K63-убиквитинирование ATG7, что способствует накоплению аутофагосом и подавлению бактериальной инфекции [71].

В ответ на инфекцию *Shigella flexneri* или воздействие LPS TRIM31 активирует ATG5/7-независимое образование аутолизосом в эпителиальных клетках, что происходит благодаря прямому взаимодействию этого белка с фосфатидилэтаноламином (PE), который положительно регулирует аутофагию [72].

TRIM16 участвует в защите клеток от *M. tuberculosis* в результате взаимодействия с Галектином 3 и ключевыми регуляторами аутофагии ULK1 и Beclin 1, что приводит к активации селективной аутофагии [73].

Накопление TRIM21 в лизосомах при инфекции *S. enterica* способствует гибели инфицированных макрофагов [74]. Этот белок опосредует внутриклеточную нейтрализацию бактерий *S. enterica*, покрытых антителами, в результате процесса, называемого антитело-зависимая внутриклеточная нейтрализация (ADIN) [75]. Колокализация в клетках TRIM21 и *S. enterica* вместе с аутофагосо-

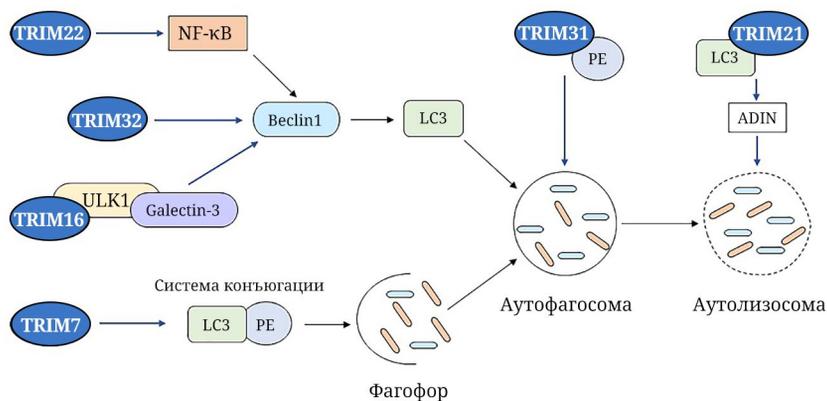


Рис. 3. Участие белков семейства TRIM в регуляции аутофагии при бактериальных инфекциях

мальным маркером LC3 указывает на их участие в аутофагоцитозе. Следует отметить, что подобный механизм используется TRIM21 и по отношению к некоторым вирусам [75], что говорит об общем механизме работы TRIM21 при защите как от вирусной, так и от бактериальной инфекции, который приводит во всех случаях к подавлению инфекций.

TRIM22 подавляет инфекцию *M. tuberculosis*, усиливая аутофагию через сигнальный путь NF-κB/Beclin 1 [76]. Следует отметить, что, в отличие от этого, при вирусной инфекции Денге типа 2 активация пути NF-κB/Beclin 1 посредством TRIM22 приводила к усилению размножения вируса [77].

При инфекции *S. enterica* в процессе аутофагии активно участвует также белок TRIM32 [78]. Белок TRIF привлекается TRIM32 к TAX1BP1-содержащим и LC3-связанным аутофагосомам для деградации, что приводит к прерыванию TLR3/4-опосредованного иммунного и воспалительного ответа на эту инфекцию [78] (рис. 3). При инфицировании первичных макрофагов *M. tuberculosis* TRIM32 также способен индуцировать направленную деградацию бактерий в аутофагосомах [79]. В связи с этим предполагается, что ген *TRIM32* представляет собой многообещающую мишень для лечения туберкулеза.

Таким образом, участие ряда белков TRIM в процессах аутофагии при взаимодействии с бактериями во всех известных случаях приводит к подавлению инфекции.

Следует отметить, что при бактериальной инфекции гены *TRIM* редко принимают участие в процессе апоптоза – еще одной из форм запрограммированной клеточной гибели, которая часто включается иммунитетом при необходимости уничтожить зараженную клетку. Одним из немногих примеров может служить усиление апоптоза под действием *TRIM27* в ответ на инфекцию *M. tuberculosis* [49]. Однако гиперэкспрессия гена *TRIM27* в легочных фибробластах линии WI-38,

напротив, снижала апоптоз под действием LPS, при этом ингибировалась активность сигнального пути TLR4/NF-κB, что приводило к уменьшению воспалительного ответа и выживанию клеток [36]. Таким образом, возможное участие белков TRIM в апоптозе при бактериальных инфекциях требует дополнительных исследований.

При бактериальной инфекции TRIM20 может участвовать еще в одном виде запрограммированной клеточной гибели, называемом ПАНоптозом, который контролируется цитоплазматическим мультимерным белковым комплексом – ПАНоптосомой. ПАНоптосома может параллельно запускать три разных вида клеточной гибели – пироптоз, апоптоз и некроптоз [80]. Было установлено, что при инфекции *Francisella novicida* происходит активация ПАНоптосом с участием TRIM20, что приводит к усилению воспалительного ответа и гибели зараженных клеток [81]. Следует отметить, что этот же механизм используется TRIM20 также при инфекции клеток вирусом простого герпеса 1, что вызывает элиминацию зараженных клеток [81].

Белок-белковое взаимодействие. Одним из важных механизмов подавления репликации вирусов является прямое взаимодействие некоторых белков TRIM с белками вирусов [82]. Наряду с этим постепенно появляются данные и о взаимодействии между отдельными белками TRIM и белками бактерий. Примером такого рода взаимодействий может служить TRIM20/пирин, который, как уже упоминалось выше, обычно запускает сборку инфламмосом в ответ на бактериальные токсины или эффекторы [39]. В результате прямого взаимодействия бактериального эффектора *Y. pestis* YopM с TRIM20 происходило ингибирование работы инфламмосомы и усиление выживаемости бактерии [41, 42]. Интересно отметить, что мутантный TRIM20 менее активно взаимодействует с эффектором *Y. pestis* YopM и тем самым ослабляет YopM-индуцированное подавление IL-1β.

Эти данные позволили выдвинуть предположение, что устойчивость к эпидемиям чумы была селективной силой для определенных мутаций гена *TRIM20* у лиц средиземноморского происхождения [42].

Показано также, что *TRIM27* ограничивает выживаемость *M. tuberculosis* в макрофагах, стимулируя врожденные иммунные реакции и апоптоз клеток. Этот эффект обусловлен тем, что секретруемый эффекторный белок тирозинфосфатаза *PtpA* *M. tuberculosis* может противодействовать активации сигнального пути JNK/p38 MAPK и апоптозу, стимулируемым *TRIM27*, посредством конкурентного связывания с доменом RING *TRIM27* [49].

Perelman et al. [83] показали, что ген *TRIM14* ингибирует инфекцию *L. monocytogenes*, действуя на бактерии через нетранскрипционные механизмы. Авторы предполагают, что это происходит в результате прямого взаимодействия белка *TRIM14* с бактериальными белками. При этом было установлено, что экспрессия других ISG *TRIM* (*TRIM5*, *TRIM21*, *TRIM25*, *TRIM34* и *TRIM38*) не оказывала эффекта на инфекцию *L. monocytogenes* [83]. Следует отметить, что подобный механизм используется *TRIM14* при инфицировании клеток вирусом гриппа. Этот белок избирательно взаимодействует с вирусным нуклеопротеином, что приводит к подавлению репликации вируса [84].

Широкий спектр бактерий приобрел стратегии, направленные на подрыв воспалительных сигнальных и микробицидных программ хозяина. Например, у прокариотических патогенов отсутствует классическая протеасомная система, но конвергентная эволюция смогла сформировать бактериальные белки для приобретения функций убиквитинирования. Такую стратегию использует бактерия *S. enterica*, являющаяся основной причи-

ной пищевых заболеваний во всем мире и вызывающая воспаление в кишечном тракте. У этой бактерии есть убиквитинлигаза *SopA* HECT-типа [62, 85]. По данным Kamanova et al. [62], убиквитинирование *TRIM56* и *TRIM65* с помощью *SopA* усиливает способность этих белков стимулировать экспрессию IFN- β . Однако, по данным Fiskin et al. [85], такое убиквитинирование приводит к протеасомной деградации *TRIM56* и *TRIM65* во время инфекции. Авторы последней работы полагают, что это может служить примером того, как бактериальная лигаза HECT блокирует RING-лигазы хозяина. Дальнейшие исследования помогут разрешить эти противоречия.

СРАВНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА TRIM В ОТВЕТ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

В табл. 2 приводится сопоставление функционирования белков *TRIM* при бактериальных и вирусных инфекциях. Как парадокс эволюции можно рассматривать тот факт, что ряд *TRIM*-белков, обладающих антивирусным действием, способны содействовать развитию бактерий и наоборот. Вероятно, некоторые бактерии используют существующие антивирусные механизмы для своего выживания. Часто встречающиеся осложнения в виде бактериальных инфекций, сопровождающие вирусные инфекции, возможно, связаны с противоречивым действием ряда белков *TRIM*. Поэтому разработка новых антивирусных и антибактериальных препаратов должна учитывать существующие разнонаправленные эффекты белков *TRIM*.

Таблица 2. Сравнение функций белков *TRIM* при бактериальных и вирусных инфекциях

TRIM	Бактерии	Вирусы
TRIM7	<i>Listeria monocytogenes</i> [71]	вирус энцефаломиокардита [86]
TRIM8	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium [29]	вирус гриппа А [87]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [32]	
TRIM14	<i>L. monocytogenes</i> [83]	вирус Эбола [88] вирус гриппа А [84, 89] вирус гепатита В [90]
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> [61]	
TRIM16	<i>M. tuberculosis</i> [73]	вирус гриппа H5N1 [91]
TRIM20	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> [41] <i>Francisella novicida</i> [81]	вирус простого герпеса 1 [81]
	<i>Yersinia pestis</i> [41]	
TRIM21	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium [75]	ДНК- и РНК-содержащие вирусы [92]

Таблица 2 (окончание)

TRIM	Бактерии	Вирусы
TRIM22	<i>M. tuberculosis</i> [76]	вирус Денге серотипа 2 [77]
		SARS-CoV-2 [93] вирус Зика [94] вирус гриппа А [95]
TRIM25	<i>M. tuberculosis</i> [52]	вирус бешенства [96] вирус гепатита В [97] вирус гриппа А [98] вирус Эбола [99]
TRIM27	<i>M. tuberculosis</i> <i>Mycobacterium bovis</i> [49]	вирус гепатита С [100] Сендай-вирус [101]
TRIM28	<i>Helicobacter pylori</i> [35]	SARS-CoV-2 [102] вирус свиной диареи [103] вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней [104]
TRIM29	<i>Haemophilus influenzae</i> [63]	вирус простого герпеса 1 [64] вирус гриппа, реовирус [65]
TRIM31	<i>Shigella flexneri</i> [72] <i>H. pylori</i> [46]	вирус гепатита В [105] Сендай-вирус, вирус простого герпеса 1 [106]
TRIM32	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium [78] <i>M. tuberculosis</i> [79]	вирус гриппа А [107] вирус простого герпеса 1 [108] Сендай-вирус, вирус простого герпеса 1 [109]
	<i>L. monocytogenes</i> [51] <i>Streptococcus suis</i> [50]	
TRIM38	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium [33]	Сендай-вирус, вирус энцефаломиокардита, вирус болезни Ньюкасла, вирус везикулярного стоматита в клетках НЕК293 [110]
		вирус везикулярного стоматита в первичных макрофагах [111]
TRIM56	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium [62]	вирус гепатита В [112] вирус Зика [113] вирус простого герпеса 1 [114] вирус гриппа А, В [115]
TRIM60	<i>L. monocytogenes</i> [34]	
TRIM65	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium [62]	вирус энцефаломиокардита [116]
TRIM72	<i>P. aeruginosa</i> [53]	вирус гриппа А H1N1 [54]

Примечание. Серый цвет – белок TRIM способствует развитию инфекции, белый цвет – TRIM подавляет инфекцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе длительной эволюции у млекопитающих сложилась высокоорганизованная врожденная иммунная система, многие аспекты которой уже хорошо изучены. Эта система состоит из множества «игроков», которые координированно регулируют различные процессы, обеспечивающие защиту организма от патогенов. В то же время

бактерии также эволюционировали совместно с млекопитающими и выработали множество различных механизмов, обеспечивающих свое выживание, которые модулируют ключевые сигнальные пути хозяина, чтобы ослабить врожденный иммунный ответ хозяина [21].

Исследование роли генов семейства *TRIM* в антибактериальном ответе врожденного иммунитета – это одно из новых перспективных направ-

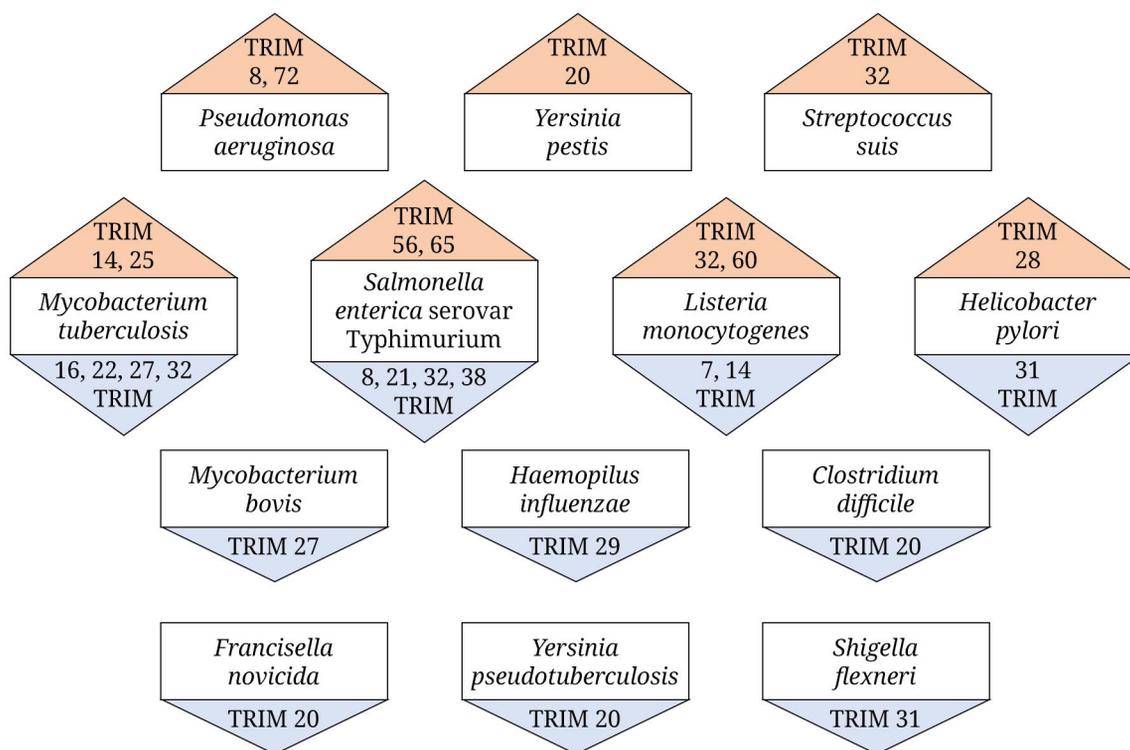


Рис. 4. Разнонаправленные действия белков семейства TRIM, участвующих во врожденном иммунном ответе, на различные виды бактериальных инфекций. В оранжевом треугольнике – белки TRIM, способствующие инфекции, в голубом треугольнике – белки TRIM, подавляющие инфекцию

лений в дальнейшем изучении механизмов функционирования врожденного иммунитета, которое позволяет сделать важный шаг в комплексном понимании молекулярных механизмов передачи внутриклеточных сигнальных каскадов и последующего формирования защитного иммунитета. Несмотря на общее происхождение и сходство доменной организации, разные члены семейства TRIM существенно отличаются по механизмам действия в ответ на бактериальные инфекции. Можно предположить, что наблюдаемые различия в свойствах многочисленных паралога семейства TRIM обусловлены эволюционной пластичностью иммунной системы млекопитающих, которые приспособились использовать различные стратегии борьбы с бактериальными инфекциями, и демонстрируют один из примеров адаптивной эволюции.

Как видно из рис. 4, в ответ на разнообразные бактериальные инфекции разные гены семейства TRIM действуют разнонаправленно, подавляя или, наоборот, стимулируя размножение бактерий.

Например, в ответ на инфекцию *M. tuberculosis* участвуют, по известным на сегодняшний день данным, несколько генов TRIM (14, 16, 22, 25, 27 и 32). При этом механизмы действия этих генов на бактерию существенно отличаются. Важно отметить, что при инфицировании клеток конкретным видом бактерий в процессы врожденной

иммунной системы могут включаться один или несколько генов многочисленного семейства TRIM, увеличение или уменьшение экспрессии каждого из которых приводит в конечном итоге к определенной иммунной реакции на бактериальную инфекцию. При этом каждый ген TRIM является в этом процессе ключевым и незаменимым. Эксперименты по нокауту единичных генов TRIM ясно демонстрируют отсутствие какой-либо компенсации выключения одного гена за счет присутствия других генов TRIM при иммунном ответе. Это свидетельствует о важности в работе врожденного иммунитета каждого гена TRIM, вовлеченного в ответ на определенный вид бактерий.

На основании существующих на сегодняшний день данных о роли генов TRIM в ответе иммунной системы на бактериальные инфекции можно сделать следующие основные выводы.

1. Экспрессия множества генов семейства TRIM изменяется в ответ на инфекции разных видов бактерий, что говорит об их вовлеченности в ответ врожденной иммунной системы на эти патогены. Как и в случае с иммунным ответом на вирусные инфекции, различные гены TRIM запускают механизмы врожденного иммунитета, направленные на элиминацию патогена или усиление инфекции. При этом изменения в экспрессии единичного гена TRIM, приводящие к реакции врожденной иммунной системы

на определенную бактериальную инфекцию, не компенсируются другими многочисленными генами семейства *TRIM*.

2. Спектр молекулярных механизмов иммунного ответа на бактериальные инфекции, используемый различными членами семейства *TRIM*, включает в себя посттранскрипционные модификации, осуществляемые путем убиквитинирования и сумоилирования, прямые белок-белковые взаимодействия, приводящие к активации или подавлению воспалительных и интерфероновых сигнальных путей, а также к запуску процессов аутофагии и апоптоза.

3. В иммунном ответе на одну и ту же бактериальную инфекцию могут участвовать несколько генов *TRIM*, используя разные механизмы. Наряду с этим один и тот же ген *TRIM* может использовать разные механизмы при ответе на разные виды бактерий.

4. Отдельные белки *TRIM* оказывают как сходные (*TRIM7*, 8, 14, 16, 20, 21, 22, 28, 31, 32, 38), так и противоположные (*TRIM8*, 14, 20, 22, 25, 27, 29, 32, 38, 56, 65, 72) эффекты на бактериальные и вирусные инфекции.

Следует иметь в виду, что приведенные выше заключения по мере появления новых данных могут быть подвергнуты корректировке. Однако, в целом, это едва ли принципиально изменит наше сегодняшнее представление о роли генов семейства *TRIM* в работе врожденной иммун-

ной системы при взаимодействии с бактериями. Имеющиеся на сегодня данные позволяют сделать вывод о важности генов этого семейства в работе врожденной иммунной системы не только в антивирусном ответе, но и в ответе на бактериальные инфекции различной природы. С большой вероятностью можно предположить, что в дальнейшем и для ряда других членов мультигенного семейства *TRIM* будет показана их вовлеченность в реакции организмов на бактериальные инфекции. Новые данные о воздействии белков *TRIM* на бактериальные инфекции могут способствовать обнаружению новых молекулярных мишеней для профилактики и лечения бактериальных инфекционных заболеваний у человека.

Вклад авторов. В.В. Ненашева – исходная концепция; В.З. Тарантул, Е.А. Степаненко – сбор и обсуждение литературных данных; В.З. Тарантул, Е.А. Степаненко, В.В. Ненашева – написание текста; В.З. Тарантул – редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00157).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O'Neill, L. A., and Bowie, A. G. (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling, *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 353-364, <https://doi.org/10.1038/nri2079>.
2. Li, D., and Wu, M. (2021) Pattern recognition receptors in health and diseases, *Signal. Transduct. Target Ther.*, **6**, 291, <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>.
3. Trinchieri, G., and Sher, A. (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence, *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 179-190, <https://doi.org/10.1038/nri2038>.
4. Rajsbaum, R., Stoye, J. P., and O'Garra, A. (2008) Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells, *Eur. J. Immunol.*, **38**, 619-630, <https://doi.org/10.1002/eji.200737916>.
5. Bell, J. L., Malyukova, A., Holien, J. K., Koach, J., Parker, M. W., Kavallaris, M., Marshall, G. M., and Cheung, B. B. (2012) *TRIM16* acts as an E3 ubiquitin ligase and can heterodimerize with other *TRIM* family members, *PLoS One*, **7**, e37470, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037470>.
6. Fiorentini, F., Esposito, D., and Rittinger, K. (2020) Does it take two to tango? RING domain self-association and activity in *TRIM E3* ubiquitin ligases, *Biochem. Soc. Trans.*, **48**, 2615-2624, <https://doi.org/10.1042/BST20200383>.
7. Hatakeyama S. (2017) *TRIM* Family proteins: roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 297-311, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.002>.
8. Kimura, T., Jain, A., Choi, S. W., Mandell, M. A., Johansen, T., and Deretic, V. (2017) *TRIM*-directed selective autophagy regulates immune activation, *Autophagy*, **13**, 989-990, <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1154254>.
9. Nenasheva, V. V., and Tarantul, V. Z. (2020) Many faces of *TRIM* proteins on the road from pluripotency to neurogenesis, *Stem Cells Dev.*, **29**, 1-14, <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0152>.
10. Wang, L., and Ning, S. (2021) *TRIM*ming type I interferon-mediated innate immune response in antiviral and antitumor defense, *Viruses*, **13**, 279, <https://doi.org/10.3390/v13020279>.
11. Cambiaghi, V., Giuliani, V., Lombardi, S., Marinelli, C., Toffalorio, F., and Pelicci, P. G. (2012) *TRIM* proteins in cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **770**, 77-91, https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5398-7_6.

12. Bhaduri, U., and Merla, G. (2021) Ubiquitination, biotech startups, and the future of TRIM family proteins: a TRIM-endous opportunity, *Cells*, **10**, 1015, <https://doi.org/10.3390/cells10051015>.
13. Ozato, K., Shin, D. M., Chang, T. H., and Morse, H. C., 3rd (2008) TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 849-860, <https://doi.org/10.1038/nri2413>.
14. Versteeg, G. A., Rajsbaum, R., Sánchez-Aparicio, M. T., Maestre, A. M., Valdiviezo, J., Shi, M., Inn, K. S., Fernandez-Sesma, A., Jung, J., and García-Sastre, A. (2013) The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors, *Immunity*, **38**, 384-398, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.013>.
15. Versteeg, G. A., Benke, S., García-Sastre, A., and Rajsbaum, R. (2014) InTRIMsic immunity: Positive and negative regulation of immune signaling by tripartite motif proteins, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **25**, 563-576, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.08.001>.
16. Rajsbaum, R., García-Sastre, A., and Versteeg, G. A. (2014) TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity, *J. Mol. Biol.*, **426**, 1265-1284, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.005>.
17. Van Gent, M., Sparrer, K. M. J., and Gack, M. U. (2018) TRIM proteins and their roles in antiviral host defenses, *Annu. Rev. Virol.*, **5**, 385-405, <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043323>.
18. Van Tol, S., Hage, A., Giraldo, M. I., Bharaj, P., and Rajsbaum, R. (2017) The TRIMendous role of TRIMs in virus-host interactions, *Vaccines (Basel)*, **5**, 23, <https://doi.org/10.3390/vaccines5030023>.
19. Chen, Y., Cao, S., Sun, Y., and Li, C. (2018) Gene expression profiling of the TRIM protein family reveals potential biomarkers for indicating tuberculosis status, *Microb. Pathog.*, **114**, 385-392, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.008>.
20. Stepanenko, E., Bondareva, N., Sheremet, A., Fedina, E., Tikhomirov, A., Gerasimova, T., Poberezhniy, D., Makarova, I., Tarantul, V., Zigangirova, N., and Nenasheva, V. (2023) Identification of key TRIM genes involved in response to *Pseudomonas aeruginosa* or *Chlamydia* spp. infections in human cell lines and in mouse organs, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 13290, <https://doi.org/10.3390/ijms241713290>.
21. Ribet, D., and Cossart, P. (2018) Ubiquitin, SUMO, and NEDD8: key targets of bacterial pathogens, *Trends Cell Biol.*, **28**, 926-940, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.07.005>.
22. Alphonse, N., Dickenson, R. E., and Odendall, C. (2021) Interferons: tug of war between bacteria and their host, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **11**, 624094, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.624094>.
23. Shariq, M., Quadir, N., Alam, A., Zarin, S., Sheikh, J. A., Sharma, N., Samal, J., Ahmad, U., Kumari, I., Hasnain, S. E., and Ehtesham, N. Z. (2023) The exploitation of host autophagy and ubiquitin machinery by *Mycobacterium tuberculosis* in shaping immune responses and host defense during infection, *Autophagy*, **19**, 3-23, <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.2021495>.
24. Esposito, D., Koliopoulos, M. G., and Rittinger, K. (2017) Structural determinants of TRIM protein function, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 183-191, <https://doi.org/10.1042/BST20160325>.
25. Liu, Y. C. (2004) Ubiquitin ligases and the immune response, *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 81-127, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104813>.
26. Tracz, M., and Bialek, W. (2021) Beyond K48 and K63: non-canonical protein ubiquitination, *Cell Mol. Biol. Lett.*, **26**, 1, <https://doi.org/10.1186/s11658-020-00245-6>.
27. Adorasio, S., Fierabracci, A., Muscari, I., Liberati, A. M., Ayroldi, E., Migliorati, G., Thuy, T. T., Riccardi, C., and Delfino, D. V. (2017) SUMO proteins: guardians of immune system, *J. Autoimmun.*, **84**, 21-28, <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.09.001>.
28. El-Asmi, F., McManus, F.P., Brantis-de-Carvalho, C.E., Valle-Casuso, J. C., Thibault, P., and Chelbi-Alix, M. K. (2020) Cross-talk between SUMOylation and ISGylation in response to interferon, *Cytokine*, **129**, 155025, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155025>.
29. Kunnumakkara, A. B., Shabnam, B., Girisa, S., Harsha, C., Banik, K., Devi, T. B., Choudhury, R., Sahu, H., Parama, D., Sailo, B. L., Thakur, K. K., Gupta, S. C., and Aggarwal, B. B. (2020) Inflammation, NF- κ B, and chronic diseases: how are they linked? *Crit. Rev. Immunol.*, **40**, 1-39, <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2020033210>.
30. Ye, W., Hu, M. M., Lei, C. Q., Zhou, Q., Lin, H., Sun, M. S., and Shu, H. B. (2017) TRIM8 negatively regulates TLR3/4-mediated innate immune response by blocking TRIF-TBK1 interaction, *J. Immunol.*, **199**, 1856-1864, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601647>.
31. Xiaoli, L., Wujun, Z., and Jing, L. (2019) Blocking of tripartite motif 8 protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury by regulating AMPK α activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **508**, 701-708, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.072>.
32. Guo, L., Dong, W., Fu, X., Lin, J., Dong, Z., Tan, X., and Zhang, T. (2017) Tripartite motif 8 (TRIM8) positively regulates pro-inflammatory responses in *Pseudomonas aeruginosa*-induced keratitis through promoting K63-linked polyubiquitination of TAK1 protein, *Inflammation*, **40**, 454-463, <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0491-3>.

33. Hu, M. M., Xie, X. Q., Yang, Q., Liao, C. Y., Ye, W., Lin, H., and Shu, H. B. (2015) TRIM38 negatively regulates TLR3/4-mediated innate immune and inflammatory responses by two sequential and distinct mechanisms, *J. Immunol.*, **195**, 4415-4425, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500859>.
34. Gu, Z., Chen, X., Yang, W., Qi, Y., Yu, H., Wang, X., Gong, Y., Chen, Q., Zhong, B., Dai, L., Qi, S., Zhang, Z., Zhang, H., and Hu, H. (2021) The SUMOylation of TAB2 mediated by TRIM60 inhibits MAPK/NF- κ B activation and the innate immune response, *Cell Mol. Immunol.*, **18**, 1981-1994, <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00564-w>.
35. Sokolova, O., Kähne, T., Bryan, K., and Naumann, M. (2018) Interactome analysis of transforming growth factor- β -activated kinase 1 in *Helicobacter pylori*-infected cells revealed novel regulators tripartite motif 28 and CDC37, *Oncotarget*, **9**, 14366-14381, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24544>.
36. Wang, S., Lu, B., Liu, J., and Gu, Y. (2022) TRIM27 suppresses inflammation injuries in pediatric pneumonia by targeting TLR4/NF- κ B signaling pathway, *Allergol. Immunopathol. (Madr)*, **50**, 33-39, <https://doi.org/10.15586/aei.v50i2.558>.
37. Lu, M., Zhu, X., Yang, Z., Zhang, W., Sun, Z., Ji, Q., Chen, X., Zhu, J., Wang, C., and Nie, S. (2019) E3 ubiquitin ligase tripartite motif 7 positively regulates the TLR4-mediated immune response via its E3 ligase domain in macrophages, *Mol. Immunol.*, **109**, 126-133, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.01.015>.
38. Man, S. M., Karki, R., and Kanneganti, T. D. (2017) Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases, *Immunol. Rev.*, **277**, 61-75, <https://doi.org/10.1111/imr.12534>.
39. Xu, H., Yang, J., Gao, W., Li, L., Li, P., Zhang, L., Gong, Y. N., Peng, X., Xi, J. J., Chen, S., Wang, F., and Shao, F. (2014) Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome, *Nature*, **513**, 237-241, <https://doi.org/10.1038/nature13449>.
40. Van Gorp, H., Saavedra, P. H., de Vasconcelos, N. M., Van Opdenbosch, N., VandeWalle, L., Matusiak, M., Prencipe, G., Insalaco, A., Van Hauwermeiren, F., Demon, D., Bogaert, D. J., Dullaers, M., De Baere, E., Hochepped, T., Dehoorne, J., Vermaelen, K. Y., Haerynck, F., De Benedetti, F., and Lamkanfi, M. (2016) Familial Mediterranean fever mutations lift the obligatory requirement for microtubules in Pyrin inflammasome activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 14384-14389, <https://doi.org/10.1073/pnas.1613156113>.
41. Malik, H. S., and Bliska, J. B. (2020) The pyrin inflammasome and the *Yersinia* effector interaction, *Immunol. Rev.*, **297**, 96-107, <https://doi.org/10.1111/imr.12907>.
42. Park, Y. H., Remmers, E. F., Lee, W., Ombrello, A. K., Chung, L. K., Shilei, Z., Stone, D. L., Ivanov, M. I., Loeven, N. A., Barron, K. S., Hoffmann, P., Nehrebecky, M., Akkaya-Ulum, Y. Z., Sag, E., Balci-Peynircioglu, B., Aksentijevich, I., Gül, A., Rotimi, C. N., Chen, H., Bliska, J. B., Ozen, S., Kastner, D. L., Shriner, D., and Chae, J. J. (2020) Ancient familial Mediterranean fever mutations in human pyrin and resistance to *Yersinia pestis*, *Nat. Immunol.*, **21**, 857-867, <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0705-6>.
43. Swanson, K. V., Deng, M., and Ting, J. P. (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics, *Nat. Rev. Immunol.*, **19**, 477-489, <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>.
44. Hughes, M. M., and O'Neill, L. A. J. (2018) Metabolic regulation of NLRP3, *Immunol. Rev.*, **281**, 88-98, <https://doi.org/10.1111/imr.12608>.
45. Qin, Y., Li, Q., Liang, W., Yan, R., Tong, L., Jia, M., Zhao, C., and Zhao, W. (2021) TRIM28 SUMOylates and stabilizes NLRP3 to facilitate inflammasome activation, *Nat. Commun.*, **12**, 4794, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25033-4>.
46. Yu, Q., Shi, H., Ding, Z., Wang, Z., Yao, H., and Lin, R. (2023) The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation in *Helicobacter pylori*-associated gastritis by regulating ROS and autophagy, *Cell Commun. Signal.*, **21**, 1, <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00954-9>.
47. Li, Y., Huang, X., Guo, F., Lei, T., Li, S., Monaghan-Nichols, P., Jiang, Z., Xin, H. B., and Fu, M. (2020) TRIM65 E3 ligase targets VCAM-1 degradation to limit LPS-induced lung inflammation, *J. Mol. Cell Biol.*, **12**, 190-201, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz077>.
48. Zeng, X., Deng, X., Ni, Y., Bi, H., Jiang, M., Wang, D., Dong, P., Xiao, Y., and Jiang, M. (2023) LPS inhibits TRIM65 expression in macrophages and C57BL/6J mouse by activating the ERK1/2 signaling pathway, *Exp. Ther. Med.*, **25**, 188, <https://doi.org/10.3892/etm.2023.11887>.
49. Wang, J., Teng, J. L., Zhao, D., Ge, P., Li, B., Woo, P. C., and Liu, C. H. (2016) The ubiquitin ligase TRIM27 functions as a host restriction factor antagonized by *Mycobacterium tuberculosis* PtpA during mycobacterial infection, *Sci. Rep.*, **6**, 34827, <https://doi.org/10.1038/srep34827>.
50. OuYang, X., Guo, J., Lv, Q., Jiang, H., Zheng, Y., Liu, P., Zhao, T., Kong, D., Hao, H., and Jiang, Y. (2020) TRIM32 drives pathogenesis in streptococcal toxic shock-like syndrome and *Streptococcus suis* meningitis by regulating innate immune responses, *Infect. Immun.*, **88**, e00957-19, <https://doi.org/10.1128/IAI.00957-19>.
51. OuYang, X., Liu, P., Zheng, Y., Jiang, H., Lv, Q., Huang, W., Hao, H., Pian, Y., Kong, D., and Jiang, Y. (2023) TRIM32 reduced the recruitment of innate immune cells and the killing capacity of *Listeria monocytogenes* by inhibiting secretion of chemokines, *Gut Pathog.*, **15**, 32, <https://doi.org/10.1186/s13099-023-00558-9>.

52. Liu, H., Zhu, T., Li, Q., Xiong, X., Wang, J., Zhu, X., Zhou, X., Zhang, L., Zhu, Y., Peng, Y., Chen, Y., Hu, C., Chen, H., and Guo, A. (2020) TRIM25 upregulation by *Mycobacterium tuberculosis* infection promotes intracellular survival of *M. tb* in RAW264.7 cells, *Microb Pathog.*, **148**, 104456, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104456>.
53. Nagre, N., Cong, X., Terrazas, C., Pepper, I., Schreiber, J. M., Fu, H., Sill, J. M., Christman, J. W., Satoskar, A. R., and Zhao, X. (2018) Inhibition of macrophage complement receptor CR1g by TRIM72 polarizes innate immunity of the lung, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **58**, 756-766, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0236OC>.
54. Kenney, A. D., Li, Z., Bian, Z., Zhou, X., Li, H., Whitson, B. A., Tan, T., Cai, C., Ma, J., and Yount, J. S. (2021) Recombinant MG53 protein protects mice from lethal influenza virus infection, *Am. J. Respir. Crit Care Med.*, **203**, 254-257, <https://doi.org/10.1164/rccm.202007-2908LE>.
55. Liu, S., Cai, X., Wu, J., Cong, Q., Chen, X., Li, T., Du, F., Ren, J., Wu, Y. T., Grishin, N. V., and Chen, Z. J. (2015) Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation, *Science*, **347**, aaa2630, <https://doi.org/10.1126/science.aaa2630>.
56. Balka, K. R., Louis, C., Saunders, T. L., Smith, A. M., Calleja, D. J., D'Silva, D. B., Moghaddas, F., Tailler, M., Lawlor, K. E., Zhan, Y., Burns, C. J., Wicks, I. P., Miner, J. J., Kile, B. T., Masters, S. L., and De Nardo, D. (2020) TBK1 and IKKε act redundantly to mediate STING-induced NF-κB responses in myeloid cells, *Cell Rep.*, **31**, 107492, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.056>.
57. Monroe, K. M., McWhirter, S. M., and Vance, R. E. (2010) Induction of type I interferons by bacteria, *Cell Microbiol.*, **12**, 881-890, <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01478.x>.
58. Robinson, N., McComb, S., Mulligan, R., Dudani, R., Krishnan, L., and Sad, S. (2012) Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Nat. Immunol.*, **13**, 954-962, <https://doi.org/10.1038/ni.2397>.
59. Nisole, S., Stoye, J. P., and Saïb, A. (2005) TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence, *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 799-808, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1248>.
60. Zhou, Z., Jia, X., Xue, Q., Dou, Z., Ma, Y., Zhao, Z., Jiang, Z., He, B., Jin, Q., and Wang, J. (2014) TRIM14 is a mitochondrial adaptor that facilitates retinoic acid-inducible gene-I-like receptor-mediated innate immune response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E245-254, <https://doi.org/10.1073/pnas.1316941111>.
61. Hoffpauir, C. T., Bell, S. L., West, K. O., Jing, T., Wagner, A. R., Torres-Odio, S., Cox, J. S., West, A. P., Li, P., Patrick, K. L., and Watson, R. O. (2020) TRIM14 is a key regulator of the type I IFN response during *Mycobacterium tuberculosis* infection, *J. Immunol.*, **205**, 153-167, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901511>.
62. Kamanova, J., Sun, H., Lara-Tejero, M., and Galán, J. E. (2016) The *Salmonella* effector protein SopA modulates innate immune responses by targeting TRIM E3 ligase family members, *PLoS Pathog.*, **12**, e1005552, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005552>.
63. Xing, J., Weng, L., Yuan, B., Wang, Z., Jia, L., Jin, R., Lu, H., Li, X. C., Liu, Y. J., and Zhang, Z. (2016) Identification of a role for TRIM29 in the control of innate immunity in the respiratory tract, *Nat. Immunol.*, **17**, 1373-1380, <https://doi.org/10.1038/ni.3580>.
64. Li, Q., Lin, L., Tong, Y., Liu, Y., Mou, J., Wang, X., Wang, X., Gong, Y., Zhao, Y., Liu, Y., Zhong, B., Dai, L., Wei, Y. Q., Zhang, H., and Hu, H. (2018) TRIM29 negatively controls antiviral immune response through targeting STING for degradation, *Cell Discov.*, **4**, 13, <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0010-9>.
65. Xing, J., Zhang, A., Minze, L. J., Li, X. C., and Zhang, Z. (2018) TRIM29 negatively regulates the type I IFN production in response to RNA virus, *J. Immunol.*, **201**, 183-192, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701569>.
66. Amano, A., Nakagawa, I., and Yoshimori, T. (2006) Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria, *J. Biochem.*, **140**, 161-166, <https://doi.org/10.1093/jb/mvj162>.
67. Xiao, Y., and Cai, W. (2020) Autophagy and bacterial infection, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1207**, 413-423, https://doi.org/10.1007/978-981-15-4272-5_29.
68. Deretic, V. (2021) Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism, *Immunity*, **54**, 437-453, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.018>.
69. Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **27**, 107-132, <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>.
70. Bah, A., and Vergne, I. (2017) Macrophage autophagy and bacterial infections, *Front. Immunol.*, **8**, 1483, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01483>.
71. Wang, J., Qin, X., Huang, Y., Zhang, Q., Pei, J., Wang, Y., Goren, I., Ma, S., Song, Z., Liu, Y., Xing, H., Wang, H., and Yang, B. (2023) TRIM7/RNF90 promotes autophagy via regulation of ATG7 ubiquitination during *L. monocytogenes* infection, *Autophagy*, **19**, 1844-1862, <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2162706>.
72. Ra, E. A., Lee, T. A., Won Kim, S., Park, A., Choi, H. J., Jang, I., Kang, S., HeeCheon, J., Cho, J. W., Eun Lee, J., Lee, S., and Park, B. (2016) TRIM31 promotes Atg5/Atg7-independent autophagy in intestinal cells, *Nat. Commun.*, **7**, 11726, <https://doi.org/10.1038/ncomms11726>.

73. Chauhan, S., Kumar, S., Jain, A., Ponpuak, M., Mudd, M. H., Kimura, T., Choi, S. W., Peters, R., Mandell, M., Bruun, J. A., Johansen, T., and Deretic, V. (2016) TRIMs and galectins globally cooperate and TRIM16 and galectin-3 co-direct autophagy in endomembrane damage homeostasis, *Dev. Cell*, **39**, 13-27, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.08.003>.
74. Hos, N. J., Fischer, J., Hos, D., Hejazi, Z., Calabrese, C., Ganesan, R., Murthy, A. M. V., Rybniker, J., Kumar, S., Krönke, M., and Robinson, N. (2020) TRIM21 is targeted for chaperone-mediated autophagy during *Salmonella typhimurium* infection, *J. Immunol.*, **205**, 2456-2467, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000048>.
75. Rakebrandt, N., Lentjes, S., Neumann, H., James, L. C., and Neumann-Staubitz, P. (2014) Antibody- and TRIM21-dependent intracellular restriction of *Salmonella enterica*, *Pathog. Dis.*, **72**, 131-137, <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12192>.
76. Lou, J., Wang, Y., Zheng, X., and Qiu, W. (2018) TRIM22 regulates macrophage autophagy and enhances *Mycobacterium tuberculosis* clearance by targeting the nuclear factor-multiplicity κ B/beclin 1 pathway, *J. Cell Biochem.*, **119**, 8971-8980, <https://doi.org/10.1002/jcb.27153>.
77. Wu, N., Gou, X., Hu, P., Chen, Y., Ji, J., Wang, Y., and Zuo, L. (2022) Mechanism of autophagy induced by activation of the AMPK/ERK/mTOR signaling pathway after TRIM22-mediated DENV-2 infection of HUVECs, *Virol. J.*, **19**, 228, <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01932-w>.
78. Yang, Q., Liu, T. T., Lin, H., Zhang, M., Wei, J., Luo, W. W., Hu, Y. H., Zhong, B., Hu, M. M., and Shu, H. B. (2017) TRIM32-TAX1BP1-dependent selective autophagic degradation of TRIF negatively regulates TLR3/4-mediated innate immune responses, *PLoS Pathog.*, **13**, e1006600, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006600>.
79. Romagnoli, A., Di Rienzo, M., Petruccioli, E., Fusco, C., Palucci, I., Micale, L., Mazza, T., Delogu, G., Merla, G., Goletti, D., Piacentini, M., and Fimia, G. M. (2023) The ubiquitin ligase TRIM32 promotes the autophagic response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages, *Cell Death Dis.*, **14**, 505, <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06026-1>.
80. Samir, P., Malireddi, R. K. S., and Kanneganti, T. D. (2020) The PANoptosome: a deadly protein complex driving pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis), *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**, 238, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00238>.
81. Lee, S., Karki, R., Wang, Y., Nguyen, L. N., Kalathur, R. C., and Kanneganti, T. D. (2021) AIM2 forms a complex with pyrin and ZBP1 to drive PANoptosis and host defence, *Nature*, **597**, 415-419, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03875-8>.
82. Shen, Z., Wei, L., Yu, Z. B., Yao, Z. Y., Cheng, J., Wang, Y. T., Song, X. T., and Li, M. (2021) The roles of TRIMs in antiviral innate immune signaling, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **11**, 628275, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.628275>.
83. Perelman, S. S., Abrams, M. E., Eitson, J. L., Chen, D., Jimenez, A., Mettlen, M., Schoggins, J. W., and Alto, N. M. (2016) Cell-based screen identifies human interferon-stimulated regulators of *Listeria monocytogenes* infection, *PLoS Pathog.*, **12**, e1006102, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006102>.
84. Wu, X., Wang, J., Wang, S., Wu, F., Chen, Z., Li, C., Cheng, G., and Qin, F. X. (2019) Inhibition of influenza A virus replication by TRIM14 via its multifaceted protein-protein interaction with NP, *Front. Microbiol.*, **10**, 344, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00344>.
85. Fiskin, E., Bhogaraju, S., Herhaus, L., Kalayil, S., Hahn, M., and Dikic, I. (2017) Structural basis for the recognition and degradation of host TRIM proteins by *Salmonella* effector SopA, *Nat. Commun.*, **8**, 14004, <https://doi.org/10.1038/ncomms14004>.
86. Li, M., Yan, J., Zhu, H., Guo, C., Jiang, X., Gao, Y., Liu, X., Jiang, P., and Bai, J. (2023) TRIM7 inhibits encephalomyocarditis virus replication by activating interferon- β signaling pathway, *Vet. Microbiol.*, **281**, 109729, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023>.
87. Huang, Y., Yu, Y., Yang, Y., Yang, M., Zhou, L., Huang, X., and Qin, Q. (2016) Fish TRIM8 exerts antiviral roles through regulation of the proinflammatory factors and interferon signaling, *Fish Shellfish Immunol.*, **54**, 435-444, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.138>.
88. Kuroda, M., Halfmann, P.J., Thackray, L.B., Diamond, M. S., Feldmann, H., Marzi, A., and Kawaoka, Y. (2023) An antiviral role for TRIM14 in Ebola virus infection, *J. Infect. Dis.*, **228** (Suppl 7), S514-S521, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad325>.
89. Nenasheva, V.V., Nikitenko, N.A., Stepanenko, E.A., Makarova, I. V., Andreeva, L. E., Kovaleva, G. V., Lysenko, A. A., Tukhvatulin, A. I., Logunov, D. Y., and Tarantul, V. Z. (2021) Human TRIM14 protects transgenic mice from influenza A viral infection without activation of other innate immunity pathways, *Genes Immun.*, **22**, 56-63, <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00128-6>.
90. Tan, G., Xu, F., Song, H., Yuan, Y., Xiao, Q., Ma, F., Qin, F. X., and Cheng, G. (2018) Identification of TRIM14 as a type I IFN-stimulated gene controlling hepatitis B virus replication by targeting HBx, *Front. Immunol.*, **9**, 1872, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01872>.

91. Liu, Y., Wei, Y., Zhou, Z., Gu, Y., Pang, Z., Liao, M., and Sun, H. (2023) Overexpression of TRIM16 reduces the titer of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus and promotes the expression of antioxidant genes through regulating the SQSTM1-NRF2-KEAP1 axis, *Viruses*, **15**, 391, <https://doi.org/10.3390/v15020391>.
92. McEwan, W.A., Tam, J.C., Watkinson, R.E., Bidgood, S. R., Mallery, D. L., and James, L. C. (2013) Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21, *Nat. Immunol.*, **14**, 327-336, <https://doi.org/10.1038/ni.2548>.
93. Fan, L., Zhou, Y., Wei, X., Feng, W., Guo, H., Li, Y., Gao, X., Zhou, J., Wen, Y., Wu, Y., Shen, X., Liu, L., Xu, G., and Zhang, Z. (2024) The E3 ligase TRIM22 restricts SARS-CoV-2 replication by promoting proteasomal degradation of NSP8, *mBio*, **15**, e0232023, <https://doi.org/10.1128/mbio.02320-23>.
94. Zu, S., Li, C., Li, L., Deng, Y.Q., Chen, X., Luo, D., Ye, Q., Huang, Y. J., Li, X. F., Zhang, R. R., Sun, N., Zhang, X., Aliyari, S. R., Nielsen-Saines, K., Jung, J. U., Yang, H., Qin, C. F., and Cheng, G. (2022) TRIM22 suppresses Zika virus replication by targeting NS1 and NS3 for proteasomal degradation, *Cell Biosci.*, **12**, 139, <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00872-w>.
95. Charman, M., McFarlane, S., Wojtus, J. K., Sloan, E., Dewar, R., Leeming, G., Al-Saadi, M., Hunter, L., Carroll, M. W., Stewart, J. P., Digard, P., Hutchinson, E., and Boutell, C. (2021) Constitutive TRIM22 expression in the respiratory tract confers a pre-existing defence against influenza A virus infection, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **11**, 689707, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.689707>.
96. Zhang, B., Cai, T., He, H., Huang, X., Luo, Y., Huang, S., Luo, J., and Guo, X. (2023) TRIM25 suppresses rabies virus fixed HEP-flury strain production by activating RIG-1-mediated type I interferons, *Genes (Basel)*, **14**, 1555, <https://doi.org/10.3390/genes14081555>.
97. Song, H., Xiao, Q., Xu, F., Wei, Q., Wang, F., and Tan, G. (2023) TRIM25 inhibits HBV replication by promoting HBx degradation and the RIG-I-mediated pgRNA recognition, *Chin. Med. J. (Engl)*, **136**, 799-806, <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002617>.
98. Choudhury, N.R., Trus, I., Heikel, G., Wolczyk, M., Szymanski, J., Bolembach, A., Dos Santos Pinto, R. M., Smith, N., Trubitsyna, M., Gaunt, E., Digard, P., and Michlewski, G. (2022) TRIM25 inhibits influenza A virus infection, destabilizes viral mRNA, but is redundant for activating the RIG-I pathway, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 7097-7114, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac512>.
99. Galão, R.P., Wilson, H., Schierhorn, K. L., Debeljak, F., Bodmer, B. S., Goldhill, D., Hoenen, T., Wilson, S. J., Swanson, C. M., and Neil, S. J. D. (2022) TRIM25 and ZAP target the Ebola virus ribonucleoprotein complex to mediate interferon-induced restriction, *PLoS Pathog.*, **18**, e1010530, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010530>.
100. Zheng, F., Xu, N., and Zhang, Y. (2019) TRIM27 promotes hepatitis C virus replication by suppressing type I interferon response, *Inflammation*, **42**, 1317-1325, <https://doi.org/10.1007/s10753-019-00992-5>.
101. Cai, J., Chen, H.Y., Peng, S.J., Meng, J.L., Wang, Y., Zhou, Y., Qian, X. P., Sun, X. Y., Pang, X. W., Zhang, Y., and Zhang, J. (2018) USP7-TRIM27 axis negatively modulates antiviral type I IFN signaling, *FASEB J.*, **32**, 5238-5249, <https://doi.org/10.1096/fj.201700473RR>.
102. Ren, J., Wang, S., Zong, Z., Pan, T., Liu, S., Mao, W., Huang, H., Yan, X., Yang, B., He, X., Zhou, F., and Zhang, L. (2024) TRIM28-mediated nucleocapsid protein SUMOylation enhances SARS-CoV-2 virulence, *Nat. Commun.*, **15**, 244, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44502-6>.
103. Li, X., Yan, Z., Ma, J., Li, G., Liu, X., Peng, Z., Zhang, Y., Huang, S., Luo, J., and Guo, X. (2024) TRIM28 promotes porcine epidemic diarrhea virus replication by mitophagy-mediated inhibition of the JAK-STAT1 pathway, *Int. J. Biol. Macromol.*, **254 (Pt 1)**, 127722, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127722>.
104. Cui, Z., Zhou, L., Zhao, S., Li, W., Li, J., Chen, J., Zhang, Y., and Xia, P. (2023) The host E3-ubiquitin ligase TRIM28 impedes viral protein GP4 ubiquitination and promotes PRRSV replication, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10965, <https://doi.org/10.3390/ijms241310965>.
105. Xu, F., Song, H., Xiao, Q., Wei, Q., Pang, X., Gao, Y., and Tan, G. (2022) Type-III interferon stimulated gene TRIM31 mutation in an HBV patient blocks its ability in promoting HBx degradation, *Virus Res.*, **308**, 198650, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198650>.
106. Liu, B., Zhang, M., Chu, H., Zhang, H., Wu, H., Song, G., Wang, P., Zhao, K., Hou, J., Wang, X., Zhang, L., and Gao, C. (2017) The ubiquitin E3 ligase TRIM31 promotes aggregation and activation of the signaling adaptor MAVS through Lys63-linked polyubiquitination, *Nat. Immunol.*, **18**, 214-224, <https://doi.org/10.1038/ni.3641>.
107. Fu, B., Wang, L., Ding, H., Schwamborn, J. C., Li, S., and Dorf, M. E. (2015) TRIM32 senses and restricts influenza A virus by ubiquitination of PB1 polymerase, *PLoS Pathog.*, **11**, e1004960, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004960>.
108. Cui, H., Liu, Y., and Huang, Y. (2017) Roles of TRIM32 in corneal epithelial cells after infection with herpes simplex virus, *Cell Physiol. Biochem.*, **43**, 801-811, <https://doi.org/10.1159/000481563>.

109. Zhang, J., Hu, M.M., Wang, Y.Y., and Shu, H. B. (2012) TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination, *J. Biol. Chem.*, **287**, 28646-28655, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362608>.
110. Hu, M.M., Liao, C.Y., Yang, Q., Xie, X. Q., and Shu, H. B. (2017) Innate immunity to RNA virus is regulated by temporal and reversible sumoylation of RIG-I and MDA5, *J. Exp. Med.*, **214**, 973-989, <https://doi.org/10.1084/jem.20161015>.
111. Zhao, W., Wang, L., Zhang, M., Wang, P., Yuan, C., Qi, J., Meng, H., and Gao, C. (2012) Tripartite motif-containing protein 38 negatively regulates TLR3/4- and RIG-I-mediated IFN- β production and antiviral response by targeting NAP1, *J. Immunol.*, **188**, 5311-5318, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103506>.
112. Tian, X., Dong, H., Lai, X., Ou, G., Cao, J., Shi, J., Xiang, C., Wang, L., Zhang, X., Zhang, K., Song, J., Deng, J., Deng, H., Lu, S., Zhuang, H., Li, T., and Xiang K. (2022) TRIM56 impairs HBV infection and replication by inhibiting HBV core promoter activity, *Antiviral Res.*, **207**, 105406, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105406>.
113. Yang, D., Li, N.L., Wei, D., Liu, B., Guo, F., Elbahesh, H., Zhang, Y., Zhou, Z., Chen, G. Y., and Li, K. (2019) The E3 ligase TRIM56 is a host restriction factor of Zika virus and depends on its RNA-binding activity but not miRNA regulation, for antiviral function, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **13**, e0007537, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007537>.
114. Seo, G.J., Kim, C., Shin, W.J., Sklan, E. H., Eoh, H., and Jung, J. U. (2018) TRIM56-mediated monoubiquitination of cGAS for cytosolic DNA sensing, *Nat. Commun.*, **9**, 613, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02936-3>.
115. Liu, B., Li, N.L., Shen, Y., Bao, X., Fabrizio, T., Elbahesh, H., Webby, R. J., and Li, K. (2016) The C-terminal tail of TRIM56 dictates antiviral restriction of influenza A and B viruses by impeding viral RNA synthesis, *J. Virol.*, **90**, 4369-4382, <https://doi.org/10.1128/JVI.03172-15>.
116. Lang, X., Tang, T., Jin, T., Ding, C., Zhou, R., and Jiang, W. (2017) TRIM65-catalyzed ubiquitination is essential for MDA5-mediated antiviral innate immunity, *J. Exp. Med.*, **214**, 459-473, <https://doi.org/10.1084/jem.20160592>.

MULTI-DIRECTIONAL MECHANISMS OF ACTION OF *TRIM* FAMILY GENES IN THE RESPONSE OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM TO BACTERIAL INFECTIONS

Review

V. V. Nenasheva, E. A. Stepanenko*, and V. Z. Tarantul

National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia; e-mail: katishsha@mail.ru

Multigene *TRIM* family is an important component of the innate immune system. For a long time, it was believed that the main function of the genes of this family is the antiviral defense of the host organism. The question of their participation in the response of the immune system to bacterial invasion remained less studied. This review represents the first comprehensive analysis of the mechanisms of action of *TRIM* family genes in response to bacterial infections, which expands the existing understanding of the role of *TRIM* in the functioning of the innate immune system. Upon the infection with different types of bacteria, individual *TRIM* proteins regulate inflammatory, interferon and other immune system responses in cells and influence the processes of autophagy and apoptosis. The mechanisms of action of *TRIM* proteins in response to bacterial infection, as well as during viral infection, often include one of the main properties of these proteins - ubiquitination, as well as various protein-protein interactions with both bacterial proteins and host cell proteins. Moreover, along with the antibacterial effect, some *TRIM* proteins, on the contrary, can contribute to the development of infection. While the mechanisms used by different members of the *TRIM* family in response to viral and bacterial infections are generally similar, the final outcome of the action of these proteins sometimes differs significantly. New data on the effect of *TRIM* proteins on bacterial infections make an important contribution to a more detailed understanding of the functioning of the innate immune system of animals and humans when interacting with pathogens. These data can also be used to search for new targets for antibacterial protection.

Keywords: *TRIM* genes, bacteria, innate immunity

ВЛИЯНИЕ ДОЗОЗАВИСИМОГО ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОТЕИНКИНАЗЫ mTOR НА УРОВЕНЬ БЕЛКОВ АУТОФАГОЛИЗОСОМНОЙ СИСТЕМЫ И АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МАКРОФАГОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ SH-SY5Y – ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2024 А.И. Безрукова^{1,2*}, К.С. Башарова¹, Г.В. Байдакова³, Е.Ю. Захарова³,
С.Н. Пчелина^{1,2}, Т.С. Усенко^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт»,
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова,
188300 Гатчина, Ленинградская обл., Россия; электронная почта: bezrukova_ai@npri.nrcki.ru

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, 197022 Санкт-Петербург, Россия

³ Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова, 115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25.03.2024

После доработки 22.05.2024

Принята к публикации 09.06.2024

В настоящее время молекулярные механизмы распространенного нейродегенеративного заболевания болезни Паркинсона (БП) неизвестны, и, как следствие, на сегодняшний день не существует нейропротекторных препаратов, способных остановить или замедлить процесс гибели нейронов. Цель данного исследования заключалась в оценке перспективности использования в качестве потенциальной мишени для терапии БП молекулы mTOR путем изучения влияния ингибирования киназной активности mTOR в различных концентрациях на параметры клетки, нарушение которых ассоциировано с развитием БП. Исследование было выполнено на первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. В результате нами впервые было показано, что ингибирование mTOR веществом Торин 1 только при концентрации 100 нМ влияет на уровень фермента глюкоцереброзидазы (GCase), кодируемого геном *GBA1*, мутации в котором являются фактором высокого риска БП, а также приводит к снижению патологической фосфорилированной формы белка альфа-синуклеина (Ser129), увеличению его стабильной тетрамерной формы при отсутствии изменения активности лизосомных ферментов и концентрации лизосфинголипидов. Ингибирование протеинкиназы mTOR может быть перспективным подходом для разработки терапии БП, в частности *GBA1*-ассоциированной БП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Паркинсона, mTOR, Торин 1, альфа-синуклеин, глюкоцереброзидаза, аутофагия, активность лизосомных ферментов, лизосфинголипиды.

DOI: 10.31857/S0320972524070085 EDN: WMTQWO

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – это одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, которое характеризуется гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции головного мозга, накоплением и агрегацией белка альфа-синуклеина [1]. Точные молекуляр-

ные механизмы БП остаются неизвестными, и, как следствие, на сегодняшний день не существует нейропротекторных препаратов, способных остановить или замедлить процесс нейродегенерации. Исследования последних лет указывают на вовлеченность в молекулярные механизмы БП таких процессов, как нейровоспаление, митохондриальная дисфункция, нарушение липидного гомеостаза, стресс эндоплазматического ретикулума и нарушение аутофаголизосомной системы [2, 3].

* Адресат для корреспонденции.

Однако именно нарушение аутофагии, посредством которой деградирует около половины белка альфа-синуклеина в клетке, сегодня рассматривается как ключевое звено в патогенезе БП [4–6]. Таким образом, одним из перспективных подходов для терапии БП может стать регуляция процессов аутофагии, а именно регуляция пути PI3K/AKT/mTOR [7, 8]. Ранее нами и другими авторами было выявлено нарушение пути PI3K/AKT/mTOR как при спорадической форме БП (сБП), так и при БП с известной этиологией, в частности, одной из самых распространенных форм – БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (*GBA1*-БП) [9–14]. Так, нами в ходе анализа транскриптома на пациент-специфичных клетках пациентов с *GBA1*-БП и мышинной модели с индукцией паркинсонизма с дисфункцией лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (*GCase*) было выявлено изменение экспрессии генов, регулируемых сигнальным каскадом PI3K/AKT/mTOR [9, 10]. Мутации в гене *GBA1*, кодирующем *GCase*, являются фактором высокого генетического риска БП и приводят к снижению активности и уровня *GCase* как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состояниях [15, 16]. В свою очередь, при воздействии ингибиторами киназной активности mTOR на сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR было показано улучшение клиренса альфа-синуклеина на клеточных и мышинных моделях сБП и *GBA1*-БП [12, 17, 18]. Однако необходимо отметить, что как гипер-, так и гипоактивация mTOR может приводить к дисфункции лизосом и последующей гибели клеток [19]. Поэтому важно поддерживать баланс между активацией передачи сигналов mTOR и лизосомной функцией. Таким образом, цель исследования заключалась в оценке дозозависимого влияния ингибирования киназной активности mTOR Торином 1 на параметры клетки, изменение которых ассоциировано с БП, а именно на активность лизосомных ферментов и концентрацию лизосфинголипидов, степень аутофагии, уровень белка альфа-синуклеина и *GCase* в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Первичная культура макрофагов периферической крови и клеточная линия нейробластомы SH-SY5Y в качестве объекта исследования были выбраны ввиду того, что данные подходы широко используются нами и другими исследователями как для скрининга новых потенциальных препаратов, разрабатываемых для терапии нейродегенеративных заболеваний, так и для изучения

молекулярных механизмов заболеваний, в частности, *GBA1*-БП [20–22]. В качестве ингибитора киназной активности mTOR был выбран Торин 1, так как ранее он показал свою эффективность в отношении снижения уровня фосфорилированного белка альфа-синуклеина (Ser129) и восстановления работы аутофаголизосомной системы на пациент-специфичных клетках пациентов, являющихся биаллельными носителями мутаций в гене *GBA1* (с болезнью Гоше), а также пациентов с *GBA1*-БП [12, 23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика групп, включенных в исследование. В исследование было включено 6 неврологически здоровых индивидуумов (2 мужчины, 4 женщины, средний возраст – $30,3 \pm 5,9$ лет), которые наблюдались в консультативно-диагностическом центре Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Культивирование первичной культуры макрофагов периферической крови. Первичная культура макрофагов периферической крови была получена по протоколу, описанному нами ранее, из моноклеарной фракции, выделенной из цельной крови каждого индивидуума [21, 24, 25]. На 4-е сутки к первичной культуре макрофагов был добавлен селективный ингибитор протеинкиназы mTOR Торин 1 («Abcam», США) в различных концентрациях (25, 50, 100, 200 нМ), выявленных по результатам оценки выживаемости, с последующим культивированием в течение 24 ч.

Культивирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Клеточная линия нейробластомы SH-SY5Y, подаренная коллегами из Института цитологии РАН, Санкт-Петербург (д.б.н. Казначеева Е.В.), культивировалась в питательной среде DMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Биолот») и 1% антибиотика гентамицина («Биолот») в течение 4 суток при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для данного исследования клеточная линия нейробластомы SH-SY5Y была использована после не более семи пассажей. Дифференцировку клеточной линии SH-SY5Y проводили по протоколу, описанному ранее [26]. На 9-е сутки культивирования к клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y был добавлен селективный ингибитор протеинкиназы mTOR Торин 1 в различных концентрациях (25, 50,

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; сБП – спорадическая БП; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ASase – кислая сфингомиелиназа; *GBA1*-БП – БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1*; *GCase* – глюкоцереброзидаза; *GLA* – альфа-галактозидаза; HexSph – гексазилсфингозин; LysoGb3 – лизоглоботриаозилсфингозин; LysoSM – лизосфингомиелин.

100, 200 нМ), выявленных по результатам оценки выживаемости, с последующим культивированием в течение 24 ч. Каждый эксперимент был выполнен в трех независимых повторах.

Оценка выживаемости первичной культуры макрофагов периферической крови и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y в присутствии ингибитора протеинкиназы mTOR. Первичную культуру макрофагов периферической крови и клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y (1×10^4 клеток/200 мкл питательной среды) культивировали в 96-луночном планшете («Servicebio, Китай») при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 суток и 10 суток соответственно по методу, описанному выше, с последующим добавлением Торина 1 в различных концентрациях (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 нМ) и культивированием в течение 24 ч в тех же условиях. Оценку выживаемости проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [27]. Для каждой концентрации эксперименты были выполнены в трех повторах.

Оценка интенсивности процесса аутофагии методом иммунофлуоресценции. Первичную культуру макрофагов периферической крови и клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y в присутствии Торина 1 в различных концентрациях, выявленных по результатам оценки выживаемости, и без ингибитора инкубировали в течение 30 мин в присутствии LysoTracker-Red DND-99 («Thermo Scientific», США); далее, клетки были зафиксированы с использованием 4%-ного параформальдегида («Sigma-Aldrich», США) в течение 30 мин, отмыты в фосфатно-солевом буфере («Росмедбио», Россия) в течение 10 мин, после чего инкубированы в 1%-ном бычьем сывороточном альбумине («Биолот») в течение 30 мин. Далее, препараты окрашены первичными антителами LC3B («ABclonal», США; A19665; 1 : 500) в течение 60 мин и вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 («Jackson ImmunoResearch Laboratories», США; 1 : 400), в течение 60 мин. Детекцию полученных результатов проводили на конфокальном микроскопе Leica TCS-SP5 («Leica Microsystem GmbH», Германия). Полученные результаты проанализированы с использованием программы Fiji (версия 2.14.0/1.54f).

Определение уровня белков фосфорилированной формы mTOR, GCase, альфа-синуклеина и LC3B методом вестерн-блота. Количество общего белка определяли с использованием набора Pierce BCA Protein Assay kit («Thermo Scientific», Литва). Равные количества белка разделены на электрофорезе в полиакриламидном геле (20%-ный SDS-PAGE – для белка LC3B, 12%-ный SDS-PAGE – для остальных белков) и перенесены на поливинилпирролидонную мембрану («Bio-Rad», США). Изме-

рение уровня белков фосфорилированной формы mTOR (Ser2448), GCase, альфа-синуклеина (фосфорилированная (Ser129), мономерная и тетрамерная формы), LC3B в первичной культуре макрофагов периферической группы неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y в присутствии ингибитора протеинкиназы mTOR в различных концентрациях и без ингибитора проводилось с использованием соответствующих «первичных антител» в разведении 1 : 1000: Phospho-mTOR-S2448, «ABclonal», AP0094, США; Glucosylceramidase beta (GBA), «ABclonal», A8420; Phospho- α -Synuclein (Ser129) (D1R1R), «Cell Signal», #23706, США; anti-alpha-synuclein oligomeric, «Sigma», ABN2265, США; LC3B, «ABclonal», A19665 и «вторичных антител» (goat anti-rabbit HRP conjugate, «Abcam», ab6721, Великобритания; 1 : 5000), конъюгированных с пероксидазой. Окраска «вторичных антител» производилась системой для детекции Clarity Western ECL Blotting Substrate («Bio-Rad»). Количество исследуемого белка нормировано на соответствующие показатели для референсного белка GAPDH («ABclonal», AC036; 1 : 15 000). Для каждого белка эксперименты были выполнены в трех повторах. Результаты вестерн-блота проанализированы с использованием программы Fiji (версия 2.14.0/1.54f).

Оценка активности лизосомных ферментов и концентрации лизосфинголипидов. Оценку ферментативной активности лизосомных ферментов (GCase, альфа-галактозидаза (GLA) и сфингомиелиназа (ASMase)) и концентрации соответствующих субстратов (гексазилсфингозин (HexSph) – смесь гликозилсфингозина и галактозилсфингозина; лизосфингомиелин (LysoSM) и лизоглоботриаозилсфингозин (LysoGb3)) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y в присутствии Торина 1 в различных концентрациях и без него по протоколу, описанному нами ранее [24, 28–30]. Все измерения были выполнены в трех повторах.

Статистика. Статистическая обработка выполнена с использованием встроенных и предустановленных пакетов «R» (версия 4.3.2) (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>). Оценка нормальности полученных вариационных рядов была проведена по методу Шапиро–Уилка. Для оценки различий между группами использовали парный тест Вилкоксона. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Клинические характеристики представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение, экспериментальные значения – медиана (мин-макс).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время в мире активно ведется поиск терапевтических мишеней для лечения БП. В данном исследовании было изучено дозозависимое влияние ингибитора mTOR на параметры клетки, изменение которых ассоциировано с патогенезом данного заболевания.

Оценка эффективности ингибирования mTOR в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при культивировании в присутствии ингибитора Торин 1. Для выбора оптимальной концентрации ингибитора протеинкиназы mTOR Торина 1 была оценена выживаемость клеток в первичной культуре макрофагов периферической крови и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y в присутствии Торина 1. В дальнейшее исследование были включены концентрации Торина 1, приводящие к уменьшению жизнеспособности клеток как в первичной культуре макрофагов периферической крови, так и в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y не более, чем на 80%: 25, 50, 100, 200 нМ.

Эффективность дозозависимого ингибирования протеинкиназы mTOR Торин 1 на первичной культуре макрофагов периферической крови

неврологически здоровых индивидов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y оценивалась по снижению относительного уровня фосфорилированной формы белка mTOR (Ser2448) (рис. 1, а и б). Показано снижение относительного уровня белка фосфорилированной формы mTOR (Ser2448) в первичной культуре макрофагов периферической крови при обработке культуры Торин 1 по сравнению с необработанной культурой клеток при всех исследуемых концентрациях без достижения статистической значимости (рис. 1, в). На клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y было также выявлено снижение относительного уровня белка фосфорилированной формы mTOR (Ser2448) при обработке Торин 1 с достижением статистически значимых различий при концентрациях 100 и 200 нМ по сравнению с необработанной культурой клеток ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно; рис. 1, г).

Влияние дозозависимого ингибирования протеинкиназы mTOR Торин 1 на аутофагию, лизосомную активность и уровень белка GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Изменение степени аутофагии в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидов

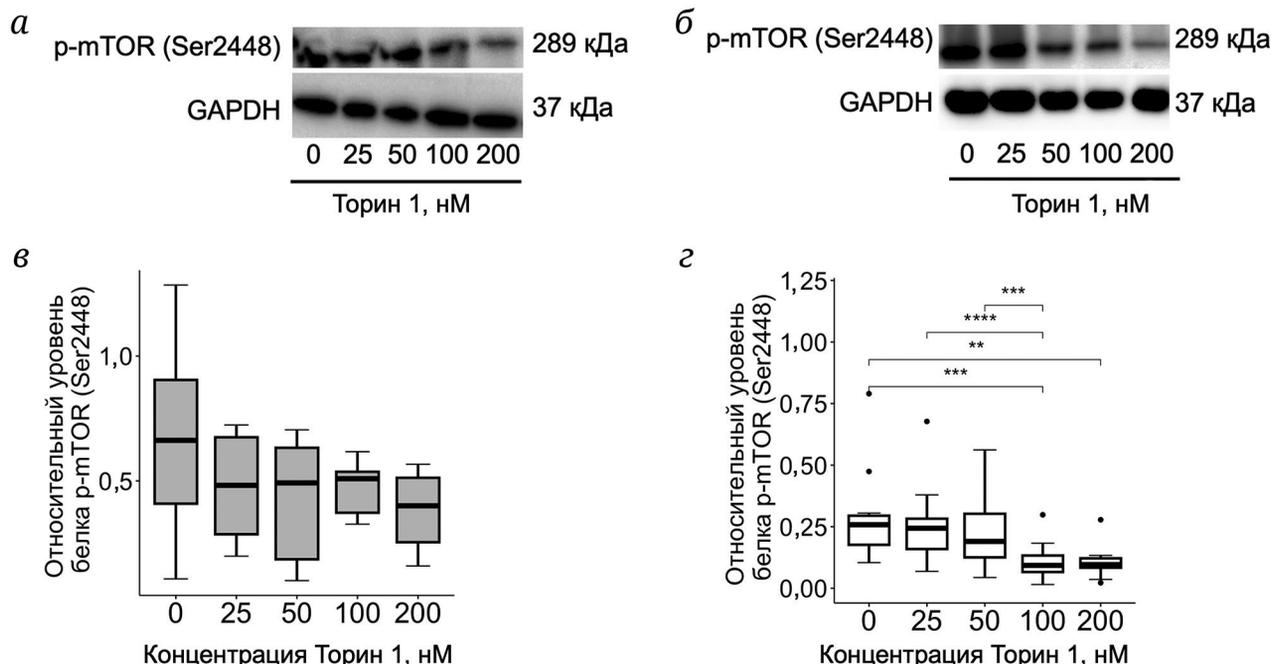


Рис. 1. Влияние дозозависимого ингибирования протеинкиназы mTOR Торин 1 на уровень белка фосфорилированной формы mTOR (Ser2448). а – Данные вестерн-блота для фосфорилированной формы белка mTOR (Ser2448) в первичной культуре макрофагов периферической крови; б – данные вестерн-блота для фосфорилированной формы белка mTOR (Ser2448) в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. в – Относительный уровень фосфорилированной формы белка mTOR (Ser2448) в первичной культуре макрофагов периферической крови ($n = 6$, где n – число независимых образцов); г – относительный уровень фосфорилированной формы белка mTOR (Ser2448) в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y ($n = 5$, где n – число независимых клеточных линий). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

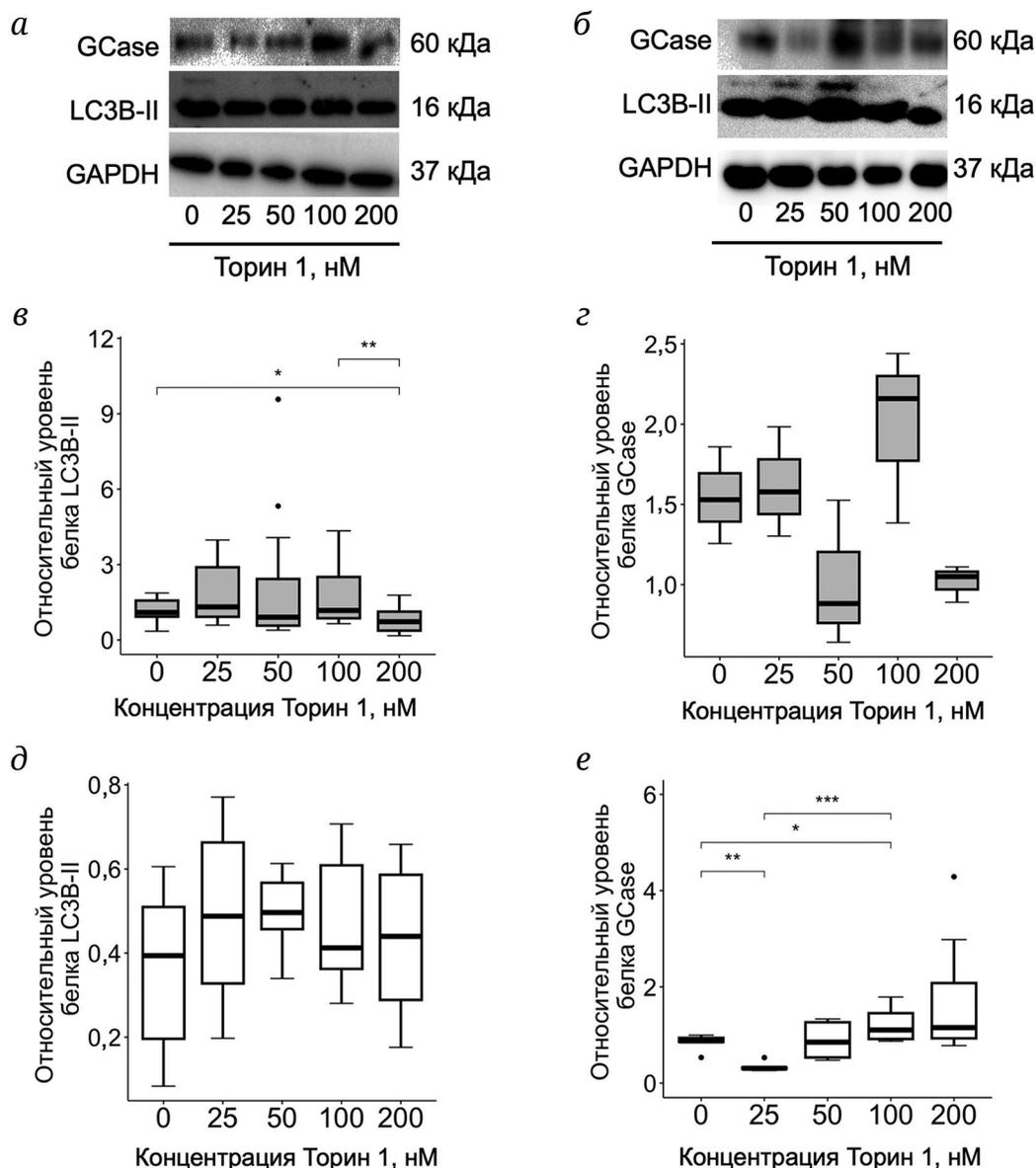


Рис. 2. Влияние дозозависимого ингибирования протеинкиназы mTOR Торинем 1 на уровень белков LC3B-II и GCase. *a* – Данные вестерн-блота для белков LC3B-II и GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови; *б* – данные вестерн-блота для белков LC3B-II и GCase в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. *в* – Относительный уровень белка LC3B-II в первичной культуре макрофагов периферической крови ($n = 6$, где n – число независимых образцов); *г* – относительный уровень белка GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови ($n = 6$, где n – число независимых образцов); *д* – относительный уровень белка LC3B-II в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y ($n = 5$, где n – число независимых клеточных линий); *е* – относительный уровень белка GCase в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y ($n = 5$, где n – число независимых клеточных линий). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y оценивалась по относительному уровню основного маркера аутофагии, белка LC3B-II, и флуоресцентному окрашиванию белка LC3B и лизосом, предполагая, что колокализация LC3B с лизосомами может интерпретироваться как слияние аутофагосом с лизосомами (рис. 2, *a* и *б*; рис. 3, *a* и *б*) [31].

В первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидов при обработке Торинем 1 в концентрации

200 нМ наблюдалось выраженное снижение относительного уровня белка LC3B-II по сравнению с клетками, обработанными индуктором аутофагии в концентрации 100 нМ, и необработанной культурой клеток ($p < 0,05$; рис. 2, *в*). При концентрациях Торина 1 25, 50 и 100 нМ было показано увеличение уровня LC3B-II, но без достижения статистической значимости ($p > 0,05$; рис. 2, *в*). На клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y также не было выявлено статистически значимого

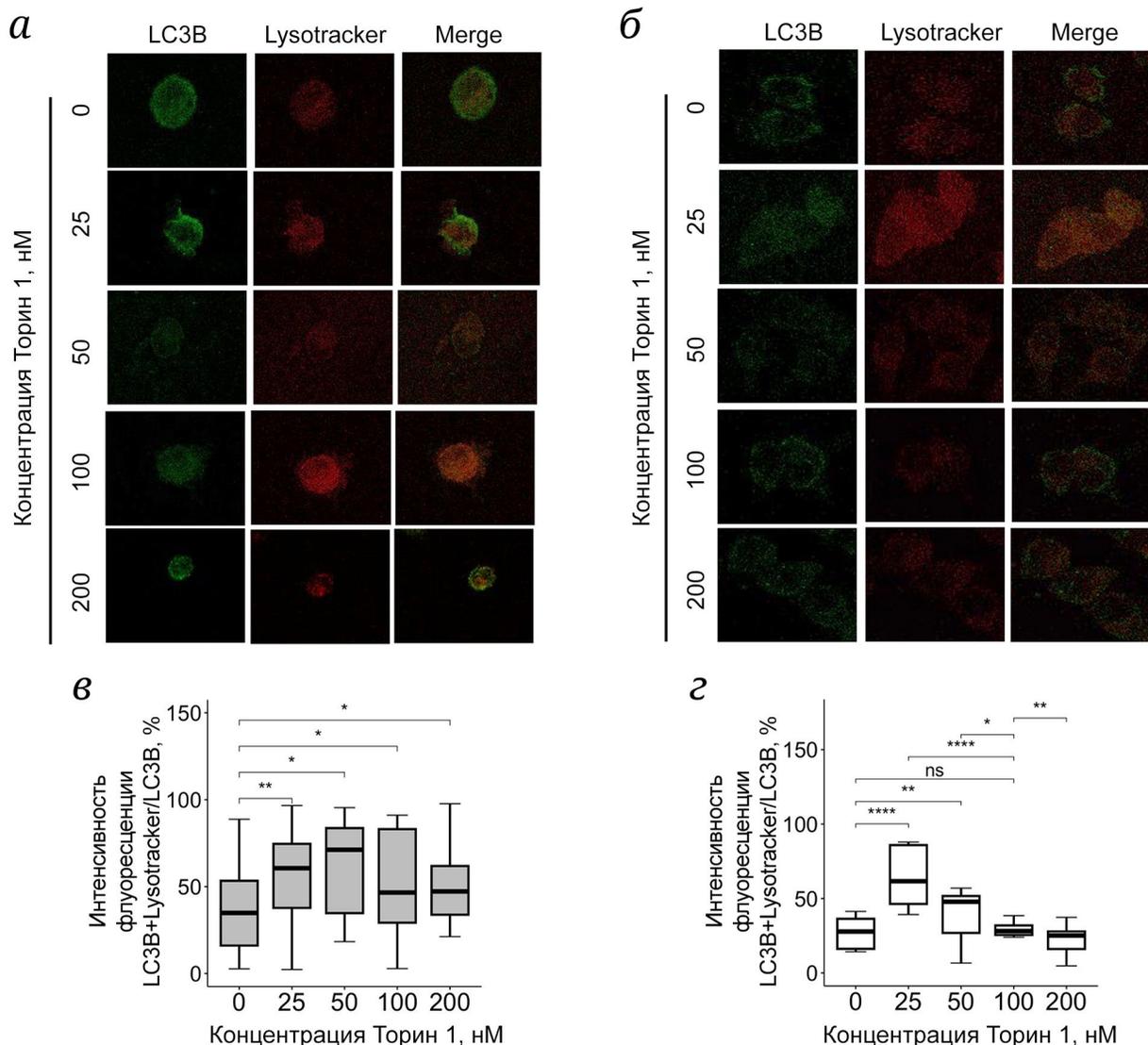


Рис. 3. Оценка степени колокализации LC3B с лизосомами при дозозависимом ингибировании протеинкиназы mTOR Торин 1. *a* – Данные иммунофлуоресценции для белка LC3B и лизосом в первичной культуре макрофагов периферической крови, 10 мкм; *б* – данные иммунофлуоресценции для белка LC3B и лизосом в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y, 10 мкм. *в* – Степень колокализации LC3B с лизосомами в первичной культуре макрофагов периферической крови ($n = 6$, где n – число независимых образцов); *г* – степень колокализации LC3B с лизосомами клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y ($n = 5$, где n – число независимых клеточных линий). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns – без статистической значимости

увеличения уровня белка LC3B-II при добавлении ингибитора Торин 1 во всех исследуемых концентрациях (рис. 2, д).

Также было показано увеличение степени колокализации LC3B с лизосомами в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов при обработке Торин 1 во всех исследуемых концентрациях по сравнению с клетками без добавления индуктора ($p < 0,05$; рис. 3, в). Обнаружено увеличение степени колокализации LC3B с лизосомами в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при обработке Торин 1 в концентрациях 25 и 50 нМ по сравнению с необработанными

клетками ($p < 0,01$ и $p < 0,0001$ соответственно; рис. 3, г).

В данном исследовании была оценена активность лизосомных ферментов (GCase, GLA, ASMase) и концентрация лизосфинголипидов (HexSph, LysoGb3, LysoSM), которые вовлечены в метаболизм церамидов и связаны с патогенезом БП [28–30, 32, 33], в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при добавлении индуктора аутофагии, Торина 1 (рис. 4). Интересно отметить, что только концентрация 100 нМ Торина 1 не приводила к изменению активности лизосомных ферментов

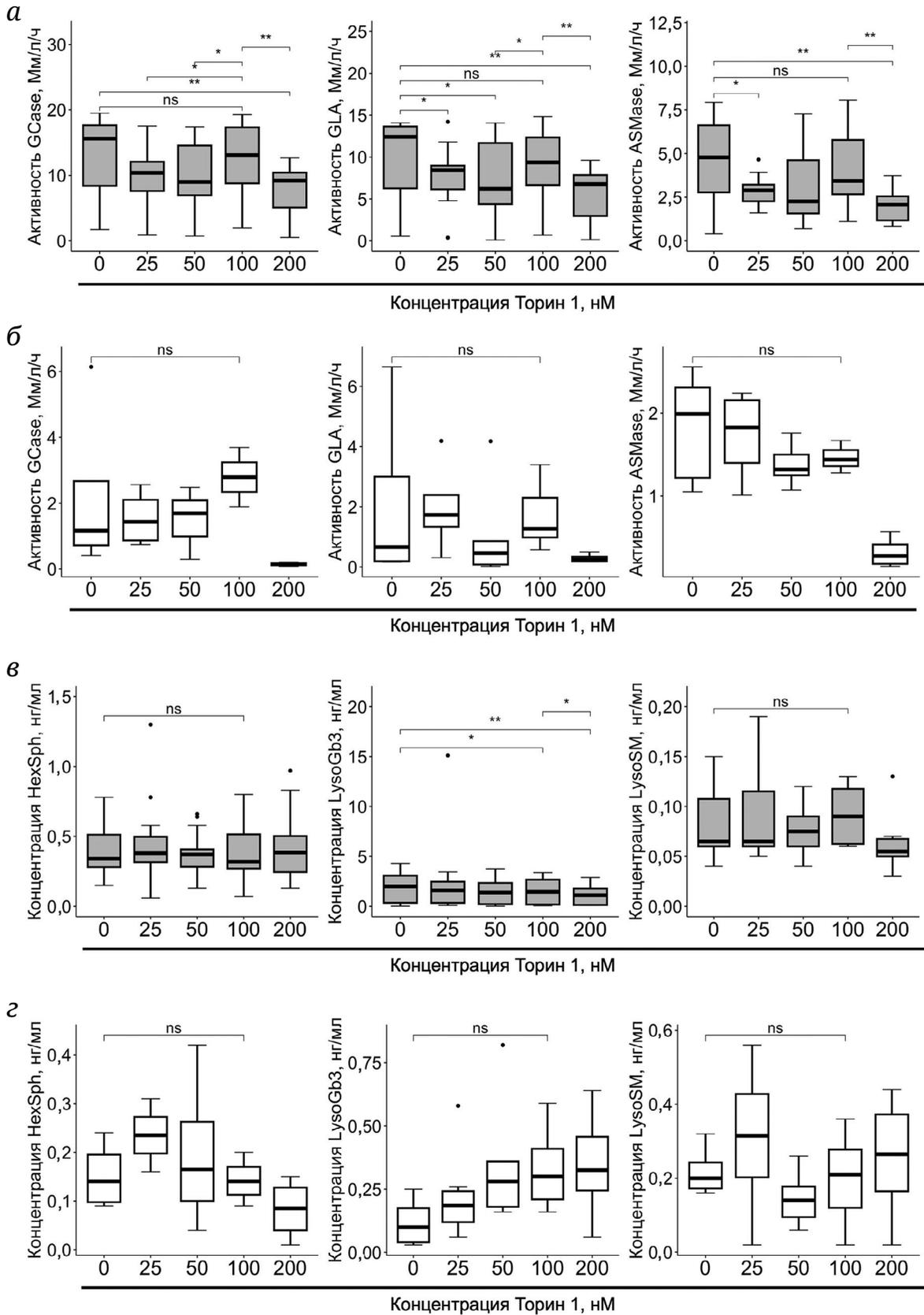


Рис. 4. Активность лизосомных ферментов (GCase, GLA, ASMase) и концентрации соответствующих лизосфинголипидов (HexSph, LysoGb3, LysoSM) при дозозависимом ингибировании протеинкиназы mTOR Торинином 1 в первичной культуре макрофагов периферической крови (*а* и *в*; $n = 6$, где n – число независимых образцов) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (*б* и *г*; $n = 5$, где n – число независимых клеточных линий). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns – без статистической значимости

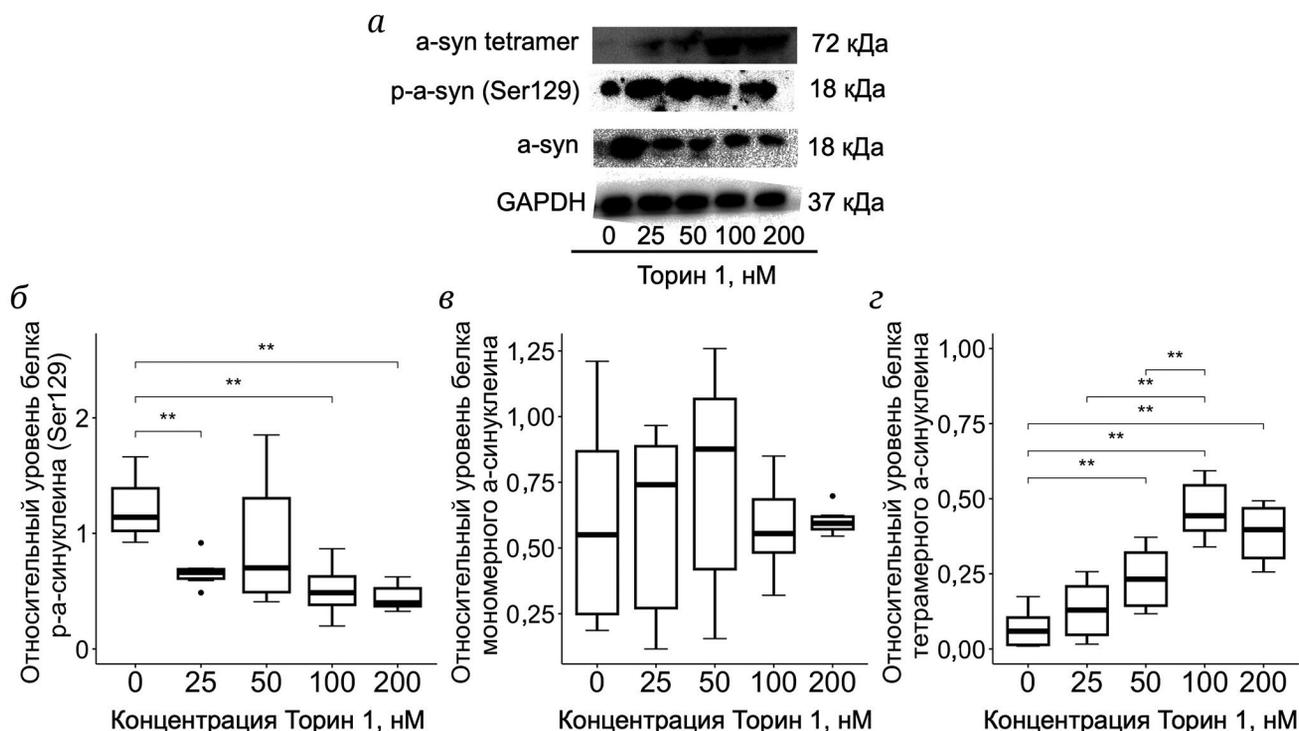


Рис. 5. Влияние дозозависимого ингибирования протеинкиназы mTOR Торином 1 на уровень различных форм белка альфа-синуклеина (мономерный, фосфорилированный (Ser129), тетрамерный) в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y ($n = 5$, где n – число независимых клеточных линий). **а** – Данные вестерн-блота для различных форм белка альфа-синуклеина (мономерный, фосфорилированный (Ser129), тетрамерный). **б** – Относительный уровень фосфорилированной (Ser129) формы белка альфа-синуклеина; **в** – относительный уровень мономерной формы белка альфа-синуклеина; **г** – относительный уровень тетрамерной формы белка альфа-синуклеина; ** $p < 0,01$

и концентраций лизосфинголипидов по сравнению с необработанными культурами клеток ($p > 0,05$).

Впервые было показано увеличение относительного уровня белка GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов (рис. 2, г) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (рис. 2, е) при обработке двух культур клеток Торином 1 в концентрации 100 нМ ($p > 0,05$ и $p < 0,05$ соответственно) по сравнению с культурами клеток без добавления индуктора аутофагии.

Влияние дозозависимого ингибирования протеинкиназы mTOR Торином 1 на уровень различных форм белка альфа-синуклеина (мономерный, фосфорилированный (Ser129), тетрамерный) на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Относительный уровень различных форм белка альфа-синуклеина был оценен в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (рис. 5). Определение уровня белка альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов периферической крови не было проведено ввиду недостаточной чувствительности метода для оценки альфа-синуклеина в данном типе клеток. В результате было выявлено снижение фосфорилированной формы белка альфа-

синуклеина (Ser129) при обработке клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y Торином 1 в концентрациях 25, 100 и 200 нМ по сравнению с необработанными клетками ($p < 0,01$; рис. 5, а и б). Наряду со снижением фосфорилированной формы белка (Ser129), впервые было выявлено увеличение уровня тетрамерного альфа-синуклеина при обработке Торином 1 в концентрациях 50, 100 и 200 нМ по сравнению с необработанной культурой ($p < 0,01$; рис. 5, а и г). Уровень мономерного белка альфа-синуклеина в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при обработке Торином 1 не достигал статистически значимых изменений ($p > 0,05$; рис. 5, а и в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день не существует нейропротекторной терапии, способной замедлить или остановить развитие БП. Используемые лекарственные препараты являются симптоматическими. Поэтому актуальным является поиск новых терапевтических мишеней для лечения БП, способных снизить накопление белка альфа-синуклеина и скорость гибели нейронов. Последние

данные указывают на ключевую роль дисфункции лизосом и процессов аутофагии в патогенезе БП [34, 35]. Одними из перспективных мишеней для разработки терапии БП на сегодняшний день являются белки, участвующие или регулирующие процессы аутофагии [36–38].

В данном исследовании было изучено дозозависимое влияние ингибирования протеинкиназы mTOR, которая является ключевой молекулой в процессе регуляции аутофагии, на параметры клетки, изменение которых ассоциировано с патогенезом БП. Нами впервые показано, что ингибирование mTOR в различных концентрациях Торина 1 влияет на активность лизосомных гидролазов и концентрацию их субстратов лизосфинголипидов, увеличение уровня белка GCse на первичной культуре макрофагов периферической крови и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y, а также на снижение фосфорилированной формы белка альфа-синуклеина (Ser129) на фоне увеличения его тетрамерной формы на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при добавления индуктора аутофагии.

Молекула mTOR – это серин-треониновая протеинкиназа, которая существует в клетке в виде субъединицы внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2, которые, в свою очередь, входят в сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR. Путь PI3K/AKT/mTOR играет важную роль в регуляции передачи сигнала и различных биологических процессов, таких как пролиферация клеток, апоптоз, метаболизм, ангиогенез, воспаление, а также в поддержании лизосомной функции и процессов аутофагии [39, 40]. Нарушение работы сигнального киназного каскада PI3K/AKT/mTOR, влияя на процессы аутофагии, может приводить к накоплению белковых агрегатов и гибели клеток при различных протеинопатиях и в том числе при БП [41, 42]. В частности, ранее в черной субстанции мышей с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП)-индуцированным паркинсонизмом было показано изменение уровня фосфорилированного белка mTOR, а на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y с миссенс-мутацией A53T в гене SNCA, наиболее распространенной мутацией в гене SNCA, приводящей к развитию аутосомно-доминантной формы БП с ранним началом, показано усиление передачи сигналов mTOR/P70S6K и нарушение аутофагии, что, в свою очередь, способствует еще большей агрегации альфа-синуклеина A53T [43–45]. Кроме того, в исследовании, выполненном на аутоптатах головного мозга, было выявлено увеличение уровня mTOR в височной коре пациентов с деменцией с тельцами Леви, которые так же, как и пациенты с БП, характеризуются накоплением белка альфа-

синуклеина [46]. Увеличение уровня фосфорилированной формы белка mTOR было показано и на нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), полученных от пациентов с GBA1-БП, в ходе протеомного анализа и вестерн-блота [11, 12]. Таким образом, mTOR может являться перспективной молекулой для разработки терапии GBA1-БП.

Однако результаты по ингибированию протеинкиназной активности mTOR носят противоречивый характер, так как в различных моделях БП наблюдались как нейропротекторные, так и нейротоксические эффекты, которые могут быть связаны с нарушением баланса mTOR, в частности, из-за концентраций используемых ингибиторов, приводя к гибели клеток [8, 19]. В настоящее время ингибиторы киназной активности mTOR разделены на четыре класса: антибиотические аллостерические ингибиторы, которые селективно ингибируют комплекс mTORC1 (ингибиторы первого поколения, рапамицин и его рапологи); АТФ-конкурентные ингибиторы, способные ингибировать комплексы mTORC1 и mTORC2 (ингибиторы второго поколения, Ku-0063794, WYE-3541, Торин 1 и др.); ингибиторы двойной специфичности киназной активности mTOR и PI3K (ингибиторы второго поколения, GNE477, NVP-BEZ235 и др.); другие новые ингибиторы (третье поколение, P529, Rapalink и др.) [47]. Сегодня прямые и опосредованные ингибиторы киназной активности mTOR находятся на стадиях клинических испытаний для терапии различных нейродегенеративных заболеваний и протеинопатий (БП (NCT05357989, NCT05781711); болезнь Гентингтона (NCT04826692); болезнь Альцгеймера (NCT03748706, NCT04511416); боковой амиотрофический склероз (NCT04577404)). В нашем исследовании в качестве ингибитора киназной активности mTOR был выбран прямой ингибитор mTOR Торин 1, который на сегодняшний момент не находится на стадии клинических испытаний для терапии нейродегенеративных заболеваний. Однако на мышах с индукцией паркинсонизма и на клеточных линиях, полученных от пациентов, являющихся биаллельными носителями мутаций в гене GBA1 (с болезнью Гоше), и пациентов с GBA1-БП была показана эффективность Торина 1 в отношении основных биохимических характеристик патогенеза БП, а именно: снижение уровня фосфорилированной формы альфа-синуклеина (Ser129), восстановление работы аутофаголизосомной системы и снижение степени нейродегенерации [12, 23, 48], что делает его перспективным препаратом для терапии БП, в частности GBA1-БП.

В нашем исследовании впервые на клеточных моделях было оценено дозозависимое влияние ингибирования киназной активности mTOR

на работу лизосом по изменению уровня основного маркера аутофагии LC3B-II, уровня белка GCase, а также по изменению активности лизосомных гидролаз и концентрации лизосфинголипидов. Показано, что в присутствии ингибитора mTOR Торина 1 в концентрациях 25, 50 и 100 нМ в первичной культуре макрофагов периферической крови и в концентрациях 25, 50, 100 и 200 нМ в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y происходит незначительное увеличение относительно уровня белка LC3B-II, которое сопровождается увеличением степени колокализации белка LC3B с лизосомами в первичной культуре макрофагов периферической крови при добавлении Торина 1 во всех исследуемых концентрациях и в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при добавлении Торина 1 в концентрациях 25 и 50 нМ. Ранее было показано, что ингибирование киназной активности mTOR на мышинных моделях с МФТП-индуцированным паркинсонизмом и в клеточной линии нейробластомы с токсичными катионами 1-метил-4-фенилпиридиния (МФП+) приводит к изменению уровня белка LC3 и увеличению уровня экспрессии LAMP1, основного маркера лизосом, на уровне мРНК и белка [43, 49]. На нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с GBA1-БП после воздействия Торина 1, было также показано увеличение уровня белка LC3B-II в присутствии хлорокина, который является ингибитором аутофагосомной деградации [12].

Для оценки активности лизосомных гидролаз были выбраны ферменты GCase, GLA, ASMase и сфинголипиды HexSph, LysoGb3, LysoSM, участвующие в обмене церамидов, нарушение которого ассоциировано с патогенезом БП [28–30, 32, 33]. Лизосомные ферменты GCase, GLA, ASMase кодируются генами *GBA1*, *GLA*, *SMPD1* соответственно. Мутации в данных генах приводят к классу лизосомных болезней накопления, характеризующиеся снижением активности ферментов и накоплением лизосфинголипидов, а также являются фактором риска БП [50]. Нами впервые было показано снижение активности ферментов при всех исследуемых концентрациях Торина 1 на первичной культуре макрофагов периферической крови и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y, кроме концентрации 100 нМ, при которой сохранялись активности ферментов и концентрации субстратов, как без добавления индуктора аутофагии. Данный результат позволяет предположить, что концентрации 25, 50 и 200 нМ Торина 1 могут приводить к дисбалансу процессов в клетке, в частности, к нарушению работы лизосом, что может приводить в итоге к гибели клетки [8, 19]. Кроме того, мы впервые оценили влияние ингибитора Торин 1 на относительный уровень фермента GCase, активность которого снижается при

GBA1-БП и сБП [51–53]. Относительный уровень белка GCase увеличивался в первичной культуре макрофагов периферической крови при воздействии Торина 1 в концентрациях 25, 100 нМ и в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при воздействии Торина 1 в концентрациях 50, 100 и 200 нМ. Ранее другой ингибитор RTB101, ингибитор киназной активности двойной специфичности к молекулам mTOR и PI3K, снижал уровень глюкозилцерамида – основного субстрата GCase – в крови и спинномозговой жидкости пациентов с GBA1-БП [54].

Интересно отметить, что ранее так же было показано влияние индукторов mTOR-зависимой аутофагии на уровень белка альфа-синуклеина – ключевого белка в патогенезе БП [12, 17, 18]. Альфа-синуклеин существует в клетках в различных формах. При этом фосфорилированная форма альфа-синуклеина (Ser129) способствует его агрегации и является наиболее токсичной для клетки и чаще всего встречается в составе патологических включений при БП [55]. Обсуждается, что тетрамерная форма белка является физиологической и наиболее стабильной формой, в отличие от мономерной, к образованию нейротоксичных олигомеров [56]. В данном исследовании мы показали снижение фосфорилированного уровня белка альфа-синуклеина (Ser129) без изменений в уровне мономерного на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при обработке Торин 1 в концентрациях 25, 100 и 200 нМ по сравнению с необработанными клетками. Ранее на клеточных и животных моделях с гиперэкспрессией альфа-синуклеина ингибирование молекулы mTOR приводило к дозозависимому снижению уровня фосфорилированной (Ser129) и мономерной форм белка альфа-синуклеина [17, 18, 57, 58]. Снижение фосфорилированного альфа-синуклеина (Ser129) без достижения статистической значимости при обработке Торин 1 было показано на нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с GBA1-БП [12]. Механизм, который лежит в основе снижения фосфорилированной формы белка альфа-синуклеина за счет ингибирования киназной активности mTOR Торин 1, не известен. Однако при ингибировании активности mTOR метформином, являющимся ингибитором второго поколения, как и Торин 1, на первичной культуре нейронов гиппокампа мышей была показана активация протеинфосфатазы 2A (PP2A), способной дефосфорилировать белок альфа-синуклеин [18]. В то же время нами впервые было показано увеличение уровня тетрамерной формы белка альфа-синуклеина в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y при обработке Торин 1 всеми исследуемыми концентрациями по сравнению с необработанными клетками.

Данное исследование имеет ряд ограничений. Первичная культура макрофагов периферической крови была получена от неврологически здоровых индивидуумов, а клеточная линия нейробластомы SH-SY5Y была использована без индукции паркинсонизма и дисфункции фермента GCase. Необходимы дальнейшие исследования на пациент-специфических клетках, полученных от пациентов с БП, в частности, GBA1-БП и клеточных линиях, отражающих нозологию изучаемого заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что нейропротекторные свойства Торина 1 ранее были показаны на животных моделях и на клеточных культурах, наше исследование, выполненное на первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y, расширяет представления о действии ингибитора mTOR Торин 1 на параметры клетки, изменение которых может быть связано с БП. Так, нами показано, что различные концентрации Торина 1 могут приводить к снижению активности лизосомных гидролаз и увеличению концентраций лизосфинголипидов, что может быть фатально для клетки. Однако оптимальные концентрации Торина 1 могут способствовать индукции аутофагии на фоне увеличения белка GCase, снижения фосфорилированного альфа-синуклейна (Ser129), увеличения его тетрамерной формы при отсутствии выраженного изменения активности лизосомных гидролаз и концентрации лизосфинголипидов. Ингибирование

протеинкиназы mTOR Торином 1 может быть перспективным подходом для разработки терапии БП, в частности GBA1-БП, однако, вероятно, будет необходим тщательный подбор терапевтических доз. Подобные исследования обладают научной значимостью, так как позволяют расширить представления о молекулярных механизмах действия различных химических веществ и оценить их перспективу использования для терапии заболеваний.

Вклад авторов. Т.С. Усенко – концепция и руководство работой; А.И. Безрукова, К.С. Башарова, Г.В. Байдакова – проведение экспериментов; А.И. Безрукова, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина, Т.С. Усенко – обсуждение результатов исследования; А.И. Безрукова – написание текста; Т.С. Усенко – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-25-00212).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Исследование одобрено этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова (протокол № 275 от 04.09.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Surmeier, D. J. (2018) Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease, *FEBS J.*, **285**, 3657-3668, <https://doi.org/10.1111/febs.14607>.
2. Morris, H. R., Spillantini, M. G., Sue, C. M., and Williams-Gray, C. H. (2024) The pathogenesis of Parkinson's disease, *Lancet*, **403**, 293-304, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01478-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01478-2).
3. Kouli, A, Torsney, K. M., and Kuan, W. L. (2018) Parkinson's disease: etiology, neuropathology, and pathogenesis, in *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* (Stoker, T. B., and Greenland, J. C., eds) Brisbane (AU), Codon Publications, Chap. 1, <https://doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch1>.
4. Lynch-Day, M. A., Mao, K., Wang, K., Zhao, M., and Klionsky, D. J. (2012) The role of autophagy in Parkinson's disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2**, a009357, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009357>.
5. Hou, X., Watzlawik, J. O., Fiesel, F. C., and Springer, W. (2020) Autophagy in Parkinson's disease, *J. Mol. Biol.*, **432**, 2651-2672, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.037>.
6. Nechushtai, L., Frenkel, D., and Pinkas-Kramarski, R. (2023) Autophagy in Parkinson's disease, *Biomolecules*, **13**, 1435, <https://doi.org/10.3390/biom13101435>.
7. Khan, M. R., Yin, X., Kang, S.-U., Mitra, J., Wang, H., Ryu, T., Brahmachari, S., Karuppagounder, S. S., Kimura, Y., Jhaldiyal, A., Kim, H. H., Gu, H., Chen, R., Redding-Ochoa, J., Troncoso, J., Na, C. H., Ha, T., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2024) Enhanced mTORC1 signaling and protein synthesis in pathologic α -synuclein cellular and animal models of Parkinson's disease, *Sci. Transl. Med.*, **15**, eadd0499, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.add0499>.

8. Lan, A., Chen, J., Zhao, Y., Chai, Z., and Hu, Y. (2017) mTOR signaling in Parkinson's disease, *Neuromol. Med.*, **19**, 1-10, <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8417-7>.
9. Usenko, T., Bezrukova, A., Rudenok, M. M., Basharova, K., Shadrina, M. I., Slominsky, P. A., Zakharova, E., and Pchelina, S. (2023) Whole transcriptome analysis of substantia nigra in mice with MPTP-induced parkinsonism bearing defective glucocerebrosidase activity, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 12164, <https://doi.org/10.3390/ijms241512164>.
10. Usenko, T., Bezrukova, A., Basharova, K., Panteleeva, A., Nikolaev, M., Kopytova, A., Miliukhina, I., Emelyanov, A., Zakharova, E., and Pchelina, S. (2021) Comparative transcriptome analysis in monocyte-derived macrophages of asymptomatic GBA mutation carriers and patients with GBA-associated Parkinson's disease, *Genes (Basel)*, **12**, 1545, <https://doi.org/10.3390/genes12101545>.
11. Bogetofte, H., Ryan, B. J., Jensen, P., Schmidt, S. I., Vergoossen, D. L. E., Barnkob, M. B., Kiani, L. N., Chughtai, U., Heon-Roberts, R., Caiazza, M. C., McGuinness, W., Márquez-Gómez, R., Vowles, J., Bunn, F. S., Brandes, J., Kilfeather, P., Connor, J. P., Fernandes, H. J. R., Caffrey, T. M., Meyer, M., Cowley, S. A., Larsen, M. R., and Wade-Martins, R. (2023) Post-translational proteomics platform identifies neurite outgrowth impairments in Parkinson's disease GBA-N370S dopamine neurons, *Cell Rep.*, **42**, 112180, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112180>.
12. Mubariz, F., Saadin, A., Lingenfelter, N., Sarkar, C., Banerjee, A., Lipinski, M. M., and Awad, O. (2023) Deregulation of mTORC1-TFEB axis in human iPSC model of GBA1-associated Parkinson's disease, *Front. Neurosci.*, **17**, 1152503, <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1152503>.
13. Yu, L., Hu, X., Xu, R., Zhao, Y., Xiong, L., Ai, J., Wang, X., Chen, X., Ba, Y., Xing, Z., Guo, C., Mi, S., and Wu, X. (2024) Piperine promotes PI3K/AKT/mTOR-mediated gut-brain autophagy to degrade α -synuclein in Parkinson's disease rats, *J. Ethnopharmacol.*, **322**, 117628, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117628>.
14. Zhang, G., Yin, L., Luo, Z., Chen, X., He, Y., Yu, X., Wang, M., Tian, F., and Luo, H. (2021) Effects and potential mechanisms of rapamycin on MPTP-induced acute Parkinson's disease in mice, *Ann. Palliat. Med.*, **10**, 2889-2897, <https://doi.org/10.21037/apm-20-1096>.
15. Sidransky, E., and Lopez, G. (2012) The link between the GBA gene and parkinsonism, *Lancet Neurol.*, **11**, 986-998, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70190-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70190-4).
16. Emelyanov, A. K., Usenko, T. S., Tesson, C., Senkevich, K. A., Nikolaev, M. A., Miliukhina, I. V., Kopytova, A. E., Timofeeva, A. A., Yakimovsky, A. F., Lesage, S., Brice, A., and Pchelina, S. N. (2018) Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set, *Neurobiol. Aging*, **71**, 267.e7-267.e10, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.027>.
17. Xu, J., Ao, Y.-L., Huang, C., Song, X., Zhang, G., Cui, W., Wang, Y., Zhang, X. Q., and Zhang, Z. (2022) Harmol promotes α -synuclein degradation and improves motor impairment in Parkinson's models via regulating autophagy-lysosome pathway, *NPJ Parkinsons Dis.*, **8**, 100, <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00361-4>.
18. Pérez-Revuelta, B. I., Hettich, M. M., Ciociaro, A., Rotermund, C., Kahle, P. J., Krauss, S., and Di Monte, D. A. (2014) Metformin lowers Ser-129 phosphorylated α -synuclein levels via mTOR-dependent protein phosphatase 2A activation, *Cell Death Dis.*, **5**, e1209, <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.175>.
19. Zhu, Z., Yang, C., Iyaswamy, A., Krishnamoorthi, S., Sreenivasmurthy, S. G., Liu, J., Wang, Z., Tong, B. C., Song, J., Lu, J., Cheung, K. H., and Li, M. (2019) Balancing mTOR signaling and autophagy in the treatment of Parkinson's disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 728, <https://doi.org/10.3390/ijms20030728>.
20. Xicoy, H., Wieringa, B., and Martens, G. J. M. (2017) The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review, *Mol. Neurodegener.*, **12**, 10, <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>.
21. Kopytova, A. E., Rychkov, G. N., Nikolaev, M. A., Baydakova, G. V., Cheblokov, A. A., Senkevich, K. A., Bogdanova, D. A., Bolshakova, O. I., Miliukhina, I. V., Bezrukikh, V. A., Salogub, G. N., Sarantseva, S. V., Usenko, T. C., Zakharova, E. Y., Emelyanov, A. K., and Pchelina, S. N. (2021) Ambroxol increases glucocerebrosidase (GCase) activity and restores GCase translocation in primary patient-derived macrophages in Gaucher disease and parkinsonism, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **84**, 112-121, <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.02.003>.
22. Aflaki, E., Stubblefield, B. K., Maniawang, E., Lopez, G., Moaven, N., Goldin, E., Marugan, J., Patnaik, S., Dutra, A., Southall, N., Zheng, W., Tayebi, N., and Sidransky, E. (2014) Macrophage models of Gaucher disease for evaluating disease pathogenesis and candidate drugs, *Sci. Transl. Med.*, **6**, 240ra73, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008659>.
23. Brown, R. A., Voit, A., Srikanth, M. P., Thayer, J. A., Kingsbury, T. J., Jacobson, M. A., Lipinski, M. M., Feldman, R. A., and Awad, O. (2019) mTOR hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in Gaucher's disease iPSC-neuronal cells, *Dis. Model Mech.*, **12**, dmm038596, <https://doi.org/10.1242/dmm.038596>.
24. Усенко Т. С., Башарова К. С., Безрукова А. И., Николаев М. А., Милухина И. В., Байдакова Г. В., Захарова Е. Ю., Пчелина С. Н. (2022) Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона, *Медицинская генетика*, **21**, 26-29, <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.26-29>

25. Kopytova, A. E., Rychkov, G. N., Cheblokov, A. A., Grigor'eva, E. V., Nikolaev, M. A., Yarkova, E. S., Sorogina, D. A., Ibatullin, F. M., Baydakova, G. V., Izyumchenko, A. D., Bogdanova, D. A., Boitsov, V. M., Rybakov, A. V., Miliukhina, I. V., Bezrukih, V. A., Salogub, G. N., Zakharova, E. Y., Pchelina, S. N., and Emelyanov, A. K. (2023) Potential binding sites of pharmacological chaperone NCGC00241607 on mutant beta-glucocerebrosidase and its efficacy on patient-derived cell cultures in Gaucher and Parkinson's disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 9105, <https://doi.org/10.3390/ijms24109105>.
26. Norradee, C., Khwanraj, K., Balit, T., and Dharmasaroja, P. (2023) Evaluation of the combination of metformin and rapamycin in an MPP⁺-treated SH-SY5Y model of Parkinson's disease, *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.*, 3830861, <https://doi.org/10.1155/2023/3830861>.
27. Martínez, M.-A., Rodríguez, J.-L., Lopez-Torres, B., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.-R., Maximiliano, J. E., Anadón, A., and Ares, I. (2020) Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways, *Environ. Int.*, **135**, 105414, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105414>.
28. Pchelina, S., Baydakova, G., Nikolaev, M., Senkevich, K., Emelyanov, A., Kopytova, A., Miliukhina, I., Yakimovskii, A., Timofeeva, A., Berkovich, O., Fedotova, E., Illarioshkin, S., and Zakharova, E. (2018) Blood lysosphingolipids accumulation in patients with Parkinson's disease with glucocerebrosidase 1 mutations, *Mov. Disord.*, **33**, 1325-1330, <https://doi.org/10.1002/mds.27393>.
29. Usenko, T. S., Senkevich, K. A., Bezrukova, A. I., Baydakova, G. V., Basharova, K. S., Zhuravlev, A. S., Gracheva, E. V., Kudrevatykh, A. V., Miliukhina, I. V., Krasakov, I. V., Khublarova, L. A., Fursova, I. V., Zakharov, D. V., Timofeeva, A. A., Irishina, Y. A., Palchikova, E. I., Zalutskaya, N. M., Emelyanov, A. K., Zakharova, E. Y., and Pchelina, S. N. (2022) Impaired sphingolipid hydrolase activities in dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy, *Mol. Neurobiol.*, **59**, 2277-2287, <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02688-0>.
30. Usenko, T., Bezrukova, A., Basharova, K., Baydakova, G., Shagimardanova, E., Blatt, N., Rizvanov, A., Limankin, O., Novitskiy, M., Shnayder, N., Izyumchenko, A., Nikolaev, M., Zabolina, A., Lavrinova, A., Kulabukhova, D., Nasyrova, R., Palchikova, E., Zalutskaya, N., Miliukhina, I., Barbitoff, Y., Glotov, O., Glotov, A., Taraskina, A., Neznanov, N., Zakharova, E., and Pchelina, S. (2024) Altered sphingolipid hydrolase activities and alpha-synuclein level in late-onset schizophrenia, *Metabolites*, **14**, 30, <https://doi.org/10.3390/metabo14010030>.
31. Tsukuba, T., Yanagawa, M., Kadowaki, T., Takii, R., Okamoto, Y., and Yamamoto, K. (2013) Cathepsin E deficiency impairs autophagic proteolysis in macrophages, *PLoS One*, **8**, e82415, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082415>.
32. Usenko, T. S., Senkevich, K. A., Basharova, K. S., Bezrukova, A. I., Baydakova, G. V., Tyurin, A. A., Beletskaya, M. V., Kulabukhova, D. G., Grunina, M. N., Emelyanov, A. K., Miliukhina, I. V., Timofeeva, A. A., Zakharova, E. Y., and Pchelina, S. N. (2023) LRRK2 exonic variants are associated with lysosomal hydrolase activities and lysosphingolipid alterations in Parkinson's disease, *Gene*, **882**, 147639, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147639>.
33. Pchelina, S., Emelyanov, A., Baydakova, G., Andoskin, P., Senkevich, K., Nikolaev, M., Miliukhina, I., Yakimovskii, A., Timofeeva, A., Fedotova, E., Abramycheva, N., Usenko, T., Kulabukhova, D., Lavrinova, A., Kopytova, A., Garaeva, L., Nuzhnyi, E., Illarioshkin, S., and Zakharova, E. (2017) Oligomeric α -synuclein and glucocerebrosidase activity levels in GBA-associated Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.*, **636**, 70-76, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.039>.
34. Navarro-Romero, A., Montpeyó, M., and Martinez-Vicente, M. (2020) The emerging role of the lysosome in Parkinson's disease, *Cells*, **9**, 2399, <https://doi.org/10.3390/cells9112399>.
35. Lu, J., Wu, M., and Yue, Z. (2020) Autophagy and Parkinson's disease, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1207**, 21-51, https://doi.org/10.1007/978-981-15-4272-5_2.
36. Sanchez-Mirasierra, I., Ghimire, S., Hernandez-Diaz, S., and Soukup, S. F. (2022) Targeting macroautophagy as a therapeutic opportunity to treat Parkinson's disease, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 921314, <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.921314>.
37. Moors, T. E., Hoozemans, J. J. M., Ingrassia, A., Beccari, T., Parnetti, L., Chartier-Harlin, M. C., and van de Berg, W. D. J. (2017) Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease, *Mol. Neurodegener.*, **12**, 11, <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0154-3>.
38. Kinet, R., and Dehay, B. (2023) Pathogenic aspects and therapeutic avenues of autophagy in Parkinson's disease, *Cells*, **12**, 621, <https://doi.org/10.3390/cells12040621>.
39. Saxton, R. A., and Sabatini, D. M. (2017) mTOR signaling in growth, metabolism, and disease, *Cell*, **168**, 960-976, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>.
40. Panwar, V., Singh, A., Bhatt, M., Tonk, R. K., Azizov, S., Raza, A. S., Sengupta, S., Kumar, D., and Garg, M. (2023) Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease, *Signal Transduct. Target Ther.*, **8**, 375, <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01608-z>.

41. Chrienova, Z., Nepovimova, E., and Kuca, K. (2021) The role of mTOR in age-related diseases, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **36**, 1678-1692, <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1955873>.
42. Perluigi, M., Di Domenico, F., and Butterfield, D. A. (2015) mTOR signaling in aging and neurodegeneration: at the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy, *Neurobiol. Dis.*, **84**, 39-49, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.014>.
43. Siracusa, R., Paterniti, I., Cordaro, M., Crupi, R., Bruschetta, G., Campolo, M., Cuzzocrea, S., and Esposito, E. (2018) Neuroprotective effects of temsirolimus in animal models of Parkinson's disease, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 2403-2419, <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0496-4>.
44. Jiang, T. F., Zhang, Y. J., Zhou, H. Y., Wang, H. M., Tian, L. P., Liu, J., Ding, J. Q., and Chen, S. D. (2013) Curcumin ameliorates the neurodegenerative pathology in A53T α -synuclein cell model of Parkinson's disease through the downregulation of mTOR/P70S6K signaling and the recovery of macroautophagy, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **8**, 356-369, <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9431-7>.
45. Zhang, Z. N., Hui, Z., Chen, C., Liang, Y., Tang, L. L., Wang, S. L., Xu, C. C., Yang, H., Zhao, Y., and Zhang, J. S. (2021) Mechanism of autophagy regulation in MPTP-induced PD mice via the mTOR signaling pathway by echinacoside, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **17**, 1397-1411, <https://doi.org/10.2147/NDT.S299810>.
46. Crews, L., Spencer, B., Desplats, P., Patrick, C., Paulino, A., Rockenstein, E., Hansen, L., Adame, A., Galasko, D., and Masliah, E. (2010) Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of α -synucleinopathy, *PLoS One*, **5**, e9313, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009313>.
47. Chen, Y., and Zhou, X. (2020) Research progress of mTOR inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, **208**, 112820, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112820>.
48. Zhuang, X.-X., Wang, S.-F., Tan, Y., Song, J.-X., Zhu, Z., Wang, Z. Y., Wu, M. Y., Cai, C. Z., Huang, Z. J., Tan, J. Q., Su, H. X., Li, M., and Lu, J. H. (2020) Pharmacological enhancement of TFEB-mediated autophagy alleviated neuronal death in oxidative stress-induced Parkinson's disease models, *Cell Death Dis.*, **11**, 128, <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2322-6>.
49. Dehay, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., and Vila, M. (2010) Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease, *J. Neurosci.*, **30**, 12535-12544, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010>.
50. Robak, L. A., Jansen, I. E., van Rooij, J., Uitterlinden, A. G., Kraaij, R., Jankovic, J., International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC), Heutink, P., and Shulman, J. M. (2017) Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease, *Brain*, **140**, 3191-3203, <https://doi.org/10.1093/brain/awx285>.
51. Murphy, K., Gysbers, A., Abbott, S., Tayebi, N., Kim, W. S., Sidransky, E., Cooper, A., Garner, B., and Halliday, G. M. (2014) Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease, *Brain*, **137**, 834-848, <https://doi.org/10.1093/brain/awt367>.
52. Oftedal, L., Maple-Grødem, J., Dalen, I., Tysnes, O.-B., Pedersen, K. F., Alves, G., and Lange, J. (2023) Association of CSF glucocerebrosidase activity with the risk of incident dementia in patients with Parkinson disease, *Neurology*, **100**, e388-e395, <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000201418>.
53. Chiasserini, D., Paciotti, S., Eusebi, P., Persichetti, E., Tasegian, A., Kurzawa-Akanbi, M., Chinnery, P. F., Morris, C. M., Calabresi, P., Parnetti, L., and Beccari, T. (2015) Selective loss of glucocerebrosidase activity in sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, *Mol. Neurodegener.*, **10**, 15, <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0010-2>.
54. Schneider, S. A., and Alcalay, R. N. (2020) Precision medicine in Parkinson's disease: emerging treatments for genetic Parkinson's disease, *J. Neurol.*, **267**, 860-869, <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09705-7>.
55. Anderson, J.P., Walker, D.E., Goldstein, J.M., De Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P. S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M. G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W. P., and Chilcote, T. J. (2006) Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α -synuclein in familial and sporadic Lewy body disease, *J. Biol. Chem.*, **281**, 29739-29752, <https://doi.org/10.1074/jbc.M600933200>.
56. Bartels, T., Choi, J. G., and Selkoe, D. J. (2011) α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation, *Nature*, **477**, 107-111, <https://doi.org/10.1038/nature10324>.
57. Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., and Björklund, A. (2013) TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E1817-E1826, <https://doi.org/10.1073/pnas.1305623110>.
58. Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., and Rubinsztein, D. C. (2003) α -Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome, *J. Biol. Chem.*, **278**, 25009-25013, <https://doi.org/10.1074/jbc.M300227200>.

**DOSE-DEPENDENT ALTERATIONS
OF LYSOSOMAL ACTIVITY AND ALPHA-SYNUCLEIN
IN PERIPHERAL BLOOD MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES
AND SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELL LINE BY UPON INHIBITION
OF mTOR PROTEIN KINASE – ASSESSMENT OF THE PROSPECTS
OF PARKINSON’S DISEASE THERAPY**

**A. I. Bezrukova^{1,2*}, K. S. Basharova¹, G. V. Baydakova³, E. Y. Zakharova³,
S. N. Pchelina^{1,2}, and T. S. Usenko^{1,2}**

¹ *Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov
of National Research Centre “Kurchatov Institute”,*

188300 Gatchina, Leningrad Region, Russia; e-mail: bezrukova_ai@pnpi.nrcki.ru

² *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 197022 Saint Petersburg, Russia*

³ *Research Center for Medical Genetics, 115522 Moscow, Russia*

To date, the molecular mechanisms of the common neurodegenerative disorder Parkinson’s disease (PD) are unknown and, as a result, there is no neuroprotective therapy that may stop or slow down the process of neuronal cell death. The aim of the current study was to evaluate the prospects of using the mTOR molecule as a potential target for PD therapy due dose-dependent effect of mTOR kinase activity inhibition on cellular parameters, the alteration of which is associated with pathogenesis of the PD. The study was performed on peripheral blood monocyte-derived macrophages and SH-SY5Y neuroblastoma cell line. As a result, we have first showed that inhibition of mTOR by Torin1 only at a concentration of 100 nM affects the level of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase), encoded by the *GBA1* gene, mutations in which are a high-risk factor for PD, and leads also to a decrease in pathological phosphorylated (Ser129) form of alpha-synuclein, an increase in its aggregation resistant tetrameric form in absence of the changes in lysosomal enzyme activities and lysosphingolipids concentrations. Inhibition of the protein kinase mTOR may be a promising approach for developing therapy for PD, in particular *GBA1*-associated PD.

Keywords: Parkinson’s disease, mTOR, Torin 1, alpha-synuclein, glucocerebrosidase, autophagy, lysosomal enzyme activity, lysosphingolipids

ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ДИНАМИКА ВОЗБУЖДЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ДОНОРА ЭЛЕКТРОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ *Rhodobacter sphaeroides*

© 2024 А.М. Христин, Т.Ю. Фуфина, Р.А. Хатыпов*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: rgreen1@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.10.2023

После доработки 03.06.2024

Принята к публикации 06.06.2024

Методом фемтосекундной дифференциальной оптической спектроскопии исследована динамика возбужденного первичного донора электрона в реакционных центрах пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*. С использованием глобального анализа и методом интервалов обнаружена корреляция затухания колебательной когерентности возбужденного первичного донора электрона со временем жизни состояния с разделенными зарядами $P^+V_A^-$, что свидетельствует об обратимости переноса электрона на первичный акцептор электрона – молекулу V_A . В реакционных центрах проявляются признаки суперпозиции двух электронных состояний P на задержках времени менее 200 фс. Высказано предположение, что величина примеси состояния с переносом заряда $P_A^+P_B^-$ к возбужденному первичному донору электрона P^* составляет ~24%. Полученные результаты обсуждаются с точки зрения механизма двухшагового переноса электрона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фемтосекундная спектроскопия, бактериальные реакционные центры, состояние с переносом заряда, фотохимическое разделение зарядов.

DOI: 10.31857/S0320972524070091 EDN: WMOYCT

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то что фотохимические реакции в реакционном центре (РЦ) исследуются уже несколько десятилетий, предметом дискуссий являются факторы, определяющие предельно высокую эффективность процесса разделения зарядов. В РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* первичным донором электрона P является димер сильно взаимодействующих между собой молекул бактериохлорофилла, P_A и P_B . При поглощении кванта света первичный донор электрона фотоокисляется и передает электрон на молекулу мономерного бактериохлорофилла a (V_A), а затем на молекулу бактериофеофитина a (H_A). Существует единое мнение, что молекула V_A непосредственно участвует в переносе электрона на H_A [1–6],

однако не исключается, что перенос электрона может также осуществляться и по механизму суперобмена [7]. В последнее время появляется все больше фактов, что к возбужденному первичному донору электрона может примешиваться состояние с переносом заряда $P_A^+P_B^-$, и это состояние вовлечено в процесс переноса электрона на молекулу V_A [8–12]. Недавно на основе данных, полученных методом двумерной спектроскопии, было обнаружено, что электронная когерентность связывает возбужденное состояние P^* и состояние с переносом заряда $P_A^+P_B^-$, а колебательная когерентность способствует стабилизации состояния с разделенными зарядами $P^+V_A^-$, и оба вида когерентности обеспечивают высокую квантовую эффективность разделения зарядов в РЦ [13–16]. Ранее методом спектроскопии Штарка были об-

Принятые сокращения: РЦ – реакционный центр; V_A – мономерный бактериохлорофилл a в активной цепи кофакторов переноса электрона; DADS – дифференциальные спектры поглощения, связанные с экспоненциальным затуханием; H_A – бактериофеофитин a ; P – специальная пара бактериохлорофиллов P_A (P_L) и P_B (P_M), которая является первичным донором электрона; P^* – возбужденный первичный донор электрона; P^* – нижний экситонный уровень возбужденного первичного донора электрона; $P_A^+P_B^-$ – состояние с переносом заряда; $P^+V_A^-$ и $P^+H_A^-$ – состояния с разделенными зарядами; *Rba.* – *Rhodobacter*.

* Адресат для корреспонденции.

наружены признаки диполя $P_A^+P_B^-$ в основном состоянии первичного донора электрона [17, 18]. В возбужденном состоянии P^* признаки частичного разделения зарядов $P_A^{\delta+}P_B^{\delta-}$ были обнаружены методом возбуждения-зондирования [8, 9]. Образование состояния с переносом заряда объясняют процессами электронно-колебательной релаксации в первичном доноре электрона, которые приводят к сдвигу стимулированного излучения [19–21]. Возможность существования состояния с переносом заряда была показана теоретически. В частности, было высказано предположение, что при возбуждении первичного донора электрона происходит сдвиг электронной плотности от молекулы P_A к P_B , а уровень энергии состояния с переносом заряда $P_A^+P_B^-$ примешивается к экситонным уровням P^* [22–24]. Как известно, при возбуждении первичного донора электрона P импульсами света длительностью менее 30 фс в кинетике стимулированного излучения наблюдаются осцилляции, которые связаны с когерентным движением ядерной системы в первичном доноре электрона P^* [25–27]. Теоретическое моделирование осцилляций показало, что в процессе разделения зарядов в РЦ функциональными являются моды 130 см^{-1} и 30 см^{-1} [28–31]. Квантово-механические вычисления показали, что свидетельством образования промежуточного состояния с переносом заряда $P_A^+P_B^-$ может являться дефазировка низкочастотных колебательных мод, проявляющихся в осцилляциях стимулированного излучения [11]. Кроме того, на формирование состояния с переносом заряда существенное влияние оказывает экситонное взаимодействие между молекулами P_A и P_B [11]. Как известно, в результате экситонного взаимодействия происходит расщепление Q_y оптического перехода первичного донора электрона на нижний (P_{-}^*) и верхний (P_{+}^*) экситонные уровни. При криогенных температурах максимум Q_y -полосы поглощения P смещается от 870 нм до 900 нм. Одним из объяснений сдвига длинноволновой полосы поглощения P при понижении температуры является предположение, что состояние с переносом заряда расположено выше нижнего экситонного уровня на шкале энергии [32]. Положение уровня энергии верхнего экситонного уровня P_{+}^* остается предметом исследований, и по разным данным он находится либо в области 790 нм [33], либо 810–815 нм [34–36], либо при 840 нм [37].

В данной работе с целью получения новой информации о последовательности сверхбыстрых стадий разделения зарядов в РЦ пурпурной бактерии *Rba. sphaeroides* проведены исследования спектральных и кинетических свойств возбужденного первичного донора электрона при селективном возбуждении первичного донора импульсами

света длительностью 25 фс. Для визуализации кинетики сильно перекрывающихся спектральных полос в дифференциальных спектрах поглощения мы использовали метод интервалов. В реакционных центрах с открытым и заблокированным переносом электрона исследовали поглощение из возбужденного состояния первичного донора электрона. В качестве РЦ с открытым переносом электрона использовали РЦ дикого типа *Rba. sphaeroides*, а с заблокированным переносом электрона – мутант M160LN + L131LN + M197FN, в котором в криогенных условиях полностью блокируется перенос электрона на ближайшие акцепторы – V_A и H_A [38, 39].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление образца. Конструирование рекомбинантного штамма *Rba. sphaeroides*, содержащего мутантные РЦ с аминокислотными заменами в положениях M160LN + L131LN + M197FN было описано в работе Хмельницкого и др. [40]. Реакционные центры *Rba. sphaeroides* дикого типа и мутанта выделяли согласно описанной ранее методике [41]. Для измерений при физиологических температурах РЦ были суспендированы в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 0,1% Triton X-100, и сконцентрированы до поглощения 0,5 при 870 нм (длина оптического пути – 1 мм). Для измерений в криогенных условиях образец смешивали с глицерином (60%, v/v), помещали в криостат («Specac», Великобритания) и замораживали до 100 К. Спектры поглощения реакционных центров (рис. П1 в Приложении) измеряли на спектрофотометре UV1800 («Shimadzu», Япония).

Дифференциальная абсорбционная спектроскопия. Фемтосекундные дифференциальные спектры поглощения получали с использованием спектрометра, работающего по методу накачки-зондирования. Титан-сапфировый лазер MaiTai SP («Spectra-Physics», США) использовали для генерации импульсов длительностью ~25 фс при длине волны 800 нм и частоте повторения 84 МГц. Импульсы генератора поступали в оптический регенеративный усилитель Spitfire Ace («Spectra-Physics»), на выходе которого получали ~35-фс импульсы на длине волны 800 нм с энергией ~3 мДж и частотой повторения 10 Гц. Часть энергии импульса (~750 мкДж) использовали для накачки коллинеарного оптического параметрического усилителя OPA800CF («Spectra-Physics»), перестраиваемого в диапазоне длин волн 1100–2900 нм. Частоту параметрических холостых импульсов удваивали на нелинейном кристалле и получали излучение на длине волны 870 нм (890 нм) с шириной на половине высоты ~55 нм для селектив-

ного возбуждения первичного донора электрона в реакционных центрах *Rba. sphaeroides* (рис. П1 в Приложении). Дисперсию групповой скорости параметрического импульса компенсировали с помощью двух призм LakL21 («Newport», США). Длительность сжатого возбуждающего импульса не превышала 25 фс. Энергия импульса возбуждения составляла ~ 10 мкДж. Импульсы возбуждения ослабляли и фокусировали на кювету с образцом так, чтобы возбуждать не более 10% первичного донора электрона. Каждый второй возбуждающий импульс блокировали синхронным механическим затвором SR 475 («Stanford Research Systems», США). Поляризацию возбуждающего импульса устанавливали параллельно по отношению к импульсу зондирующему. В канале зондирования малую долю импульса фундаментальной частоты (~ 1 мкДж) направляли на подвижный ретрорефлектор на платформе M531.DD («Physik Instrumente», Германия), регулирующий задержку времени между импульсами возбуждения и зондирования, и использовали для генерации суперконтинуума на воде в кварцевой кювете толщиной 5 мм. С помощью светофильтра ИКС1 выделяли спектральную область от 750 до 1100 нм. Полученный спектрально широкий импульс делили на зондирующий и опорный импульсы. Оба импульса вогнутым зеркалом фокусировали на вращающуюся кварцевую кювету с образцом. Длина оптического пути кюветы составляла 1 мм. Далее зондирующий и опорный импульсы направляли на входную щель спектрографа Spectra Pro 2300i («Acton Research», США), и спектры излучения регистрировали ПЗС-камерой Pixis 400BR («Princeton Instruments», США). Для повышения соотношения сигнал/шум проводили накопление 500 измерений спектров излучения зондирующего и опорного импульсов на каждой задержке времени. Спектры излучения зондирующего и опорного импульсов использовали для вычисления дифференциальных спектров поглощения (рис. П2 в Приложении). В отдельном эксперименте определяли дисперсию групповой скорости зондирующего импульса по сигналу нерезонансного отклика буферного раствора. В диапазоне длин волн от 870 до 940 нм временная дисперсия составляла порядка ~ 50 фс. С такой величиной дисперсии длительность зондирующего импульса на отдельной длине волны не превышала 25 фс и позволяла исследовать осцилляции стимулированного излучения, что согласуется с работой итальянских исследователей [42]. Для вычисления дважды дифференциальных спектров исходные дифференциальные спектры поглощения корректировали на величину дисперсии групповой скорости. Весь массив дифференциальных спектров поглощения аппрок-

симировали суммой экспонент с характерными амплитудами и временами жизни и получали дифференциальные спектры поглощения, связанные с экспоненциальным затуханием (decay-associated difference spectra, DADS) [43], используя программу Glotaran [44].

Метод интервалов. Кинетику отдельных полос в дифференциальных спектрах поглощения строили по методу интервалов [45]. На каждой задержке времени амплитуду полосы поглощения рассчитывали по формуле:

$$\Delta A = \Delta A_m - (\Delta A_{m-\delta} + \Delta A_{m+\delta})/2, \quad (1)$$

где ΔA_m – изменения поглощения в максимуме полосы, $\Delta A_{m-\delta}$ и $\Delta A_{m+\delta}$ – изменения поглощения в равноудаленных от максимума точках спектра, δ – величина смещения от максимума полосы. Кинетику полосы поглощения получали, применяя указанную выше формулу к исходным дифференциальным спектрам поглощения на всех задержках времени. Зависимость построенной таким образом амплитуды полосы поглощения от времени отличается от кинетики изменений поглощения на фиксированной длине волны тем, что она преимущественно принадлежит исследуемой полосе поглощения и в значительно меньшей степени содержит вклад соседних спектральных компонентов. Полученные кинетические кривые изменений поглощения сдвигали на шкале времени на величину дисперсии зондирующего импульса. Очевидно, что этот подход дает хороший результат при исследовании спектрально узких полос, например полосы поглощения анион-радикала B_A^- при 1020 нм или Q_x -полосы поглощения молекулы H_A^- при 545 нм [45], и менее эффективен для перекрывающихся полос большой спектральной ширины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование стимулированного излучения возбужденного первичного донора электрона в РЦ *Rba. sphaeroides*. На рис. 1, а представлены дифференциальные спектры поглощения, измеренные в ближней инфракрасной области спектра на выбранных задержках времени при селективном возбуждении первичного донора электрона импульсами света длительностью ~ 25 фс. На задержке времени 40 фс выцветание длинноволновой полосы поглощения первичного донора электрона достигает максимального значения. В дифференциальном спектре поглощения на этой задержке времени наблюдается отрицательная полоса с максимумом при 870 нм, обусловленная выцветанием полосы поглощения R_{870} и

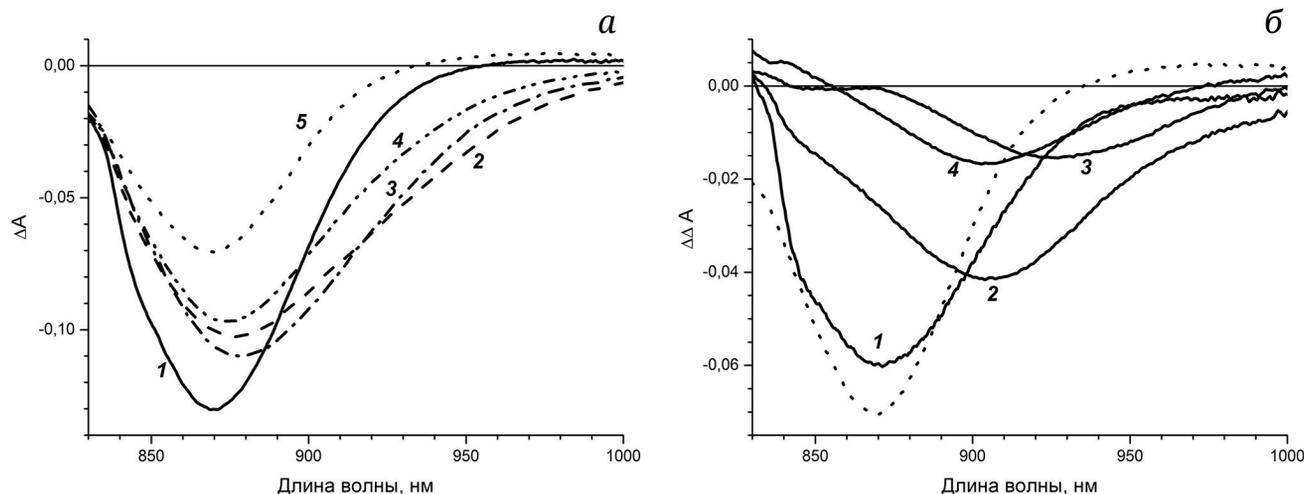


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения РЦ *Rba. Sphaeroides* (а) на задержках времени 40 фс (кривая 1), 180 фс (кривая 2), 300 фс (кривая 3), 1,5 пс (кривая 4) и 210 пс (кривая 5), измеренные при температуре 293 К. б – Дважды дифференциальные спектры поглощения, полученные вычитанием спектров на задержках времени: 40 фс минус 210 пс (кривая 1), 1,5 пс минус 210 пс (кривая 2), 180 фс минус 1,5 пс (кривая 3) и 300 фс минус 1,5 пс (кривая 4); пунктиром показан спектр ΔA , измеренный на задержке времени 210 пс

стимулированным излучением из возбужденного состояния (рис. 1, а; кривая 1). К задержке времени 180 фс стимулированное излучение смещается из максимума поглощения первичного донора в длинноволновую область спектра (рис. 1, а; кривая 2). При увеличении времени задержки до 300 фс происходит смещение стимулированного излучения в коротковолновую область, связанное с обратимыми осцилляциями (рис. 1, а; кривые 2 и 3), которые затухают к задержке времени ~1,5 пс (рис. 1, а; кривая 4). На задержке времени 210 пс в дифференциальном спектре поглощения стимулированное излучение полностью отсутствует (рис. 1, а; кривая 5). Таким образом, из рис. 1, а видно, что с течением времени стимулированное излучение смещается на шкале длин волн.

Для того чтобы найти положение максимума стимулированного излучения на разных задержках времени мы построили дважды дифференциальные спектры поглощения (рис. 1, б). Так, на задержке времени 40 фс в дважды дифференциальном спектре, полученном вычитанием дифференциального спектра, измеренного на задержке времени 210 пс, из спектра, измеренного на задержке времени 40 фс, наблюдается стимулированное излучение, совпадающее с длинноволновой полосой поглощения R_{870} (рис. 1, б; кривая 1). Очевидно, что на задержке времени ~40 фс стимулированное излучение локализовано в максимуме полосы поглощения Р, поскольку первичный донор электрона селективно возбуждался импульсами света, спектр излучения которых практически совпадал с полосой поглощения Р (рис. 1, б (пунктир); рис. П1 в Приложении). Максимум не осциллирующего стимулированного излучения можно наблюдать в дважды дифференциальном

спектре, полученном вычитанием дифференциального спектра поглощения, измеренного на задержке времени 210 пс, из дифференциального спектра на задержке времени 1,5 пс (рис. 1, б; кривая 2). Как видно из рис. 1, максимум этого излучения находится в области ~915 нм и совпадает с максимумом спонтанной флуоресценции [46]. Осциллирующие компоненты стимулированного излучения проявляются в дважды дифференциальных спектрах, полученных вычитанием дифференциального спектра, измеренного на задержке времени 1,5 пс, из дифференциальных спектров, измеренных на задержках времени 180 фс и 300 фс. Из сопоставления переходных спектров на задержках времени 180 и 300 фс, представленных на рис. 1, а (кривые 2 и 3), можно заметить, что максимальные изменения стимулированного излучения наблюдаются на длинах волн 885 нм и 960 нм. Однако из дважды дифференциальных спектров поглощения (рис. 1, б; кривые 3 и 4) видно, что стимулированное излучение на задержке времени 180 фс и на задержке времени 300 фс в силу большой ширины различается на этих длинах волн, но имеет максимум излучения при 940 нм или 905 нм соответственно. Можно предположить, что максимум стимулированного излучения в результате колебательной релаксации обратимо смещается на шкале длин волн в области 905–940 нм и после нескольких периодов модуляций локализуется в области 915 нм. Однако при разложении дифференциального спектра поглощения на сумму гауссовых полос на отдельных задержках времени стимулированное излучение не описывается одной гауссовой функцией. Так, на задержке времени 180 фс наблюдается одновременно и излучение при 915 нм, и излучение

при 940 нм (рис. П3 в Приложении). Стимулированное излучение при 940 нм особенно хорошо выражено в виде отчетливого плеча на длинноволновом склоне полосы Р в дифференциальных спектрах поглощения, измеренных при криогенных температурах (рис. П2 в Приложении). Представленные на рис. 1 спектры позволяют заключить, что стимулированное излучение отражает как некогерентную, так и когерентную динамику возбужденного первичного донора электрона. Максимум стимулированного излучения наблюдается при 915 нм, а излучение при 905 и 940 нм проявляется в виде сателлитов основного излучения, возникающих вследствие либо частотной, либо амплитудной модуляции.

Кинетические кривые стимулированного излучения, полученные методом интервалов.

Для того чтобы визуализировать кинетику полос стимулированного излучения мы использовали метод интервалов. В стационарном спектре поглощения длинноволновая полоса поглощения первичного донора электрона при 870 нм имеет ширину на половине высоты ~ 60 нм. Мы построили кинетическую кривую отрицательной полосы с максимумом при 870 нм на интервале длин волн от 840 до 900 нм (рис. 2, а). Представленная на рис. 2, а кинетика обусловлена как выцветанием полосы поглощения первичного донора электрона, так и стимулированным излучением, локализованным в максимуме поглощения Р, которое удваивает амплитуду выцветания. Стимулированное излучение спадает с константой времени ~ 60 фс вследствие смещения излучения из максимума поглощения первичного донора в длинноволновую область. В кинетике отрицательной полосы при 870 нм наблюдается лишь одна слабая осцилляция на задержке времени ~ 300 фс, которая, возможно, является результатом вклада осциллирующего излучения при 905 нм. Наблюдаемое смещение стимулированного излучения из области поглощения Р может быть обусловлено сдвигом Стокса [12, 21, 47] либо образованием состояния с переносом заряда [47].

Исходя из того, что стимулированное излучение проявляется в дважды дифференциальных спектрах поглощения в виде отрицательных полос, соизмеримых по ширине с полосой поглощения Р (рис. 1, б), мы построили методом интервалов кинетику полос поглощения с максимумами при 940 и 915 нм на интервалах длин волн 910–970 нм и 885–945 нм соответственно (рис. 2, б и в). Следует отметить, что выцветающая полоса поглощения первичного донора электрона, перекрывающаяся со стимулированным излучением и доминирующая по амплитуде, при построении кинетических кривых методом интервалов вносит положительный вклад в области от 900 до 970 нм.

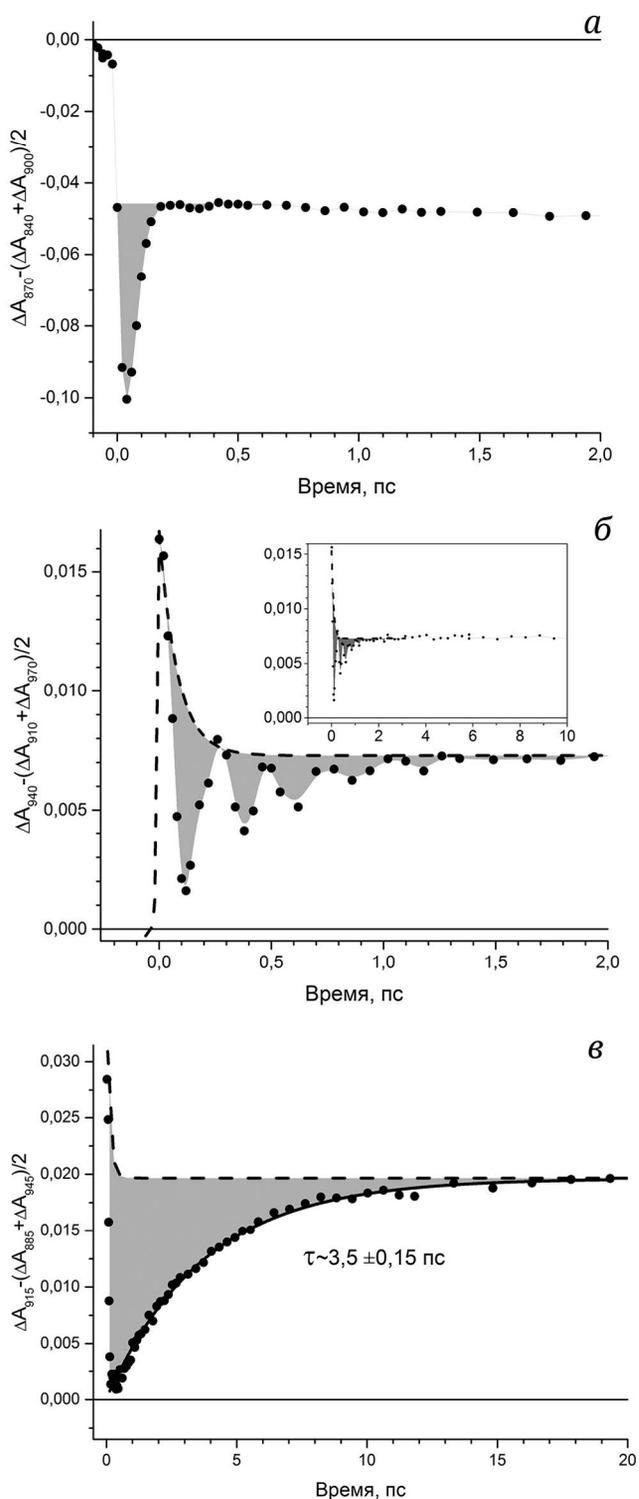


Рис. 2. Кинетические кривые изменений поглощения при 870 нм (а), при 940 нм (б) и при 915 нм (в) в РЦ *Rba. sphaeroides*, полученные методом интервалов при температуре 293 К. Вклад стимулированного излучения выделен на рисунке серым цветом. Сплошной линией показана аппроксимация кинетики при 915 нм одной экспонентой. Пунктиром показаны положительные изменения, связанные с вкладом выцветающей полосы поглощения первичного донора Р. На вставке представлена кинетическая кривая при 940 нм на шкале времени от -0,5 до 10 пс

Если бы стимулированное излучение при 915 и 940 нм отсутствовало, то наблюдался бы только этот положительный компонент и кинетика его (рис. 2, б и в; пунктир) совпадала бы с кинетикой, приведенной на рис. 2, а. Стимулированное излучение при 915 и 940 нм наблюдается на базе этого положительного компонента. Обращает на себя внимание, что на всех субпикосекундных задержках времени наблюдается как некогерентное стимулированное излучение возбужденного первичного донора электрона при 915 нм, так и когерентное излучение при 940 и 905 нм.

Стимулированное излучение с максимумом при 940 нм, выделенное на рис. 2, б серым цветом, осциллирует с основным периодом ~ 240 фс. На вставке к рис. 2, б (см. также рис. П4 в Приложении) видно, что стимулированное излучение при 940 нм затухает к задержке времени $\sim 1,5$ пс и не содержит 3,5-пс экспоненциального компонента, поскольку кинетическая кривая на задержках времени от 1,5 пс и до десятков пикосекунд не отличается от положительных изменений, обусловленных выцветанием полосы поглощения первичного донора электрона. Исходя из того, что в кинетике при 940 нм осцилляции смещены в отрицательную область поглощения, можно предположить наличие монотонного компонента. Поэтому мы аппроксимировали кинетическую кривую линейной комбинацией затухающих гармонических функций и экспоненциального компонента (сплошная линия на рис. П5 в Приложении) согласно уравнению:

$$f(t) = \sum_i A_i \cos(2\pi \nu_i * 0,03 + \varphi_i) e^{-\frac{t}{\tau_i}} + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}}. \quad (2)$$

Кинетика затухания стимулированного излучения при 940 нм удовлетворительно описывается частотами 136 см^{-1} и 225 см^{-1} , затухающими с константами времени 280 фс и 190 фс соответственно, и монотонного компонента, который затухает с константой времени 0,9 пс (рис. П5 в Приложении). Осциллирующие составляющие стимулированного излучения при 940 нм и наблюдаемые в противофазе к ним осцилляции при 885 нм (рис. П4, г в Приложении) относительно изобестической точки при 915 нм могут указывать на колебательную когерентность возбужденного первичного донора электрона. Следует отметить, что мода $\sim 136 \text{ см}^{-1}$, найденная в осциллирующей составляющей кинетики 940 нм, доминирует по амплитуде и имеет теоретическое обоснование в литературе, а мода $\sim 225 \text{ см}^{-1}$ не находит однозначного соответствия. Не исключается, что в осцилляциях могут присутствовать и другие моды, однако, вероятно, их амплитуды слишком малы. Функциональное значение моды 136 см^{-1} обсуждается в ряде теоретических работ

[28–31], причем величина этой моды, согласно литературным данным, меняется в диапазоне от 100 до 150 см^{-1} . В частности, методами молекулярной динамики показано, что в основном состоянии первичного донора электрона относительные энергии P_A и P_B модулируются аксиальным вращением гистидинов L168 и M202 относительно оси Mg-N с частотами $\sim 50 \text{ см}^{-1}$ и 100 см^{-1} , что приводит к температурному уширению длинноволновой полосы поглощения P [29]. При электронном возбуждении первичного донора электрона вращение гистидина M202 с характерной частотой 100 см^{-1} выборочно понижает энергию P_B , что приводит к однонаправленному смещению электронной плотности от P_A к P_B и определяет координату реакции, вдоль которой эволюционирует возбужденное состояние. За счет вращения гистидина M202 происходит смещение протона молекулы воды A в сети водородных связей с частотой $30\text{--}35 \text{ см}^{-1}$ и усиливается сопряжение между P и V_A [30]. В то же время смещение протона от 3'-ацетила P_A в сторону гистидина L168 снижает движущую силу рекомбинации зарядов. С помощью стохастической модели Ланжевена была рассчитана динамика отклика белка в ответ на образование диполя $P_A^+P_B^-$ в первичном доноре электрона [31]. В частности, показано, что мода 118 см^{-1} со временем затухания $>1,1$ пс связана с колебаниями альфа-спиралей белка при формировании диполя $P_A^+P_B^-$.

Стимулированное излучение с максимумом при 915 нм является доминирующим и, так же как излучение при 940 нм, наблюдается на фоне положительных изменений, обусловленных выцветанием полосы поглощения P_{870} . Это излучение, выделенное на рис. 2 серым цветом, монотонно затухает с константой времени $\sim 3,5$ пс (рис. 2, в; сплошная линия). Так как стимулированное излучение с максимумом 915 нм совпадает с максимумом спонтанной флуоресценции возбужденного первичного донора электрона, то это излучение, по всей видимости, происходит с нулевого колебательного подуровня нижнего экситонного уровня возбужденного состояния первичного донора электрона P^* .

Влияние процесса разделения зарядов на колебательную когерентность возбужденного первичного донора электрона. Для выяснения возможного вклада осциллирующего излучения в процесс разделения зарядов мы сопоставили кинетику стимулированного излучения при 940 нм с кинетикой полосы поглощения анион-радикала первичного акцептора электрона V_A^- при 1025 нм, построенной таким же методом, измеренной в тех же экспериментальных условиях. Из рис. 3, а видно, что при физиологической температуре (293 К) затухание осциллирующего сти-

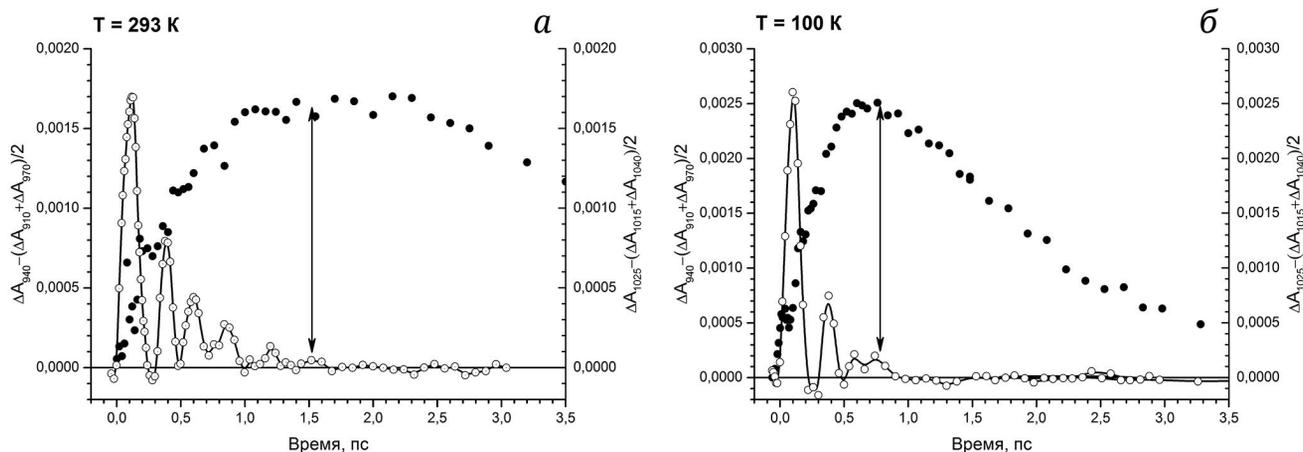


Рис. 3. Кинетика стимулированного излучения при 940 нм (открытые символы) и кинетика полосы поглощения анион-радикала V_A^- при 1025 нм (закрытые символы), измеренные при температуре 293 К (а) и при температуре 100 К (б) в РЦ *Rba. sphaeroides*. Амплитуда первого пика стимулированного излучения нормирована с максимальным нарастанием полосы поглощения при 1025 нм. Двусторонняя стрелка показывает задержку времени, на которой полное затухание излучения совпадает с полным нарастанием поглощения V_A^-

мулированного излучения при 940 нм совпадает по времени с нарастанием полосы поглощения анион-радикала V_A^- при 1025 нм (двусторонняя стрелка). Неслучайность такого совпадения подтверждается тем, что в криогенных условиях затухание излучения так же коррелирует с нарастанием полосы поглощения при 1025 нм (рис. 3, б).

Выше было показано (рис. 2, б), что кинетика затухания излучения при 940 нм аппроксимируется затухающими модами 136 см^{-1} и 225 см^{-1} и не осциллирующим компонентом. Поскольку затухание осциллирующих мод происходит гораздо быстрее, с константами времени затухания ~ 280 и ~ 190 фс, то можно предположить, что с нарастанием полосы поглощения анион-радикала V_A^- при 1025 нм коррелирует затухание монотонного компонента с константой времени $\sim 0,9$ пс в кинетике при 940 нм. Учитывая, что кинетика полосы поглощения анион-радикала V_A^- при 1025 нм инвертирована, а затухание компонента $\sim 0,9$ пс в кинетике стимулированного излучения при 940 нм совпадает со временем жизни состояния с разделенными зарядами $P^+V_A^-$, можно предположить, что затухание когерентного излучения возбужденного первичного донора электрона обусловлено обратной реакцией переноса электрона $P^* \leftarrow P^+V_A^-$.

Глобальный анализ массива данных. Поскольку, согласно представленным выше данным, стимулированное излучение при 915 нм и 940 нм затухает с разными константами времени, мы аппроксимировали экспериментальный массив данных методом глобального анализа с кинетическими компонентами ~ 1 пс и $3,5$ пс (< 1 пс и $1,2$ пс при криогенной температуре) и незатухающим компонентом на шкале времени эксперимента (200 пс). В спектре DADS, связанном с незатухаю-

щим компонентом (рис. 4, кривая 3), наблюдаются отрицательная полоса при 870 нм, слабая положительная полоса, принадлежащая поглощению анион-радикала вторичного электронного акцептора – молекулы H_A^- – при 960 нм на фоне положительного бесструктурного поглощения P^* , которые отражают состояние с разделенными зарядами $P^+H_A^-$. В спектре DADS с константой времени 3,5 пс (рис. 4; кривая 2) затухание стимулированного излучения при 915 нм (отрицательная полоса при 915 нм) происходит с той же константой времени, что и нарастание полосы поглощения анион-радикала V_A^- (положительная полоса при 1025 нм). Спектр DADS, связанный с константой затухания 0,8 пс (рис. 4; кривая 1), подтверждает обнаруженную выше корреляцию. Действительно, затухание положительных изменений при 890 нм и отрицательных изменений при 940 нм, отражающих сателлиты стимулированного излучения, происходят с той же константой времени, что и затухание полосы поглощения анион-радикала V_A^- (отрицательная полоса при 1025 нм). Представленные на рис. 3 и 4 данные находятся в согласии с общепринятыми представлениями о механизме двухшагового переноса электрона на H_A через молекулу V_A [3, 5, 6]. Затухание осциллирующего стимулированного излучения возбужденного первичного донора электрона коррелирует со временем жизни состояния $P^+V_A^-$, что является свидетельством обратимости переноса электрона на молекулу V_A и образования состояния с разделенными зарядами $P^+V_A^-$, время жизни которого составляет 0,8 пс (0,4 пс при 100 К).

Исследование поглощения возбужденного первичного донора электрона при переходе $P^* \rightarrow P^{}$ в РЦ *Rba. sphaeroides*.** Возбужденный первичный донор электрона характеризуется

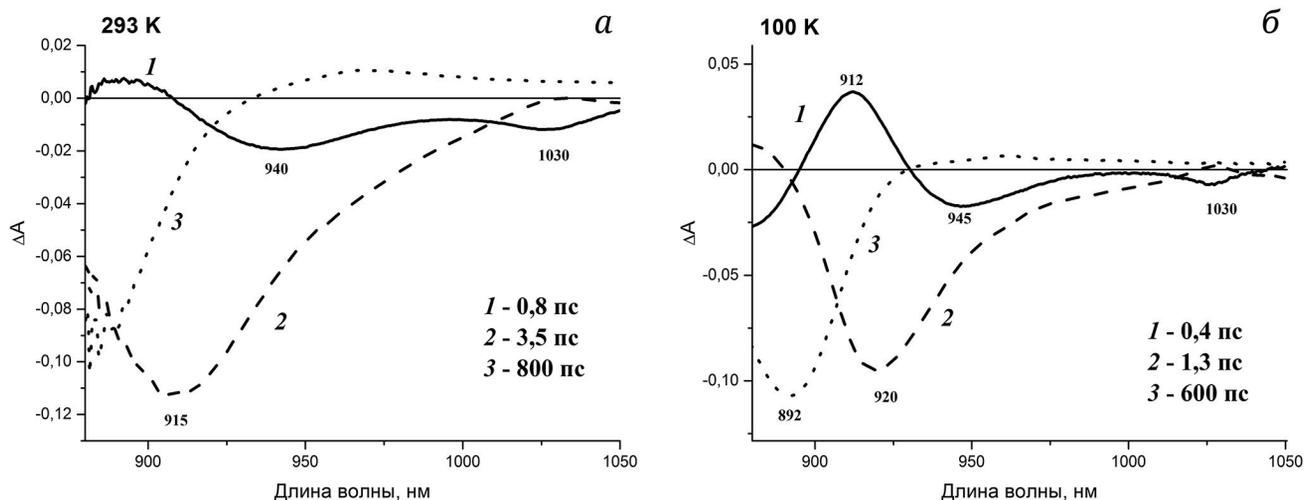


Рис. 4. Дифференциальные спектры поглощения РЦ *Rba. sphaeroides*, связанные с экспоненциальным затуханием (decay-associated difference spectra, DADS), измеренные при физиологической температуре (а) и при температуре 100 К (б)

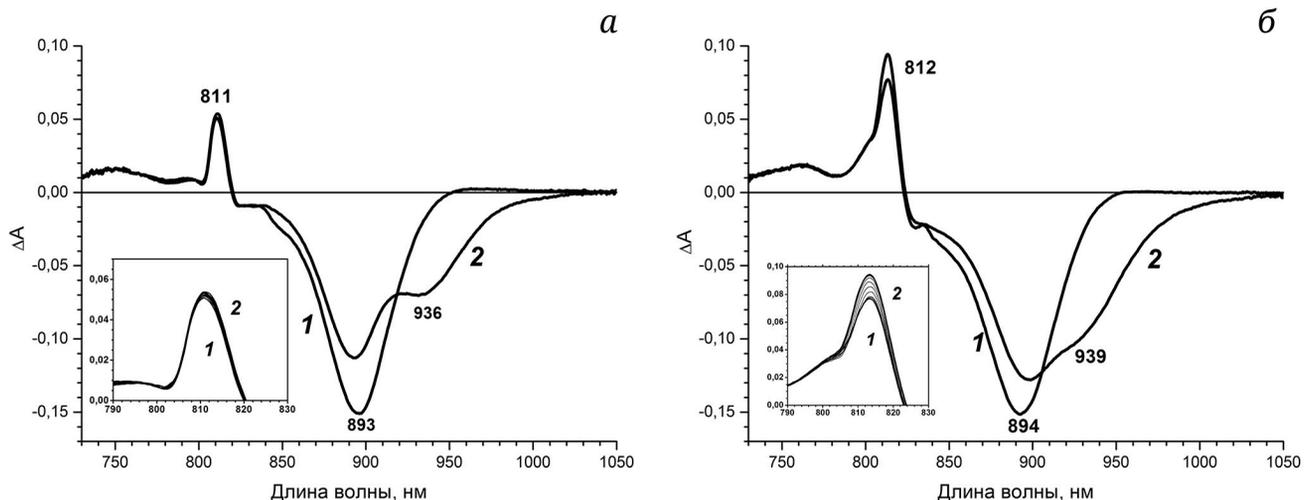


Рис. 5. Дифференциальные спектры поглощения РЦ *Rba. sphaeroides* дикого типа на задержке времени 60 фс (кривая 1) и 170 фс (кривая 2) (а) и РЦ тройного мутанта на задержке времени 80 фс (кривая 1) и 380 фс (кривая 2) (б), измеренные при температуре 100 К. На вставках (панели а и б) показана область полосы поглощения Р* при 810 нм. Величина положительной дисперсии зондирующего импульса в диапазоне длин волн 810–940 нм составляет ~100 фс

не только стимулированным излучением, но и поглощением из возбужденного состояния при переходе $P^* \rightarrow P^{**}$. Мы исследовали поглощение возбужденного донора при 810 нм в реакционных центрах *Rba. sphaeroides* дикого типа (с открытым переносом электрона) и мутанта M160LN + L131LN + M197FN (с заблокированным переносом электрона при криогенных температурах).

На рис. 5 представлены дифференциальные спектры поглощения реакционных центров с открытым и с заблокированным переносом электрона на молекулу B_A , измеренные в ближней инфракрасной области при возбуждении первичного донора электрона импульсами света дли-

тельностью 25 фс на длине волны 890 нм. И в том и в другом случае дифференциальные спектры поглощения отражают эволюцию возбужденного первичного донора электрона. Они характеризуются выцветанием полосы поглощения первичного донора из основного состояния при 890 нм и стимулированным излучением из возбужденного состояния на длинноволновом склоне выцветающей полосы Р, а также узкой положительной полосой поглощения возбужденного первичного донора, имеющей максимум ~810 нм, которую приписывают переходу первичного донора с нижнего экситонного уровня Р* на более высокий возбужденный уровень Р** [26, 27]. На задержках

времени от 60 до 170 фс, когда в реакционных центрах с открытым переносом электрона амплитуда полосы поглощения возбужденного первичного донора электрона при 810 нм достигает своего максимального значения, максимум стимулированного излучения из возбужденного состояния первичного донора электрона смещается от 890 до 940 нм (рис. 5, а). В реакционных центрах мутанта с повышенным потенциалом происходит подобное длинноволновое смещение стимулированного излучения из возбужденного состояния примерно на тех же временах (рис. 5, б). Обращает на себя внимание, что в РЦ с заблокированным переносом электрона на задержках времени от 80 до 380 фс наблюдается увеличение амплитуды полосы поглощения возбужденного первичного донора при 810 нм (рис. 5, б; вставка), в то время как в РЦ с открытым переносом электрона полоса поглощения P^* при 810 нм не увеличивается (рис. 5, а; вставка). Прирост амплитуды полосы поглощения при 810 нм на таких задержках времени нельзя объяснить действием возбуждающего импульса, но этот прирост отражает увеличение концентрации возбужденного первичного донора электрона.

Для выявления спектральных изменений в РЦ с заблокированным переносом электрона, связанных с ростом амплитуды полосы поглощения при 810 нм, мы построили дважды дифференциальные спектры, вычитая дифференциальный спектр, измеренный на задержке времени 220 фс из дифференциальных спектров, измеренных на задержках времени 260, 300 и 340 фс (рис. 6).

Представленные на рис. 6 дважды дифференциальные спектры поглощения реакционных центров мутанта M160LN + L131LN + M197FN *Rba. sphaeroides* показывают, что на задержках времени более 200 фс действительно происходит увеличение амплитуды узкой спектральной полосы с максимумом при 810 нм. Поскольку положительная полоса при 810 нм принадлежит поглощению первичного донора электрона при переходе $P^* \rightarrow P^{**}$, то прирост полосы поглощения при 810 нм, по-видимому, обусловлен увеличением концентрации возбужденного первичного донора электрона P^* . Однако в области полосы поглощения P при 890 нм, выцветание которой обусловлено переходом первичного донора электрона из основного в возбужденное состояние, изменений поглощения не происходит (показано стрелкой) и, следовательно, количество возбужденного первичного донора электрона остается неизменным. Можно заметить, что прирост амплитуды полосы поглощения при 810 нм сопровождается увеличением стимулированного излучения с нижнего экситонного уровня при 920 нм и уменьше-

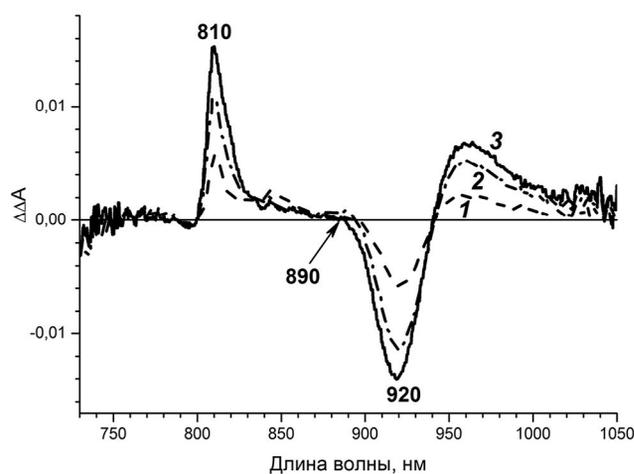


Рис. 6. Дважды дифференциальные спектры поглощения РЦ мутанта M160LN + L131LN + M197FN *Rba. sphaeroides*, полученные вычитанием дифференциального спектра, измеренного на задержке времени 220 фс из дифференциальных спектров, измеренных на задержках времени 260 фс (кривая 1), 300 фс (кривая 2) и 340 фс (кривая 3) при температуре 100 К. Стрелкой показана длина волны максимума полосы поглощения P

нием стимулированного излучения при 940 нм (рис. 6). Это позволяет предположить, что при блокировании переноса электрона на молекулу V_A на задержках времени от 220 до 340 фс в возбужденном первичном доноре электрона происходит электронный переход на нижний экситонный уровень P^* с уровня энергии, расположенного на шкале энергии выше. Представляется маловероятным, что это электронный переход с верхнего экситонного уровня. Процесс внутренней конверсии электронного возбуждения между верхним P^* и нижним P^* экситонными уровнями происходит гораздо быстрее (25–100 фс) [36, 37, 47].

На рис. 7 представлена кинетика полосы поглощения при 810 нм в реакционных центрах с открытым (кривая 1) и с заблокированным переносом электрона (кривая 2), построенная в интервале длин волн от 805 до 815 нм. Из рисунка видно, что нарастание полосы поглощения при 810 нм, обусловленное поглощением света, в открытых и закрытых реакционных центрах завершается к задержке времени ~60 фс. В открытых реакционных центрах на более поздних задержках времени амплитуда полосы поглощения при 810 нм не изменяется, а затем экспоненциально спадает с константой времени ~1,2 пс вследствие переноса электрона от возбужденного первичного донора в активную цепь кофакторов. В закрытых реакционных центрах, начиная с задержки времени 200 фс, происходит прирост полосы поглощения при 810 нм примерно на 24%, по сравнению с РЦ с открытым переносом электрона, с константой

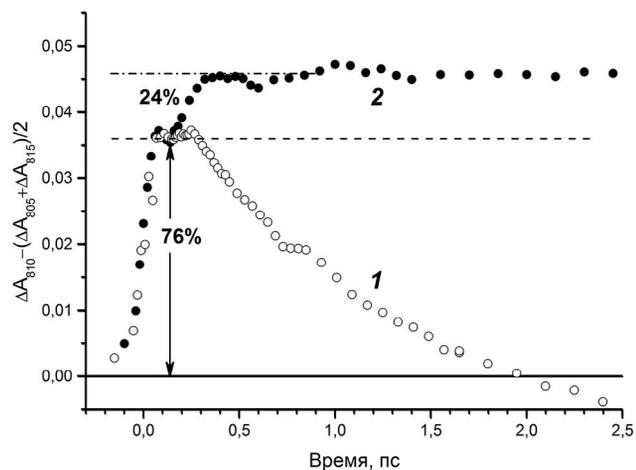


Рис. 7. Кинетические кривые полосы поглощения при 810 нм в РЦ *Rba. sphaeroides* дикого типа (кривая 1) и мутанта M160LN + L131LN + M197FN (кривая 2) при температуре 100 К. Пунктирная линия показывает амплитуду полосы поглощения при взаимодействии возбуждающего и зондирующего импульсов, а штрихпунктирная линия – прирост полосы поглощения в РЦ мутанта на задержках времени больше длительности аппаратной функции (двухсторонняя стрелка)

времени порядка 100 фс, характерной для переходов между электронными уровнями. Это позволяет заключить, что наблюдаемый прирост полосы поглощения при 810 нм отражает увеличение концентрации первичного донора электрона на нижнем экситонном уровне P^* первого синглетного возбужденного состояния.

Поскольку в открытых РЦ *Rba. sphaeroides* такого процесса не происходит, то можно предположить, что на задержках времени порядка 200 фс возбужденный первичный донор электрона продолжает оставаться в суперпозиции двух состояний, имеющих разные электронные уровни энергии. Одно из них – нижнее экситонное состояние P^* заселяется с вероятностью 76%, имеет максимум поглощения при 810 нм и стимулированное излучение при 915 нм. Второе состояние заселяется с вероятностью 24%, расположено на шкале энергии выше состояния P^* и не имеет поглощения при 810 нм. Проведенные ранее теоретические расчеты показали, что к первичному донору электрона в основном состоянии примешивается состояние с переносом заряда. Это состояние характеризуется тем, что: (1) оно примешивается на 25%; (2) уровень энергии состояния с переносом заряда расположен выше уровня энергии нейтрального первичного донора электрона; (3) состояние с переносом заряда не имеет собственного поглощения [11, 32, 48]. Все эти признаки применимы к верхнему электронному состоянию и позволяют идентифицировать его как $P_A^+P_B^-$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в работе данные показывают, что в РЦ *Rba. sphaeroides* при селективном возбуждении первичного донора электрона импульсами света длительностью ~ 30 фс наблюдается спектральная и кинетическая неоднородность P . Смещение стимулированного излучения возбужденного первичного донора P^* в длинноволновую область спектра с константой времени ~ 60 фс, по-видимому, обусловлено сдвигом Стокса [12, 21, 47] либо образованием состояния с переносом заряда [47]. Как видно из дважды дифференциальных спектров поглощения (рис. 1, б; кривые 3 и 4) на задержках времени более ~ 120 фс когерентная динамика возбужденного первичного донора характеризуется стимулированным излучением при 915 нм с сателлитами при 940 нм и 905 нм. Стимулированное излучение с максимумом при 915 нм монотонно затухает с константой времени $\sim 3,5$ пс (рис. 2, в; сплошная линия), а кинетика осциллирующих сателлитов при 890 нм и в области 940 нм (вставка на рис. 2, б; рис. П4, г в Приложении) коррелирует со временем жизни состояния с разделенными зарядами $P^+V_A^-$. Спектральная локализация стимулированного излучения в разные моменты времени и кинетическая гетерогенность излучения могут свидетельствовать о том, что возбужденный первичный донор электрона находится в суперпозиции двух состояний. Результаты глобального анализа исходных данных (рис. 4; кривая 1) позволяют предположить, что затухание стимулированного излучения при 940 нм происходит с той же константой времени, что и затухание состояния с разделенными зарядами $P^+V_A^-$. В этом случае полученные данные находятся в согласии с тем, что существует обратная реакция переноса электрона от молекулы V_A^- на P^* . Исследование возбужденного донора электрона в тройном мутанте показало, что блокирование переноса электрона на молекулу V_A выявляет признаки двух электронных состояний. Эти результаты согласуются с теоретическими и экспериментальными данными, согласно которым к возбужденному первичному донору электрона примешивается комплекс с переносом заряда $P_A^+P_B^-$, включенный в процесс обратимого переноса электрона от возбужденного первичного донора электрона P^* на ближайший акцептор электрона.

Вклад авторов. Р.А. Хатыпов – концепция и руководство работой; Т.Ю. Фуфина, А.М. Христин – проведение экспериментов; А.М. Христин, Т.Ю. Фуфина, Р.А. Хатыпов – обсуждение результатов исследования; А.М. Христин, Р.А. Хатыпов – написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания № 122041100204-3.

Благодарности. Работа была выполнена на оборудовании ЦКП ПНЦБИ РАН (№ 672398, <http://www.ckr-rf.ru/ckp/672398/>; <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/670266/>). Авторы выражают признательность академику Шувалову В.А. (1943–2022 гг.) за всестороннюю поддержку проводимых исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kennis, J. T., Shkuropatov, A. Y., van Stokkum, I. H. M., Gast, P., Hoff, A. J., Shuvalov, V. A., and Aartsma, T. J. (1997) Formation of a long-lived P⁺B_A⁻ state in plant pheophytin-exchanged reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* R26 at Low temperature, *Biochemistry*, **36**, 16231-16238, <https://doi.org/10.1021/bi9712605>.
2. Yakovlev, A. G., Shkuropatov, A. Y., and Shuvalov, V. A. (2000) Nuclear wavepacket motion producing a reversible charge separation in bacterial reaction centers, *FEBS Lett.*, **466**, 209-212, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01081-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01081-4).
3. Dominguez, P., Himmelstoss, M., Michelmann, J., Lehner, F., Gardiner, A. T, Cogdell, R. J., and Zinth, W. (2014) Primary reactions in photosynthetic reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* – time constants of the initial electron transfer, *Chem. Phys. Lett.*, **601**, 103-109, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.03.085>.
4. Yakovlev, A. G., Shkuropatov, A. Y., and Shuvalov, V. A. (2002) Nuclear wavepacket motion between P^{*} and P⁺B_A⁻ potential surfaces with subsequent electron transfer to H_A in bacterial reaction centers. 1. Room temperature, *Biochemistry*, **41**, 2667-2674, <https://doi.org/10.1021/bi0101244>.
5. Arlt, T., Schmidt, S., Kaiser, W., Lauterwasser, C., Meyer, M., Scheer, H., and Zinth, W. (1993) The accessory bacteriochlorophyll: a real electron carrier in primary photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11757-11761, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11757>.
6. Holzappel, W., Finkele, U., Kaiser, W., Oesterheld, D., Scheer, H., Stolz, H. U., and Zinth, W. (1989) Observation of a bacteriochlorophyll anion radical during the primary charge separation in a reaction center, *Chem. Phys. Lett.*, **160**, 1-7, [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(89\)87543-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(89)87543-8).
7. Weaver, J. B., Lin, C.-Y., Faries, K. M., Mathews, I. I., Russi, S., Holten, D., Kirmaier, C., and Boxer, S. G. (2021) Photosynthetic reaction center variants made via genetic code expansion show Tyr at M210 tunes the initial electron transfer mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2116439118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2116439118>.
8. Hamm, P., and Zinth, W. (1995) Ultrafast initial reaction in bacterial photosynthesis revealed by femtosecond infrared spectroscopy, *J. Phys. Chem.*, **99**, 13537-13544, <https://doi.org/10.1021/j100036a034>.
9. Khatypov, R. A., Khmel'nitskiy, A. Y., Khristin, A. M., Fufina, T. Y., Vasilieva, L. G., and Shuvalov, V. A. (2012) Primary charge separation within P870* in wild type and heterodimer mutants in femtosecond time domain, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1392-1398, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.12.007>.
10. Ivashin, N. V., and Shchupak, E. E. (2016) The nature of the lower excited state of the special pair of bacterial photosynthetic reaction center of *Rhodobacter sphaeroides* and the dynamics of primary charge separation, *Optics Spectrosc.*, **121**, 181-189, <https://doi.org/10.1134/S0030400X16080087>.
11. Parson, W. W. (2020) Dynamics of the excited state in photosynthetic bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **124**, 1733-1739, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c00497>.
12. Yakovlev, A. G., and Shuvalov, V. A. (2020) Coherent intradimer dynamics in reaction centers of photosynthetic green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, *Sci. Rep.*, **10**, 228, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57115-1>.
13. Ma, F., Romero, E., Jones, M. R., Novoderezhkin, V. I., and van Grondelle, R. (2018) Vibronic coherence in the charge separation process of the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center, *J. Phys. Chem. Lett.*, **9**, 1827-1832, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.8b00108>.
14. Ma, F., Romero, E., Jones, M. R., Novoderezhkin, V. I., and van Grondelle, R. (2019) Both electronic and vibrational coherences are involved in primary electron transfer in bacterial reaction center, *Nat. Commun.*, **10**, 933, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08751-8>.
15. Ma, F., Romero, E., Jones, M. R., Novoderezhkin, V. I., Yu, L.-J., and van Grondelle, R. (2021) Dynamic Stark effect in two-dimensional spectroscopy revealing modulation of ultrafast charge separation in bacterial reaction centers by an inherent electric field, *J. Phys. Chem. Lett.*, **12**, 5526-5533, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.1c01059>.

16. Ma, F., Romero, E., Jones M. R., Novoderezhkin, V. I., Yu, L.-J., and van Grondelle, R. (2022) Dynamics of diverse coherences in primary charge separation of bacterial reaction center at 77 K revealed by wavelet analysis, *Photosynth. Res.*, **151**, 225-234, <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00881-9>.
17. Lockhart, D. J., and Boxer, S. G. (1988) Stark effect spectroscopy of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospseudomonas viridis* reaction centers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 107-111, <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.107>.
18. Moore, L. J., Zhou, H., and Boxer, S. G. (1999) Excited-state electronic asymmetry of the special pair in photosynthetic reaction center mutants: absorption and Stark spectroscopy, *Biochemistry*, **38**, 11949-11960, <https://doi.org/10.1021/bi990892j>.
19. Yakovlev, A. G., and Shuvalov, V. A. (2014) Spectral exhibition of electron-vibrational relaxation in P* state of *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers, *Photosynth. Res.*, **125**, 9-22, <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0041-5>.
20. Yakovlev, A. G., and Shuvalov, V. A. (2015) Electronic relaxation in P* state of *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **461**, 72-75, <https://doi.org/10.1134/S1607672915020039>.
21. Яковлев А. Г., Шувалов В. А. (2017) Фемтосекундные релаксационные процессы в реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **82**, 906-915, <https://doi.org/10.1134/S0006297917080053>.
22. Parson, W. W., and Warshel, A. (1987) Spectroscopic properties of photosynthetic reaction centers. 2. Application of the theory to *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6152-6163, <https://doi.org/10.1021/ja00254a040>.
23. Lathrop, E. J. P., and Friesner, R. A. (1994) Simulation of optical spectra from the reaction center of *Rhodobacter Sphaeroides*. Effects of an internal charge-separated state of the special pair, *J. Phys. Chem.*, **98**, 3056-3066, <https://doi.org/10.1021/j100062a051>.
24. Scherer, P. O. J., and Fischer, S. F. (1989) Quantum treatment of the optical spectra and the initial electron transfer process within the reaction center of *Rhodospseudomonas viridis*, *Chem. Phys.*, **131**, 115-127, [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(89\)87084-3](https://doi.org/10.1016/0301-0104(89)87084-3).
25. Vos, M. H., Jones, M. R., Hunter, C. N., Breton, J., and Martin, J.-L. (1994) Coherent nuclear dynamics at room temperature in bacterial reaction centers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12701-12705, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12701>.
26. Vos, M. H., Lambry, J.-C., Robles, S. J., Youvan, D. C., Breton, J., and Martin, J.-L. (1992) Femtosecond spectral evolution of the excited state of bacterial reaction centers at 10 K, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 613-617, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.2.613>.
27. Vos, M. H., Jones, M. R., and Martin, J.-L. (1998) Vibrational coherence in bacterial reaction centers: spectroscopic characterization of motions active during primary electron transfer, *Chem. Phys.*, **233**, 179-190, [https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(97\)00355-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(97)00355-8).
28. Novoderezhkin, V. I., Yakovlev, A. G., van Grondelle, R., and Shuvalov, V. A. (2004) Coherent nuclear and electronic dynamics in primary charge separation in photosynthetic reaction centers: a Redfield theory approach, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 7445-7457, <https://doi.org/10.1021/jp0373346>.
29. Eisenmayer, T. J., de Groot, H. J. M., van de Wetering, E., Neugebauer, J., and Buda, F. (2012) Mechanism and reaction coordinate of directional charge separation in bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem. Lett.*, **3**, 694-697, <https://doi.org/10.1021/jz201695p>.
30. Eisenmayer, T. J., Lasave, J. A., Monti, A., de Groot, H. J. M., Buda, F. (2012) Proton displacements coupled to primary electron transfer in the *Rhodobacter sphaeroides* reaction center, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 38, 11162-11168, <https://doi.org/10.1021/jp401195t>.
31. Milanovsky, G. E., Shuvalov, V. A., Semenov, A. Y., and Cherepanov, D. A. (2015) Elastic vibrations in the photosynthetic bacterial reaction center coupled to the primary charge separation: implications from molecular dynamics simulations and stochastic Langevin approach, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 13656-13667, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03036>.
32. Renger, T. (2004) Theory of optical spectra involving charge transfer states: dynamic localization predicts a temperature dependent optical band shift, *Phys. Rev. Lett.*, **93**, 188101, <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.93.188101>.
33. Khmel'nitskiy, A., Reinot, T., and Jankowiak, R. (2019) Mixed upper exciton state of the special pair in bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 852-859, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b12542>.
34. Breton, J. (1985) Orientation of the chromophores in the reaction center of *Rhodospseudomonas viridis*. Comparison of low-temperature linear dichroism spectra with a model derived from X-ray crystallography, *Biochim. Biophys. Acta*, **810**, 235-245, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(85\)90138-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(85)90138-0).
35. Reddy, J. R. S., Kolaczowski, S. V., and Small, G. J. (1993) Nonphotochemical hole burning of the reaction center of *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Phys. Chem.*, **97**, 6934-6940, <https://doi.org/10.1021/j100128a031>.
36. Vos, M. H., Breton, J., and Martin, J.-L. (1997) Electronic energy transfer within the hexamer cofactor system of bacterial reaction centers, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 9820-9832, <https://doi.org/10.1021/jp971486h>.
37. Niedringhaus, A., Policht, V. R., Sechrist, R., Konar, A., Laible, P. D., Bocian, D. F., Holten, D., Kirmaier, C., and Ogilvie, J. P. (2018) Primary processes in the bacterial reaction center probed by two-dimensional electronic spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 3563-3568, <https://doi.org/10.1073/pnas.1721927115>.

38. Woodbury, N. W., Lin, S., Lin, X., Peloquin, J. M., Taguchi, A. K. W., Williams, J. C., and Allen, J. P. (1995) The role of reaction center excited state evolution during charge separation in a *Rb. sphaeroides* mutant with an initial electron donor midpoint potential 260 mV above wild type, *Chem. Phys.*, **197**, 405-421, [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(95\)00170-S](https://doi.org/10.1016/0301-0104(95)00170-S).
39. Яковлев А. Г., Васильева Л. Г., Шкуропатов А. Я., Шувалов В. А. (2011) Когерентные эффекты при разделении зарядов в реакционных центрах мутантов LL131H и LL131H/LM160H/FM197H, *Биохимия*, **76**, 1359-1373.
40. Хмельницкий А. Ю., Хатыпов Р. А., Христин А. М., Леонова М. М., Васильева Л. Г., Шувалов В. А. (2013) Разделение зарядов в реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides* с повышенным потенциалом первичного донора электрона, *Биохимия*, **78**, 82-91.
41. Shuvalov, V. A., Shkuropatov, A. Ya., Kulakova, S. M., Ismailov, M. A., and Shkuropatova, V. A. (1986) Photoreactions of bacteriopheophytins and bacteriochlorophylls in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides* and *Chloroflexus aurantiacus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **849**, 337-346, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90145-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90145-3).
42. Polli, D., Brida, D., Mukamel, S., Lanzani, G., and Cerullo G. (2010) Effective temporal resolution in pump-probe spectroscopy with strongly chirped pulses, *Phys. Rev. A*, **82**, 053809, <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.82.053809>.
43. Van Stokkum, I. H. M., Larsen, D. S., and van Grondelle, R. (2004) Global and target analysis of time-resolved spectra, *Biochim. Biophys. Acta*, **1657**, 82-104, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.04.011>.
44. Snellenburg, J. J., Laptinok, S. P., Seger, R., Mullen, K. M., and van Stokkum, I. H. M. (2012) Glotaran: a Java-based graphical user interface for the R package TIMP, *J. Stat. Soft.*, **49**, 1-22, <https://doi.org/10.18637/jss.v049.i03>.
45. Хатыпов Р. А., Христин А. М., Васильева Л. Г., Шувалов В. А. (2019) Алгоритм извлечения кинетики слабых полос в дифференциальных спектрах поглощения реакционных центров *Rhodobacter sphaeroides*, *Биохимия*, **84**, 827-835, <https://doi.org/10.1134/S0320972519060083>.
46. Woodbury, N. W. T., and Parson, W. W. (1984) Nanosecond fluorescence from isolated photosynthetic reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 345-361, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(84\)90205-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90205-6).
47. Arnett, D. C., Moser, C. C., Dutton, P. L., and Scherer, N. F. (1999) The first events in photosynthesis: electronic coupling and energy transfer dynamics in the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2014-2032, <https://doi.org/10.1021/jp984464j>.
48. Scherer, P. O. J., Scharnagl, C., and Sighart F. (1995) Symmetry breakage in the electronic structure of bacterial reaction centers, *Chem. Phys.*, **197**, 333-341, [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(95\)00149-I](https://doi.org/10.1016/0301-0104(95)00149-I).

FEMTOSECOND DYNAMICS OF AN EXCITED PRIMARY ELECTRON DONOR IN REACTION CENTERS OF THE PURPLE BACTERIUM *Rhodobacter sphaeroides*

A. M. Khristin, T. Yu. Fufina, and R. A. Khatypov*

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
Federal Research Center Pushchino Scientific Center for Biological Research PSCBR,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: rgreen1@rambler.ru*

Femtosecond transient absorption spectroscopy was used to study the dynamics of the excited primary electron donor in the reaction centers of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. Using global analysis and the interval method, a correlation was found between the vibrational coherence damping of the excited primary electron donor and the lifetime of the charge-separated state $P^*B_A^-$, indicating the reversibility of electron transfer to the primary electron acceptor, the B_A molecule. In the reaction centers, signs of superposition of two electronic states of P were found for a delay time of less than 200 fs. It is suggested that the admixture value of charge transfer state $P_A^*P_B^-$ with the excited primary electron donor P^* is about 24%. The results obtained are discussed in terms of the two-step electron transfer mechanism.

Keywords: femtosecond spectroscopy; bacterial reaction centers; charge transfer state; photochemical charge separation

МЕХАНИЗМ СТИМУЛЯЦИИ МИОГЕНЕЗА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ЧЕРЕЗ СУКЦИНАТНЫЙ РЕЦЕПТОР SUCNR1

© 2024 Ю.В. Абаленихина*, М.О. Исаева, П.Ю. Мыльников,
А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
390026 Рязань, Россия; электронная почта: abalenihiina88@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2024

После доработки 03.06.2024

Принята к публикации 11.06.2024

В исследовании на клетках линии C2C12 изучено влияние янтарной кислоты на процессы миогенеза. В диапазоне концентраций 10–1000 мкМ янтарная кислота стимулировала процесс миогенной дифференцировки, увеличивая количество факторов миогенеза MyoD (на всех этапах миогенеза) и миогенина (на этапе терминальной дифференцировки). Методом Вестерн-блот в клетках C2C12 выявлены специфические сукцинатные рецепторы SUCNR1, уровень которых снижался в процессе миогенеза. При добавлении янтарной кислоты к клеткам содержание внутриклеточного сукцината существенно не изменялось и уменьшалось в процессе миогенной дифференцировки. С применением специфического ингибитора белка Gai – коклюшного токсина – установлено, что стимуляция миогенеза C2C12 под действием янтарной кислоты реализуется через SUCNR1–Gai.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: миогенез, янтарная кислота, SUCNR1, инозитолмонофосфат, коклюшный токсин.

DOI: 10.31857/S0320972524070102 EDN: WMLQXO

ВВЕДЕНИЕ

Развитие скелетных мышц – это высокоорганизованный процесс, контролируемый эволюционно консервативными сетями транскрипционных факторов, сигнальными молекулами и некодирующими РНК, которые координируют экспрессию большого количества генов [1].

Семейство миогенных регуляторных транскрипционных факторов (Myf5, MyoD, Mrf4 и MyoG) является основным регулятором миогенеза. Myf5 и MyoD регулируют пролиферацию миобластов и переход на процесс миогенной дифференцировки клеток, а MRF4 и MyoG контролируют этап терминальной дифференцировки. Исследования с использованием нокаутных мышей показали, что

MyoD, Mrf4 и Myf5 регулируют миогенную детерминацию, в то же время MyoG, MyoD и Mrf4 контролируют терминальную дифференцировку миобластов [2, 3].

В настоящее время ведется активный поиск других факторов и сигнальных путей, участвующих в этом процессе [4, 5].

В некоторых исследованиях было показано, что янтарная кислота может стимулировать миогенез [6]. Однако механизм данного влияния не установлен. Можно предположить, что это действие реализуется через специфический сукцинатный рецептор (SUCNR1/GPR91).

SUCNR1 принадлежит к большому семейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), которое делится на разные группы на основании сходства аминокислотной последовательности или типа лиганда. SUCNR1 относят к родопсин-подобному типу δ GPCR [7].

SUCNR1 обнаружен во многих тканях и органах, например, в почках, сердце, печени, мозге, сетчатке и др. При анализе экспрессии в мышцах были получены противоречивые результаты.

Принятые сокращения: МУН – тяжелые цепи миозина (myosin heavy chain); MyoD – фактор миогенной детерминации (myogenic determination factor 1); MyoG – миогенин (myogenic factor); SUCNR1 – сукцинатный рецептор (succinate receptor 1).

* Адресат для корреспонденции.

Данный рецептор был обнаружен у мышей [8], но не был выявлен у людей [9]. Экспрессия SUCNR1 во время миогенеза не изучалась.

SUCNR1 высокоспецифичен к сукцинату, структурно родственные аналоги и метаболиты цикла Кребса не могут его активировать, только малеат и метилмалонат вызывают слабый ответ [10].

Было показано, что SUCNR1 связывается как с белком Gai, так и с Gaq. Активация Gai приводит к снижению уровня cAMP, а Gaq запускает сигнальный каскад фосфолипазы C-β (PLC-β) [11]. Также было высказано предположение, что наблюдаемая мобилизация [Ca²⁺]_i при стимуляции SUCNR1 может быть связана с активацией PLC-β димером βγ [12].

Учитывая все вышеизложенное, в настоящем исследовании мы стремились изучить механизм влияния янтарной кислоты на миогенез и оценить роль SUCNR1–Gai и SUCNR1–Gaq в данном процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследование выполнено *in vitro* на клеточной линии мышечных миобластов C2C12, предоставленной Институтом биологии гена РАН (Москва). Данная клеточная линия является классической моделью для изучения миогенной дифференцировки [13].

Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе WS-189C («World Science», Корея) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/литр), с добавлением L-глутамина (4 мМ), 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Biosera», Франция), 100 ед./мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия) соответственно. После достижения 70–90% конfluence клеток снимали с флакона добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА; «Sigma-Aldrich», Германия) и высевали в 6-луночные планшеты («Corning», США).

В ходе работы были сформированы следующие экспериментальные группы:

- *клетки до дифференцировки (0 день дифференцировки, контроль)* – инкубация клеток с питательной средой, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки до конfluence 50–60% (состояние, при котором очень немногие из клеток физически соприкасаются друг с другом);

- *инициация дифференцировки миобластов* – после достижения клетками конfluence 50–60% инициировали миогенную дифференцировку путем замены эмбриональной бычьей сыворотки в составе питательной среды DMEM

на 2%-ную лошадиную сыворотку («Sigma-Aldrich», Германия) – дифференцировочную среду [14, 15, 16]. На 1-, 4- и 7-й день дифференцировки анализировали выраженность морфологических и биохимических изменений;

- *влияние янтарной кислоты на миогенную дифференцировку миобластов* – вместе с дифференцировочной питательной средой к клеткам добавляли янтарную кислоту («Acros Organics», Бельгия) в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ. На 1-, 4- и 7-й день анализировали выраженность изменений в клетках;

- *оценка роли сукцинатных рецепторов во влиянии янтарной кислоты на миогенную дифференцировку миобластов* – вместе с дифференцировочной питательной средой к клеткам добавляли янтарную кислоту в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ и коклюшный токсин (ингибитор сигнального пути SUCNR1–Gai, 516560, «Sigma-Aldrich») в концентрации 100 нг/мл [17]. На 1-, 4- и 7-й день анализировали выраженность изменений в клетках;

- *влияние янтарной кислоты на индекс миогенеза* – янтарную кислоту в концентрации 100 мкМ вносили в питательную среду DMEM с 10%-ной эмбриональной бычьей сывороткой без замены на 2%-ную лошадиную сыворотку; срок инкубации – 7 дней.

Каждый эксперимент, каждый анализ в каждой концентрации выполняли в трех независимых повторах.

Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 («Olympus», Япония) с цифровой цветной камерой CCD 5 МПикс («DeltaPix», Дания), анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения DeltaPix InSight.

После окончания экспериментальных воздействий клетки фиксировали 95%-ным этанолом (5 мин) и прокрашивали ядра миобластов раствором Романовского–Гимзе при комнатной температуре в течение 20–25 мин. Затем удаляли краситель, промывали клетки фосфатным буфером («ПанЭко») и микроскопировали.

Для количественной оценки процесса миогенной дифференцировки рассчитывали индекс миогенеза (IM) – долю ядер, находящихся в митотических фазах, содержащих два или более ядер по отношению к общему количеству ядер. Для анализа выбирали пять полей зрения в лунке 6-луночного планшета, площадь одной лунки планшета составляла 9,6 см² (n = 3) при увеличении 200×. Общее количество проанализированных ядер составляло 90–120 на поле зрения. Расчеты проводили по формуле (1):

$$IM = \frac{A - B}{C - 1} \times 100, \quad (1)$$

где IM – индекс миогенеза, A – количество ядер в многоядерных клеточных структурах, B – количество многоядерных клеточных структур, C – количество ядер в поле зрения [18, 19].

Вестерн-блот. После окончания экспериментов клетки лизировали NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с ингибиторами протеаз («Sigma-Aldrich») в течение 30 мин при 4 °C и постоянном перемешивании из расчета 10^7 клеток на 100 мкл буфера.

Концентрации белка в пробах анализировали методом Бредфорда, используя Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit («Thermo Fisher») [20].

Белки (20 мкг/образец) разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, приготовленном с использованием 10% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США), и переносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью системы полусухого переноса (Transblot; «Bio-Rad»). Затем мембраны блокировали в течение 1 ч с помощью TBS 1% Casein Blocker («Bio-Rad») с добавлением 0,1% Tween 20 («Sigma-Aldrich»). Далее, инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами в разведении 1 : 200: sc-53092, MYH1/2/3 (N3.36), мышечное моноклональное антитело («Santa Cruz Biotechnology, Inc», США); sc-53142, MyoD (G-1), мышечное моноклональное антитело («Santa Cruz Biotechnology, Inc»); sc-12732, миогенин (F5D), мышечное моноклональное антитело («Santa Cruz Biotechnology, Inc»); A08485, SUCNR1, кроличье поликлональное антитело («Boster Bio», Китай). Мембраны промывали TBST и затем инкубировали со вторичными антителами в разведении 1 : 4000 в течение 1 ч при комнатной температуре: кроличьи анти-мышечные IgG (H + L), HRP («Invitrogen», США); козы анти-кроличьи IgG (H + L), HRP («Invitrogen»).

Содержание изучаемых белков оценивали относительно уровня белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные мышечные моноклональные антитела: GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen»); вторичные антитела: кроличьи антитела Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L), HRP («Invitrogen»)).

Хемилюминесценцию регистрировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad»). Интенсивность полученных полос анализировали денситометрически с использованием программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad»).

Анализ концентрации сукцината в лизате клеток. Концентрации сукцината в клеточном лизате анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС (жидкостной хроматограф Ultimate 3000 и тройной квадрупольный масс-спектрометр TSQ Fortis («Thermo Fisher Scientific»)). Белки осаждали добавлением к образцу метанола в соотношении 1/1.

Хроматографическое разделение проводили на колонке C18 UCT Selectra (C18 4,6 мм × 100 мм; 5 мкм; 100 Å) с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-418 18GDC46-5UM; температура разделения – 40 °C, скорость потока – 0,5 мл/мин с использованием 0,1%-ного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы А и метанола в качестве подвижной фазы Б. Программа градиента подвижной фазы (А/Б) была следующей: 0,0 мин – 90%/10%; 0,01 мин – 70%/30%; 3,5 мин – 50%/50%; 5 мин – 10%/90%; 7,5 мин – 90%/10%. Объем вводимой пробы – 10 мкл; время анализа – 7,5 мин. В данных условиях время удерживания сукцината составило 3,76–3,82 мин.

Ионизацию молекул сукцината проводили в негативном (отрицательном) режиме электроспрея при атмосферном давлении и напряжении 2500 В. Для количественного анализа использовали оптимизированный режим мониторинга селективных реакций (SRM) со следующими параметрами: 117 m/z → 98,7 m/z, энергия столкновения – 10 В, напряжение линз – 25 В; 117 m/z → 73,11 m/z (использовался для количественного анализа), энергия столкновения – 10 В.

Анализ концентрации инозитолмонофосфата в лизате клеток. Концентрацию инозитолмонофосфата в клеточном лизате также анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Белки осаждали добавлением к образцу ацетонитрила в соотношении 1/1. Хроматографическое разделение проводили на колонке C18 UCT Selectra (C18 4,6 мм × 100 мм; 5 мкм; 100 Å) с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-418 18GDC46-5UM с использованием раствора 10 мМ формиата аммония в качестве подвижной фазы А и метанола в качестве подвижной фазы Б. Программа градиента подвижной фазы (А/Б) была следующей: 0,0 мин – 80%/20%; 2,5 мин – 30%/70%; 2,5 мин – 80%/20%. Объем вводимой пробы – 30 мкл; время анализа – 8 мин. В данных условиях время удерживания инозитолмонофосфата составило 2,2–2,23 мин.

Ионизацию молекул инозитолмонофосфата проводили в негативном (отрицательном) режиме электроспрея при атмосферном давлении и напряжении 3000 В. Для количественного анализа использовали оптимизированный режим мониторинга селективных реакций (SRM) со следующими параметрами: 259 m/z → 79 m/z (использовался для количественного анализа), энергия столкновения 20 В; 259 m/z → 97,1 m/z, энергия столкновения 20 В.

Анализ данных. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием GraphPad Prism версия 8.1.2. Данные представлены как среднее арифметическое (M) ± стандартное отклонение (SD). Статистическую значимость различий при сравнении более чем двух групп

Таблица 1. Значения индекса миогенеза ($M \pm SD$, %) клеток линии C2C12 под действием янтарной кислоты (10, 100, 1000 мкМ), коклюшного токсина (Pertussis toxin (PT), 100 нг/мл) и их сочетанного применения на 1-, 4-, 7-й дни дифференцировки

Экспериментальная серия	Индекс миогенеза, %		
	1-й день дифференцировки	4-й день дифференцировки	7-й день дифференцировки
Дифференцировочная среда	15,4 ± 5,2	44,3 ± 13,8	77,2 ± 4,4
Коклюшный токсин (PT), 100 нг/мл	13,2 ± 4,1	16,3 ± 3,9*	23,2 ± 5,6*
Янтарная кислота, 10 мкМ	57,9 ± 4,4*	60,3 ± 5,6*	87,8 ± 4,4*
Янтарная кислота, 100 мкМ	77,5 ± 2,4*	85,4 ± 1,7*	92,6 ± 5,9*
Янтарная кислота, 1000 мкМ	81,9 ± 2,9*	74,8 ± 2,9*	89,6 ± 3,8*
Янтарная кислота, 10 мкМ + PT	23,2 ± 2,9 [^]	54,5 ± 7,0	40,3 ± 2,4* [^]
Янтарная кислота, 100 мкМ + PT	47,4 ± 5,3* [#]	64,5 ± 5,2* [#]	65,5 ± 5,2* [#]
Янтарная кислота, 1000 мкМ + PT	51,1 ± 5,0* [°]	73,0 ± 5,4*	71,4 ± 8,3*

Примечание. * $p \leq 0,05$ – относительно соответствующего дня дифференцировки; [^] $p \leq 0,05$ – относительно группы янтарная кислота 10 мкМ; # $p \leq 0,05$ – относительно группы янтарная кислота 100 мкМ; ° $p \leq 0,05$ – относительно группы янтарная кислота 1000 мкМ.

оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. Для сравнения двух групп использовали t -критерий Стьюдента. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Миогенная дифференцировка C2C12. Недифференцированные миобласты представляли собой плоские, веретенообразные или звездчатые клетки, которые диффузно располагались по лунке и были строго мононуклеарными. Через 24 ч (1 день дифференцировки) после удаления бычьей сыворотки запускался процесс дифференцировки миобластов, происходило их удлинение и утолщение. К четвертому дню дифференцировки после замены бычьей сыворотки на лошадиную отмечалось появление мышечных трубочек, содержащих более двух ядер. Феномен прогрессивно нарастал и достигал максимального уровня к седьмому дню дифференцировки (рис. 1). Фиксировалось образование длинных многоядерных мышечных трубочек. Индекс миогенеза постепенно увеличивался и достигал максимального значения ($77,2 \pm 4,4\%$) к седьмому дню (табл. 1).

Относительное количество MyoD увеличивалось после замены питательной среды на дифференцировочную, достигая максимального уровня на 4-й день дифференцировки, а затем постепенно снижалось к седьмому дню, но все равно

превышало показатели контроля (рис. 2, а). Относительное количество белка миогенина (MyoG) – регуляторного белка миогенеза, необходимого для терминальной дифференцировки миобластов (рис. 2, б), и тяжелых цепей миозина (MYH) значительно повышалось в клетках на 7-й день дифференцировки и не менялось на 1-й и 4-й дни по сравнению со значениями до дифференцировки (рис. 2, в).

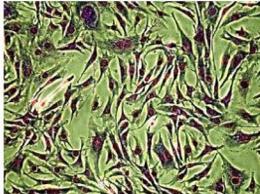
Методом Вестерн-блот нами было доказано наличие сукцинатных рецепторов в клетках линии C2C12. При этом в ходе миогенной дифференцировки относительное количество рецепторов прогрессивно уменьшалось (1–7 дни; рис. 2, г). В исследовании Wang et al. [8] было показано, что при мышечной нагрузке в икроножных мышцах мышей увеличивается количество сукцинатных рецепторов. Полученные результаты позволяют предположить, что SUCNR1, скорее всего, важен в процессе миогенеза, при завершении миогенеза его количество снижается. С этим может быть связан и тот факт, что SUCNR1 не обнаружены у взрослых людей (возраст 55 ± 7 лет) [9].

Таким образом, в настоящем исследовании подтвержден запуск процесса миогенеза при замене питательной среды на дифференцировочную и доказано наличие SUCNR1 в клетках C2C12, что, в свою очередь, дает возможность предположить участие янтарной кислоты в данном процессе.

Влияние янтарной кислоты на миогенную дифференцировку C2C12. Добавление в дифференцировочную среду янтарной кислоты в кон-

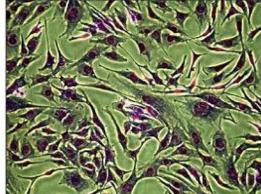
1 день дифференцировки

Дифференцировочная среда



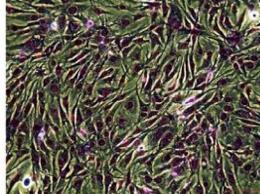
L = 122,52 мкм; B = 15,35 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ



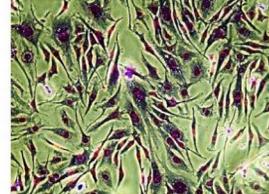
L = 226,43 мкм; B = 50,09 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ

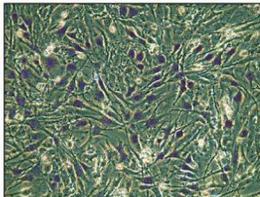


L = 183,80 мкм; B = 56,47 мкм

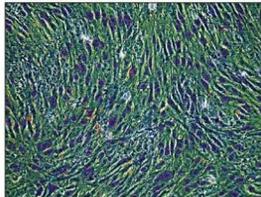
Янтарная кислота, 1000 мкМ



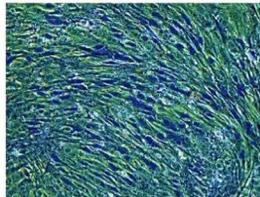
L = 159,36 мкм; B = 36,25 мкм

Дифференцировочная среда+
коклюшный токсин 100 нг/мл

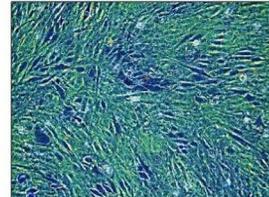
L = 98,83 мкм; B = 27,23 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 93,78 мкм; B = 18,10 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

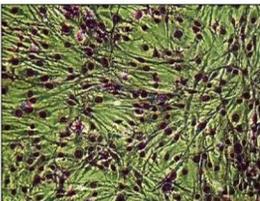
L = 118,13 мкм; B = 15,78 мкм

Янтарная кислота, 1000 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 85,37 мкм; B = 10,81 мкм

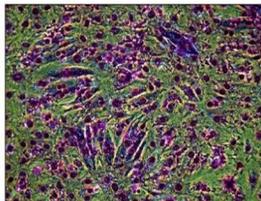
4 день дифференцировки

Дифференцировочная среда



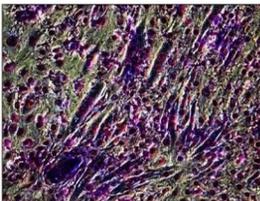
L = 129,11 мкм; B = 13,01 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ



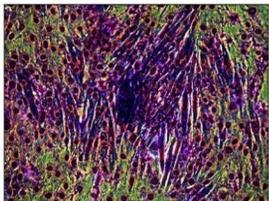
L = 235,09 мкм; B = 34,24 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ

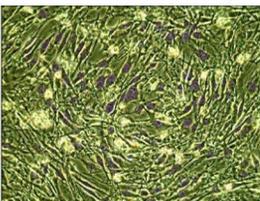


L = 245,34 мкм; B = 44,91 мкм

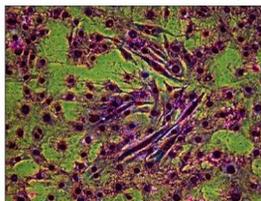
Янтарная кислота, 1000 мкМ



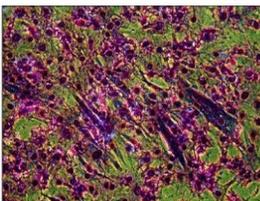
L = 249,48 мкм; B = 26,61 мкм

Дифференцировочная среда+
коклюшный токсин 100 нг/мл

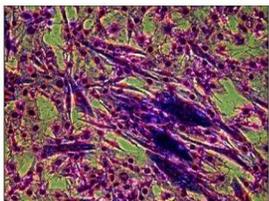
L = 97,49 мкм; B = 20,29 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 157,78 мкм; B = 32,27 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

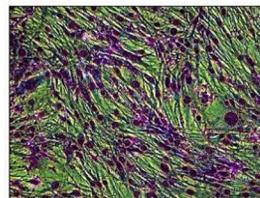
L = 268,62 мкм; B = 31,94 мкм

Янтарная кислота, 1000 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 209,17 мкм; B = 30,1 мкм

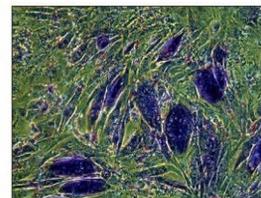
7 день дифференцировки

Дифференцировочная среда



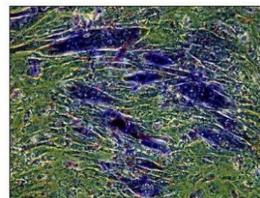
L = 185,24 мкм; B = 21,39 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ



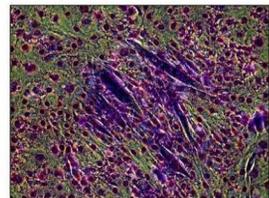
L = 229,28 мкм; B = 50,16 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ

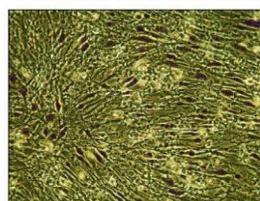


L = 301,21 мкм; B = 44,06 мкм

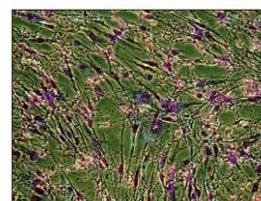
Янтарная кислота, 1000 мкМ



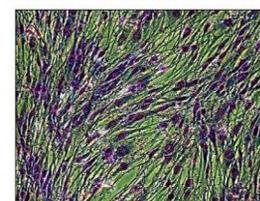
L = 250,33 мкм; B = 47,18 мкм

Дифференцировочная среда+
коклюшный токсин 100 нг/мл

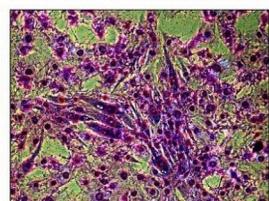
L = 122,64 мкм; B = 15,58 мкм

Янтарная кислота, 10 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 146,66 мкм; B = 18,81 мкм

Янтарная кислота, 100 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 168,48 мкм; B = 20,61 мкм

Янтарная кислота, 1000 мкМ+
коклюшный токсин 100 нг/мл

L = 172,43 мкм; B = 21,05 мкм

Рис. 1. Клетки C2C12 до дифференцировки и на разных стадиях дифференцировки. Фазово-контрастная микроскопия; 200×. Окрашивание ядер по Романовскому–Гимзе; L – длина миобластов; B – ширина миобластов

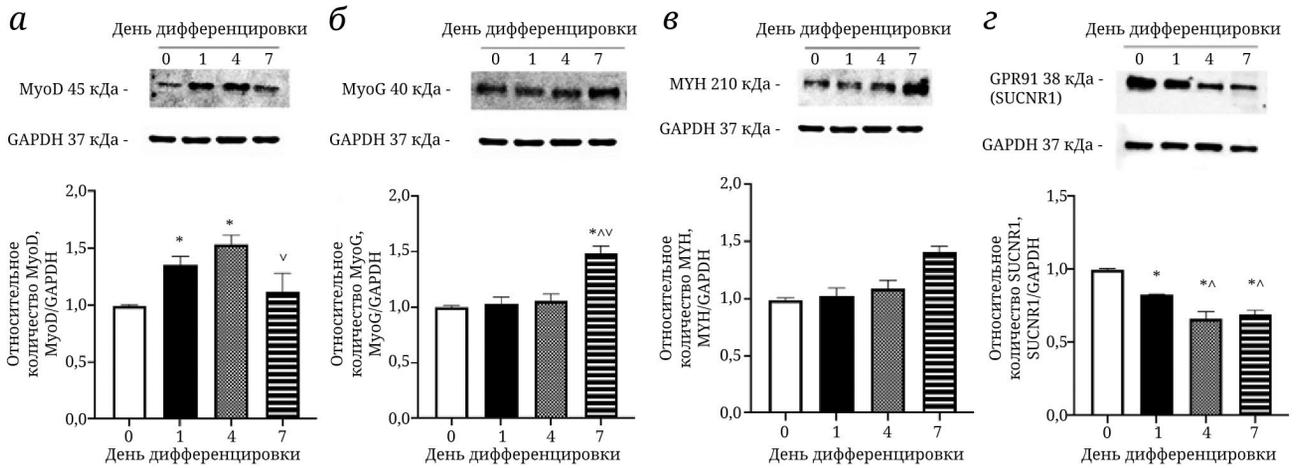


Рис. 2. Результаты вестерн-блот-анализа относительного количества MyoD (а), MyoG (б), MYH (в), SUCNR1 (г) в зависимости от дня дифференцировки клеток C2C12. * $p < 0,05$ – по сравнению с контролем (до дифференцировки); ^Λ $p < 0,05$ – по сравнению с первым днем дифференцировки; ^v $p < 0,05$ – по сравнению с четвертым днем дифференцировки

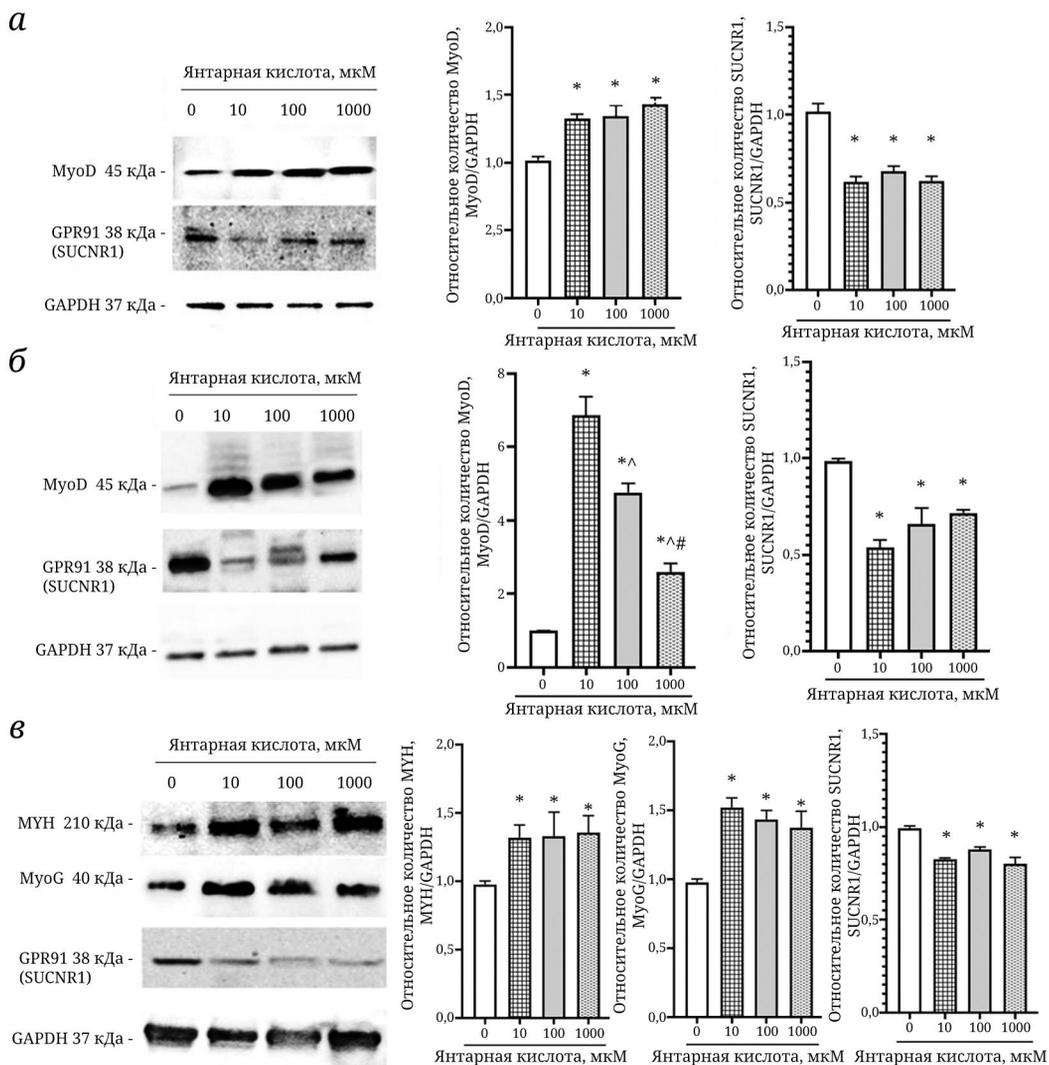


Рис. 3. Результаты вестерн-блот-анализа относительного количества MyoD и SUCNR1 на 1-й (а) и 4-й (б) дни дифференцировки; MYH, MyoG, SUCNR1 – на 7-й день дифференцировки (в) при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ на клетки C2C12. * $p < 0,05$ – по сравнению со значениями соответствующего дня дифференцировки без добавления янтарной кислоты

центрациях 10, 100 и 1000 мкМ вызывало ускорение миогенной дифференцировки C2C12. Это проявлялось в увеличении индекса миогенеза на 1-й, 4-й и 7-й дни по сравнению с показателями клеток в дифференцировочной среде без добавления сукцината (табл. 1).

На 1-й и 4-й дни дифференцировки при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ увеличивалось относительное количество MuoD (рис. 3, а и б), а на 7-й день возрастал уровень MuoG и MYH по сравнению со значениями на соответствующий день дифференцировки без добавления тестируемого вещества (рис. 3, в).

Стоит отметить, что максимальный прирост индекса миогенеза происходил на 1-й день дифференцировки, а увеличение MuoD и MuoG – на 4-й и 7-й день соответственно, то есть усиление индекса миогенеза несколько опережало активацию транскрипционных факторов.

Относительное количество сукцинатных рецепторов снижалось во все сроки эксперимента (1-й, 4-й и 7-й день) и при всех концентрациях янтарной кислоты (10–1000 мкМ) по сравнению с уровнем клеток без добавления вещества (рис. 3).

Таким образом, янтарная кислота во всех протестированных концентрациях ускоряет миогенную дифференцировку C2C12, что связано со снижением уровня SUCNR1. С другой стороны, понижение уровня рецептора может служить ответом на его стимуляцию лигандом. При активации рецепторов, связанных с G-белком, их лиганды также инициируют процессы десенсibilизации – адаптивный ответ, используемый клетками для остановки передачи сигналов G-белками, таким образом предотвращая потенциально вредные эффекты, которые могут возникнуть в результате персистенции стимуляции [21].

Полученные результаты также согласуются с данными других авторов. Например, на мышцах C57BL/6J было показано, что добавление в пищевой рацион животных 0,5% или 1% натриевой соли янтарной кислоты повышает выносливость к физическим нагрузкам, экспрессию тяжелой цепи I миозина, активность аэробных ферментов, потребление кислорода и биогенез митохондрий в скелетных мышцах [8].

Влияние янтарной кислоты на концентрацию внутриклеточного сукцината в процессе миогенной дифференцировки C2C12. При изучении концентрации сукцината в клетках C2C12 в процессе миогенной дифференцировки было показано, что его содержание постепенно снижалось, достигая минимальных значений к седьмому дню (рис. 4, а).

Сукцинат является субстратом цикла Кребса и поставщиком FADH₂ для дыхательной цепи

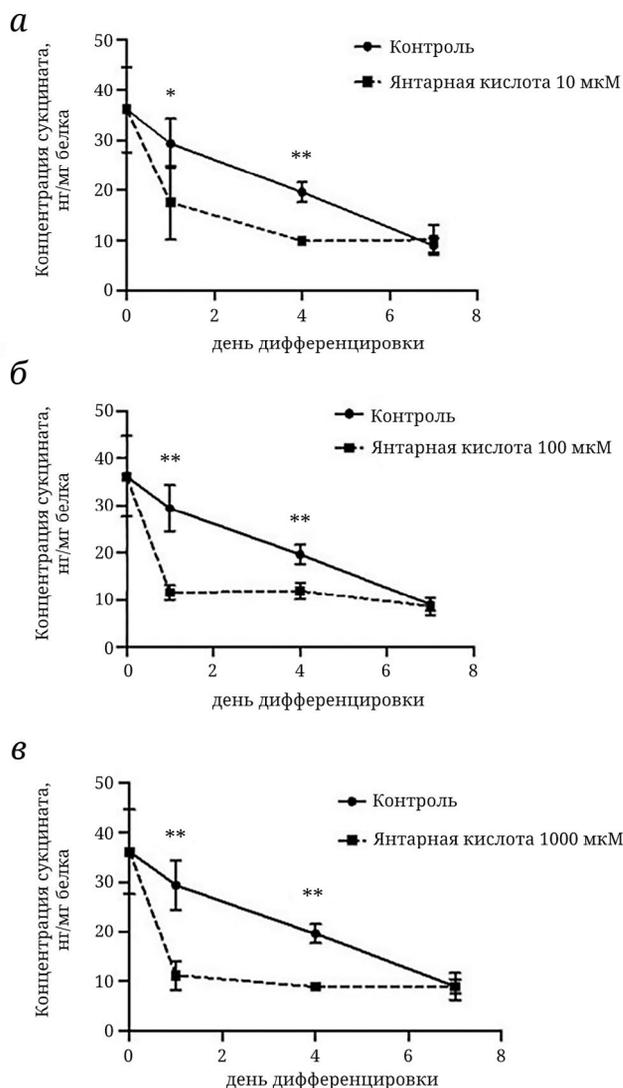


Рис. 4. Концентрация сукцината в клетках C2C12 в процессе их миогенной дифференцировки при внесении в питательную среду янтарной кислоты в концентрациях 10 (а), 100 (б) и 1000 (в) мкМ (метод детекции – ВЭЖХ-МС/МС). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – статистически значимые различия между группами

митохондрий [22], поэтому можно было предположить, что выявленный эффект стимуляции миогенеза связан с его участием в метаболических процессах как субстрата. Однако нами было показано, что добавление янтарной кислоты в дифференцировочную среду во всех тестируемых концентрациях (10, 100 и 1000 мкМ) не только не приводило к увеличению концентрации сукцината в клетках линии C2C12 в процессе дифференцировки, но даже, наоборот, ускоряло процесс снижения. При этом достоверных различий между показателями клеток, инкубированных с разными концентрациями янтарной кислоты, получено не было, что свидетельствует о том, что влияние янтарной кислоты на уровень сукцината не было дозозависимым. При этом стоит

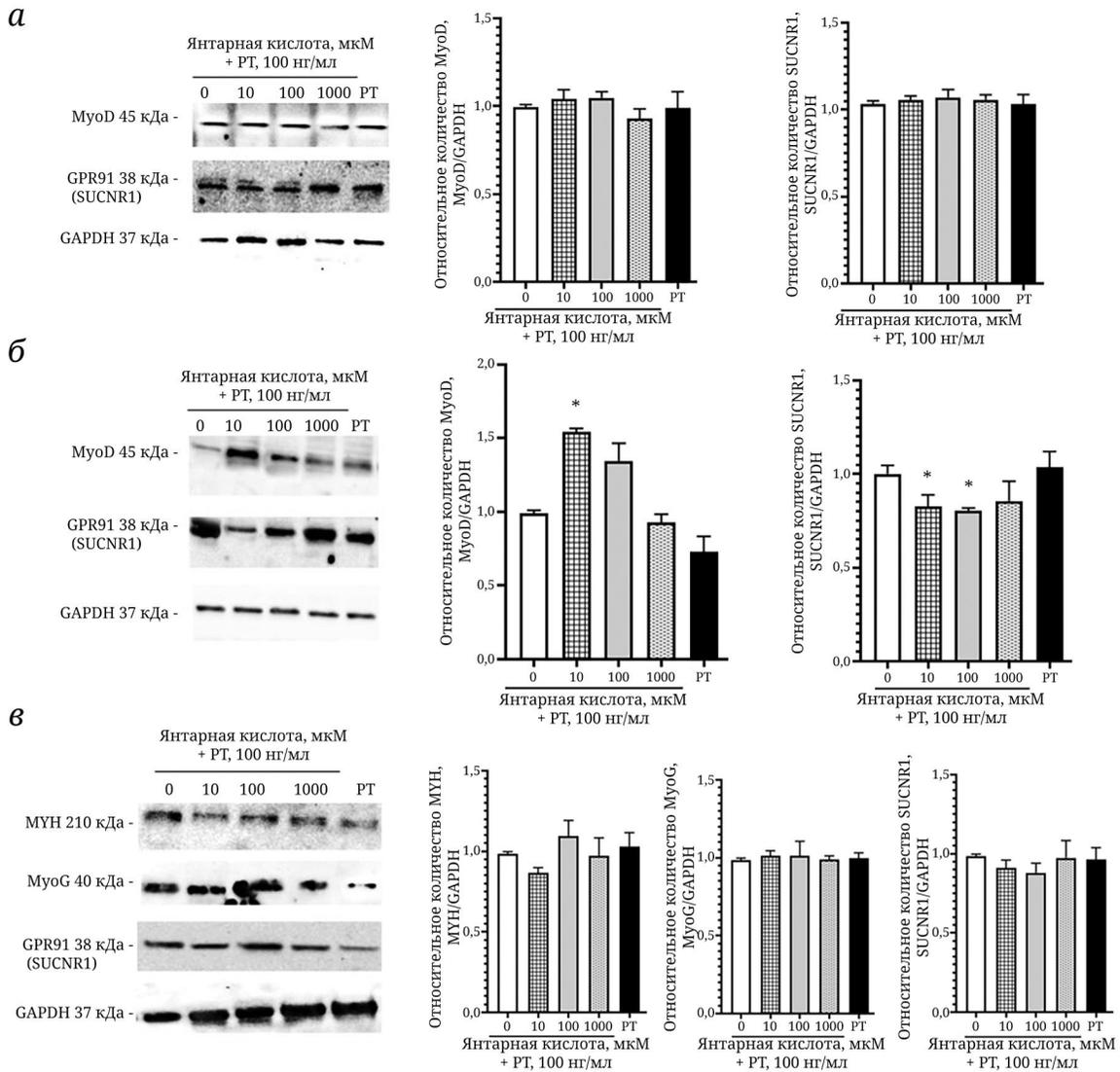


Рис. 5. Результаты вестерн-блот-анализа относительного количества MyoD и SUCNR1 на 1-й (а) и 4-й (б) дни дифференцировки; MYH, MyoG, SUCNR1 – на 7-й день дифференцировки (в) при воздействии янтарной кислоты в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ, коклюшного токсина (Pertussis toxin (PT), 100 нг/мл) и их сочетанного применения на клетки C2C12. * $p < 0,05$ – по сравнению со значениями соответствующего дня дифференцировки без добавления янтарной кислоты

отметить, что концентрацию сукцината оценивали через 24 ч после внесения янтарной кислоты в питательную среду (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сукцинат, видимо, быстро метаболизируется и эффект стимуляции миогенеза реализуется не через влияние на метаболизм клеток и дыхательную цепь. Таким образом, янтарная кислота принимает участие в процессе дифференцировки миоцитов не как энергетический субстрат, а как сигнальная молекула.

Влияние коклюшного токсина на миогенную дифференцировку C2C12 под действием янтарной кислоты. Предполагается, что SUCNR1 может реализовывать свои эффекты через белки Gai, $\beta\gamma$ и Gaq [11, 12]. Для оценки роли сигналь-

ного пути SUCNR1–Gai в стимуляции миогенеза под действием янтарной кислоты применяли специфический ингибитор Gai-белка – коклюшный токсин. Коклюшный токсин катализирует ADP-рибозилирование по остаткам цистеина (Cys351) на С-конце специфических α -субъединиц тримерных G-белков семейства Gi/o (Gi/Go) [23]. Показано, что коклюшный токсин может подавлять основные эффекты SUCNR1 [17].

Добавление коклюшного токсина в дифференцировочную среду приводило к практически полной остановке процессов миогенной дифференцировки. Индекс миогенеза на 4-й и 7-й дни дифференцировки был существенно ниже значений серии с применением изолированной дифференцировочной среды (табл. 1).

При добавлении коклюшного токсина к дифференцировочной среде, содержащей янтарную кислоту, на протяжении всех сроков эксперимента токсин подавлял миогенную дифференцировку, ускоренную сукцинатом, о чем свидетельствует достоверное снижение индекса миогенеза на 1-й, 4-й и 7-й дни (табл. 1).

Также на 1-й день дифференцировки применение коклюшного токсина препятствовало изменению уровня MyoD под действием янтарной кислоты, данный показатель достоверно не отличался от значений клеток, культивируемых в обычной дифференцировочной среде (без янтарной кислоты; рис. 5, а).

На 4-й день дифференцировки при воздействии коклюшного токсина в сочетании с сукцинатом в концентрации 10 мкМ уровень MyoD возрастал относительно четвертого дня дифференцировки, а в остальных концентрациях достоверно не изменялся (рис. 5, б).

На 7-й день дифференцировки коклюшный токсин нивелировал все изменения, вызванные добавлением янтарной кислоты в питательную среду: относительное количество MyoG и MYH достоверно от значений клеток на 7-й день дифференцировки без добавления янтарной кислоты не отличалось (рис. 5, в).

Уровень SUCNR1 при воздействии янтарной кислоты в присутствии коклюшного токсина статистически значимо не отличался от показателей клеток без ее воздействия (дифференцировочной среды). Известно, что коклюшный токсин может предотвращать интернализацию G-белка, связанного с рецептором при воздействии лиганда [24].

Дополнительно в рамках исследования было оценено влияние коклюшного токсина на концентрацию инозитолмонофосфата в клетках C2C12 при стимуляции миогенной дифференцировки янтарной кислотой, поскольку показано, что активация SUCNR1 сопровождается повышением его концентрации [11].

Добавление дифференцировочной питательной среды, содержащей янтарную кислоту, на 1-й день стимуляции миогенной дифференцировки приводило к постепенному нарастанию уровня инозитолмонофосфата в клетках C2C12, который достигал максимального значения к 30-й мин эксперимента.

Добавление коклюшного токсина в дифференцировочную среду вместе с янтарной кислотой препятствовало нарастанию уровня инозитолмонофосфата. Его концентрация достоверно не отличалась от показателей клеток при добавлении дифференцировочной питательной среды без внесения янтарной кислоты (рис. 6).

В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что янтарная кислота стимули-

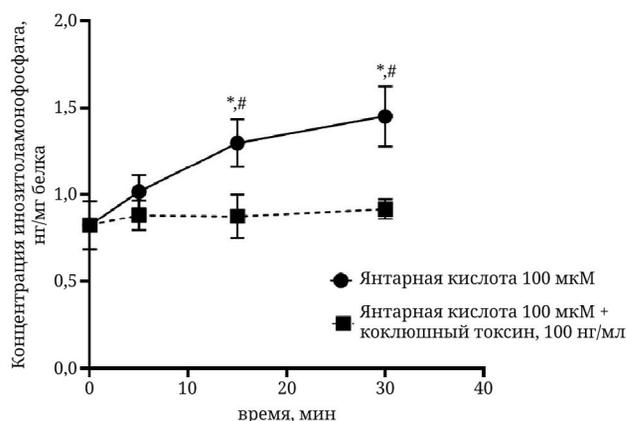


Рис. 6. Концентрация инозитолмонофосфата в клетках C2C12 в процессе их миогенной дифференцировки при внесении в питательную среду янтарной кислоты в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ (метод детекции – ВЭЖХ-МС/МС). * $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями клеток до внесения сукцината, # $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями при добавлении янтарной кислоты (100 мкМ) + коклюшный токсин (100 нг/мл)

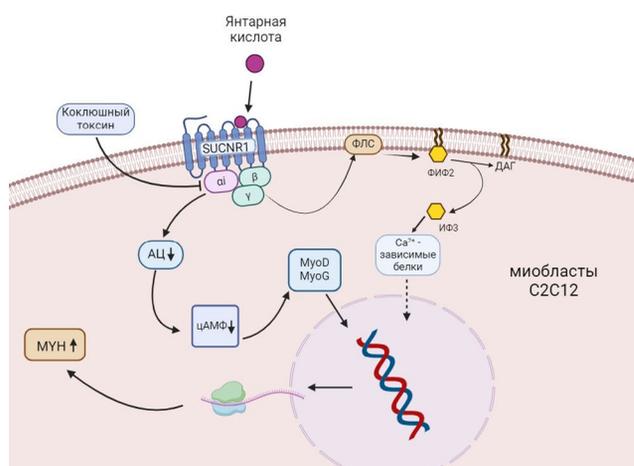


Рис. 7. Предполагаемый механизм действия янтарной кислоты на процесс миогенной дифференцировки клеток C2C12. АЦ – аденилатциклаза; ФЛС – фосфолипаза С; ФИФ2 – фосфатидилинозитол-1,5-дифосфат; ДАГ – диацилглицерол; ИФ3 – инозитол-3-фосфат. Механизма действия через белок $G\alpha_i$ обозначен полужирной стрелкой; механизм действия через белок $G\gamma\beta$ – тонкой стрелкой; механизм действия через Ca^{2+} -зависимые белки – пунктирной стрелкой

рует миогенную дифференцировку C2C12, действуя через SUCNR1- $G\alpha_i$, а не через SUCNR1- $G\alpha_q$ (рис. 7).

Сделанные выводы согласуются с классическими представлениями о регуляции миогенеза. Известно, что повышенный внутриклеточный уровень cAMP может ингибировать экспрессию специфических генов, инициирующих миогенную дифференцировку, тогда как снижение cAMP может их активировать и запускать миогенез [25], например, за счет дефосфорилирования MyoD по остатку Ser200 [26].

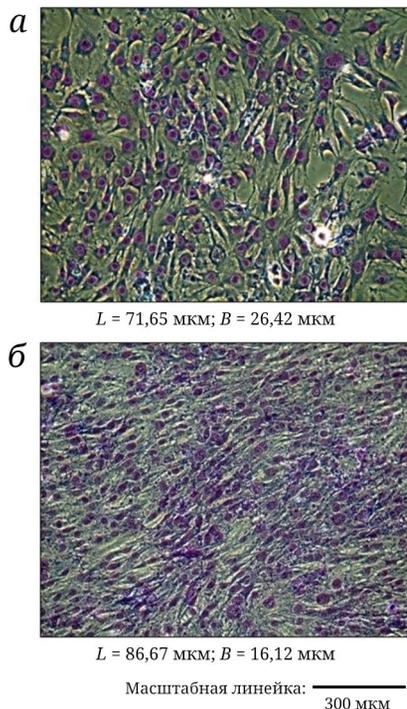


Рис. 8. Клетки C2C12 до дифференцировки (а) и при стимуляции миогенеза добавлением 100 мкМ сукцината (б). Фазово-контрастная микроскопия; 200×. Окрашивание ядер по Романовскому–Гимзе; L – длина миобластов, B – ширина миобластов

Выявленное в нашем исследовании опережение нарастания индекса миогенеза, по сравнению с нарастанием уровня MyoD, может быть связано именно с накоплением активной дефосфорилированной формы данного транскрипционного фактора под действием янтарной кислоты, а не с увеличением его общего количества.

Возможность стимуляции миогенной дифференцировки C2C12 янтарной кислотой без внесения дифференцировочной питательной среды. На завершающем этапе исследования нами была проверена гипотеза о возможности запуска миогенной дифференцировки клеток C2C12 при добавлении янтарной кислоты в культураль-

ную питательную среду, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки, без замены ее на дифференцировочную (содержащую 2% лошадиной сыворотки).

В ходе исследования было установлено, что янтарная кислота самостоятельно запускала процесс миогенной дифференцировки, о чем свидетельствовали морфологические изменения клеток. Индекс миогенеза увеличивался уже с первого дня дифференцировки и достигал максимального значения к седьмому дню – $42,1 \pm 3,0\%$ (рис. 8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящем исследовании на клетках миобластов C2C12 было установлено, что янтарная кислота запускает и ускоряет процесс миогенной дифференцировки, действуя через SUCNR1–Gai.

Вклад авторов. Абаленихина Ю.В. – дизайн исследования, проведение вестерн-блот-анализа, интерпретация результатов; Исаева М.О. – культивирование и визуализация клеток; Мыльников П.Ю. – выполнение ВЭЖХ-МС/МС-анализов; Щулькин А.В. – концепция и дизайн исследования, редактирование; Якушева Е.Н. – проверка критически важного интеллектуального содержания работ.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке внутривузовского гранта молодых ученых Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова на 2023 год (Договор № 3/23).

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Xu, M., Chen, X., Chen, D., Yu, B., Li, M., He, J., and Huang, Z. (2020) Regulation of skeletal myogenesis by microRNAs, *J. Cell. Physiol.*, **235**, 87-104, <https://doi.org/10.1002/jcp.28986>.
- Arnold, H. H., and Braun, T. (1996) Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review, *Int. J. Dev. Biol.*, **40**, 345-353.
- Lassar, A. B., Skapek, S. X., and Novitsch, B. (1994) Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 788-794, [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90046-9).
- Cuenda, A., and Cohen, P. (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis, *J. Biol. Chem.*, **274**, 4341-4346, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4341>.
- Buckingham, M., and Vincent, S. D. (2009) Distinct and dynamic myogenic populations in the vertebrate embryo, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **19**, 444-453, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.08.001>.

6. Arneson-Wissink, P. C., Hogan, K. A., Ducharme, A. M., Samani, A., Jatoui, A., and Doles, J. D. (2020) The wasting-associated metabolite succinate disrupts myogenesis and impairs skeletal muscle regeneration, *JCSM Rapid Commun.*, **3**, 56-69, <https://doi.org/10.1002/rco2.14>.
7. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints, *Mol. Pharmacol.*, **63**, 1256-1272, <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>.
8. Wang, T., Xu, Y. Q., Yuan, Y. X., Xu, P. W., Zhang, C., Li, F., Wang, L. N., Yin, C., Zhang, L., Cai, X. C., Zhu, C. J., Xu, J. R., Liang, B. Q., Schaul, S., Xie, P. P., Yue, D., Liao, Z. R., Yu, L. L., Luo, L., Zhou, G., Yang, J. P., He, Z. H., Du, M., Zhou, Y. P., Deng, B. C., Wang, S. B., Gao, P., Zhu, X. T., Xi, Q. Y., et al. (2019) Succinate induces skeletal muscle fiber remodeling via SUCNR1 signaling, *EMBO Rep.*, **9**, e47892, <https://doi.org/10.15252/embr.201947892>.
9. Abdelmoez, A. M., Dmytriyeva, O., Zurke, Y. X., Trauelsen, M., Marica, A. A., Savikj, M., Smith, J. A. B., Monaco, C., Schwartz, T. W., Krook, A., and Pillon, N. J. (2023) Cell selectivity in succinate receptor SUCNR1/GPR91 signaling in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **324**, E289-E298, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00009.2023>.
10. He, W., Miao, F. J., Lin, D. C., Schwandner, R. T., Wang, Z., Gao, J., Chen, J. L., Tian, H., and Ling, L. (2004) Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors, *Nature*, **429**, 188-193, <https://doi.org/10.1038/nature02488>.
11. Gilissen, J., Jouret, F., Pirotte, B., and Hanson, J. (2016) Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function, *Pharmacol. Ther.*, **159**, 56-65, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.01.008>.
12. Harden T. K., Waldo G. L., Hicks S. N., and Sondek J. (2011) Mechanism of activation and inactivation of Gq/ phospholipase C- β signaling nodes, *Chem. Rev.*, **10**, 6120-6129, <https://doi.org/10.1021/cr200209p>.
13. Yaffe, D., and Saxel, O. (1977) A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation, *Differentiation*, **7**, 159-166, <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1977.tb01507.x>.
14. Sin, J., Andres, A. M., Taylor, D. J., Weston, T., Hiraumi, Y., Stotland, A., Kim, B. J., Huang, C., Doran, K. S., and Gottlieb, R. A. (2016) Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts, *Autophagy*, **12**, 369-380, <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1115172>.
15. Исаева М. О., Гаджиева Ф. Т., Абаленихина Ю. В., Шулькин А. В., Якушева Е. Н. (2023) Способ культивирования и механизмы регуляции этапов миогенеза клеточной линии C2C12, *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова*, **4**, 525-534, <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ375362>.
16. Буев Д. О., Емелин А. М., Яковлев И. А., Деев Р. В. (2020) Культивирование миобластов и миосателлитов *in vitro*, *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*, **1**, 86-97, <https://doi.org/10.23888/НМЈ20208186-97>.
17. Sundström, L., Greasley, P. J., Engberg, S., Wallander, M., and Ryberg, E. (2013) Succinate receptor GPR91, a G α (i) coupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLC β , *FEBS Lett.*, **15**, 2399-2404, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.067>.
18. Емелин А. М., Буев Д. О., Слабикова А. А., Яковлев И. А., Деев Р. В. (2019) Количественная оценка миогенной дифференцировки клеточной линии C2C12 с использованием полиэтиленгликоля и индуцированных сред *in vitro*, *Гены Клетки*, **14**, 87.
19. Sestili, P., Barbieri, E., Martinelli, C., Battistelli, M., Guescini, M., Vallorani, L., Casadei, L., D'Emilio, A., Falcieri, E., Piccoli, G., Agostini, D., Annibali, G., Paolillo, M., Gioacchini, A. M., and Stocchi, V. (2009) Creatine supplementation prevents the inhibition of myogenic differentiation in oxidatively injured C2C12 murine myoblasts, *Mol. Nutr. Food Res.*, **9**, 1187-1204, <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800504>.
20. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
21. Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization, *Mol. Pharmacol.*, **1**, 9-18, <https://doi.org/10.1124/mol.63.1.9>.
22. Vercellino, I., and Sazanov, L. A. (2022) The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 141-161, <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00415-0>.
23. Loch, C., and Antoine, R. (1995) A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit, *Biochimie*, **5**, 333-540, [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)88143-0](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88143-0).
24. Najimi, M., Gailly, P., Maloteaux, J. M., and Hermans, E. (2002) Distinct regions of C-terminus of the high affinity neurotensin receptor mediate the functional coupling with pertussis toxin sensitive and insensitive G-proteins, *FEBS Lett.*, **1-3**, 329-333, [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02285-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02285-8).
25. Siow, N. L., Choi, R. C. Y., Cheng, A. W. M., Jiang, J. X. S., Wan, D. C. C., Zhu, S. Q., and Tsim, K. W. K. (2002) A Cyclic AMP-dependent pathway regulates the expression of acetylcholinesterase during myogenic differentiation of C2C12 cells, *J. Biol. Chem.*, **39**, 36129-36136, doi:10.1074/jbc.M206498200.
26. Kitzmann, M., Vandromme, M., Schaeffer, V., Carnac, G., Labbé, J. C., Lamb, N., and Fernandez, A. (1999) cdk1- and cdk2-mediated phosphorylation of MyoD Ser200 in growing C2 myoblasts: role in modulating MyoD half-life and myogenic activity, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3167-3176, <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.3167>.

THE MECHANISM OF STIMULATION OF MYOGENESIS UNDER THE ACTION OF SUCCINIC ACID THROUGH THE SUCCINATE RECEPTOR SUCNR1

Y. V. Abalenikhina*, M. O. Isayeva, P. Yu. Mylnikov, A. V. Shchulkin,
and E. N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, 390026 Ryazan, Russia; e-mail: abalenihina88@mail.ru

In a study on cells of the C2C12 line, the effect of succinic acid on the processes of myogenesis was studied. In the concentration range of 10-1000 microns, succinic acid stimulated the process of myogenic differentiation, increasing the number of myogenesis factors MyoD (at all stages of myogenesis) and myogenin (at the stage of terminal differentiation). The Western blot method revealed specific succinate receptors SUCNR1 in C2C12 cells, the level of which decreased during myogenesis. When succinic acid was added to cells, the level of intracellular succinate did not change significantly and decreased during myogenic differentiation. Using a specific Gai protein inhibitor, pertussis toxin, it was found that stimulation of myogenesis of C2C12 under the action of succinic acid is realized through SUCNR1–Gai.

Keywords: myogenesis, succinic acid, SUCNR1, inositol monophosphate, pertussis toxin

РАЗЛИЧИЯ ВЛИЯНИЯ БЕТА-ГИДРОКСИБУТИРАТА НА БИОГЕНЕЗ МИТОХОНДРИЙ, МАРКЕРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ВОСПАЛЕНИЯ В ТКАНЯХ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

© 2024 В.В. Нестерова¹, П.И. Бабенкова¹, А.А. Брезгунова², Н.А. Самойлова¹, И.С. Садовникова¹, Д.С. Семенович², Н.В. Андрианова², А.П. Гуреев^{1,3}, Е.Ю. Плотников^{2*}

¹ Воронежский государственный университет, 394018 Воронеж, Россия

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: plotnikov@belozersky.msu.ru

³ Воронежский государственный университет инженерных технологий, 394036 Воронеж, Россия

Поступила в редакцию 09.05.2024

После доработки 13.06.2024

Принята к публикации 19.06.2024

Одним из подходов терапии возрастных заболеваний является воздействие на метаболизм клеток организма путём применения определённых диет или их фармакологических миметиков. Кетогенная диета значительно влияет на энергетический метаболизм клеток и функционирование митохондрий, в связи с чем активно исследуется при различных возрастных патологиях. В данной работе мы оценили влияние миметика кетогенной диеты бета-гидроксибутирата (БГБ) на экспрессию генов белков, регулирующих биогенез митохондрий (*Ppargc1a*, *Nrf1*, *Tfam*), контроль качества (*Sqstm1*), работу антиоксидантной системы (*Nfe2l2*, *Gpx1*, *Gpx3*, *Srxn1*, *Txnrd2*, *Slc6a9*, *Slc7a11*), а также воспалительный ответ (*Il1b*, *Tnf*, *Ptgs2*, *Gfap*) в мозге, лёгких, сердце, печени, почках и мышцах молодых и старых крыс. Кроме того, мы проанализировали количество копий митохондриальной ДНК (мтДНК), проанализировали накопление повреждений мтДНК, а также уровень окислительного стресса по концентрации соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС) и восстановленного глутатиона. Мы показали, что в ряде органов старение нарушает биогенез митохондрий и функционирование антиоксидантной системы клеток, что сопровождалось повышенным окислительным стрессом и воспалением. Введение БГБ в течение 2 недель по-разному влияло на органы молодых и старых крыс. В частности, БГБ повышал экспрессию генов белков, связанных с биогенезом митохондрий и антиоксидантной системой, особенно в ткани печени и мышц молодых, но не старых животных. В то же время в почках старых крыс БГБ способствовал снижению количества ТБКРС. Таким образом, наше исследование показало, что экзогенное введение кетоновых тел может существенным образом влиять на экспрессию генов в органах молодых крыс, способствуя усилению биогенеза митохондрий и улучшению работы антиоксидантной системы, а также частично снижая уровень окислительного стресса. Однако у старых животных эти изменения были выражены значительно слабее.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, бета-гидроксибутират, кетогенная диета, митохондрии, митохондриальная ДНК, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972524070113 EDN: WMHYEE

ВВЕДЕНИЕ

Старение – это процесс, ассоциированный с накоплением различных повреждений, которые приводят к дисфункции клеток и тканей.

Считается, что нарушение работы органов при старении может быть связано с дисрегуляцией процессов, контролирующих метаболизм питательных веществ и функционирование митохондрий [1]. Митохондрии являются основной

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; БГБ – бета-гидроксибутират; ТБКРС – соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой.

* Адресат для корреспонденции.

клеточной системой, ответственной за поддержание энергетического гомеостаза клетки. Основной их функцией является производство АТФ, но митохондрии также вовлечены в другие клеточные процессы, такие как регуляция метаболизма кальция и редокс-статуса клетки, синтез метаболитических интермедиатов, генерация активных форм кислорода (АФК) и регуляция апоптоза. Всё это позволяет рассматривать митохондриальные дисфункции как одно из основных звеньев в патогенезе широкого спектра заболеваний [2]. За счёт избыточного образования АФК или истощения митохондриальных антиоксидантов [3] с возрастом могут накапливаться повреждения и мутации митохондриальной ДНК (мтДНК), что ухудшает функционирование дыхательной цепи митохондрий и приводит к дальнейшему увеличению выработки АФК и повреждению компонентов клетки [4].

Важным фактором, влияющим на метаболизм и нормализацию функций митохондрий, является диета. Сейчас в исследованиях и клинической практике используется множество диет, влияющих на разные аспекты метаболизма, однако в последнее время всё большую популярность набирает кетогенная диета – низкоуглеводная диета с высоким содержанием жиров и умеренным содержанием белков [5]. Данная диета вызывает образование в печени специфических соединений – кетоновых тел, например, β -гидроксибутирата (БГБ), которые эффективны при профилактике и лечении определённых заболеваний, таких как эпилепсия [6], а также болезнь Альцгеймера [7], болезнь Паркинсона [8], сердечно-сосудистые заболевания [9] и инсульт [10].

Ранее считалось, что во многих тканях митохондрии используют БГБ в качестве альтернативного субстрата для получения АТФ, что значительно улучшает энергетическую обеспеченность ткани, в то время как сейчас всё большее распространение приобретает взгляд на БГБ не как на метаболитический интермедиат, а как на важный регулятор физиологических процессов [11] через сигнальные механизмы. В частности, БГБ способен существенно улучшать митохондриальные функции, снижать уровень митохондриального Ca^{2+} , продукцию АФК, активацию митохондриальной поры (mPTP), что способствует снижению воспалительных процессов [12].

В значительно меньшей степени изучены эффекты БГБ как модулятора транскрипции, особенно у животных разных возрастов, хотя известно, что он может влиять на уровень ацетилирования гистонов [13], а, следовательно, и на уровень экспрессии генов. Также БГБ может вносить свой вклад в изменение активности сигнальных путей Nrf2/ARE [14], PGC-1 α , FoxO1 [15] и NF- κ B [16].

Данные сигнальные пути в значительной степени связаны с регуляцией митохондриальных процессов, и некоторые из них рассматриваются как перспективные мишени для геропротекции [17, 18].

Целью данной работы был анализ влияния инъекций БГБ в течение 2 недель на экспрессию генов белков, ассоциированных с биогенезом митохондрий, контролем качества, антиоксидантной системой, а также воспалением в ключевых органах, таких как мозг, лёгкие, сердце, печень, почки, мышцы. Помимо этого, было изучено изменение количества мтДНК в клетках разных органов молодых и старых крыс, а также количества масштабных делеций и повреждений мтДНК, то есть исследовано влияние БГБ на целостность структуры митохондриального генома. Была также проанализирована интенсивность окислительного стресса в различных тканях, влияние на данный процесс старения и терапии БГБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модельный объект и дизайн эксперимента.

Эксперименты проводили на молодых ($n = 12$, возраст 3–4 месяца, вес 300–400 г) и старых ($n = 15$, возраст 27 месяцев, вес 600–800 г) самцах крыс линии Wistar. Протоколы работы с животными были рассмотрены и одобрены этическим комитетом НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 006-1/1/2024). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с руководствами ARRIVE. Группы молодых и старых животных случайным образом разделили на 2 подгруппы, одна из которых в течение 14 дней получала подкожную инъекцию БГБ в дозе 200 мг/кг, а другая – подкожную инъекцию эквивалентного объёма физиологического раствора. На 14 сутки введения БГБ у крыс собирали образцы органов (мозг, лёгкие, сердце, печень, почки, мышцы) для дальнейшего анализа. Последнюю инъекцию БГБ проводили за 1 ч до замораживания органов в жидком азоте.

Оценка уровня экспрессии генов. Выделение РНК осуществляли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). Для обратной транскрипции использовали набор РЕВЕРТА-L («АмплиСенс», Россия). Количественный ПЦР-анализ проводился на термоциклере CFX96™ Real-Time System («Bio-Rad», США) с использованием набора qPCRMix-HS SYBR. Нормализованный уровень экспрессии рассчитывался по формуле $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$. Результаты экспрессии генов представлены в виде тепловых карт, которые были получены при помощи стандартного ПО Bio-Rad CFX Manager (версия 2.1). Для генов, где были обнаружены статистически значимые изменения в экспрессии, результаты

Таблица 1. Последовательности праймеров для оценки уровня экспрессии генов у крыс

Название гена	Прямая последовательность	Обратная последовательность
<i>Gapdh</i>	GGTCCCTAGGCCCTCCTG	TCCCAACTCGGCCCAACA
<i>Gfap</i>	CGAAGAAAACCGCATCACCA	CCGCATCTCCACCGTCTTTA
<i>Gpx1</i>	AGTCCACCGTGTATGCCTTCT	GAGACGCGACATTCTCAATGA
<i>Gpx3</i>	CCATTCGGCCTGGTCAATTCT	CCCGGTGCAACGTACTTGAG
<i>Il1b</i>	GGTTCCTTGTGCAAGTGCT	TCTGGACAGCCCAAGTCAAG
<i>Nfe2l2</i>	CACATCCAGACAGACACCAGT	CTACAAATGGGAATGTCTCTGC
<i>Nrf1</i>	TTACTCTGCTGTGGCTGATGG	CCTCTGATGCTTGCCTCGTCT
<i>Ppargc1a</i>	GCACCAGAAAACAGCTCCAA	TTGCCATCCCGTAGTTCACT
<i>Ptgs2</i>	CTCTGCGATGCTCTTCCGAG	TCTTGTCAGAAACTCAGGCGTA
<i>Slc6a9</i>	AAGGGATGYTGAATGGTGCT	TAGCCCACGCTCGTCAGTA
<i>Slc7a11</i>	CTGGGCAKAGAGAAGGTRGTTT	CCCTTGGGGGAGATGAAGATG
<i>Sqstm1</i>	TCCCTGTCAAGCAGTATCC	TCCTCCTTGGCTTTGTCTC
<i>Srxn1</i>	CCARGGYGGYACTACTACTA	AAGGGTYGACCTCACGAGCTT
<i>Tfam</i>	ATCAAGACTGTGCGTGCATC	AGAACTTACAAACCCGCAC
<i>Tnf</i>	ATGGGCTCCCTCTCATCAGT	GCTTGGTGGTTGCTACGAC
<i>Txnrd2</i>	GATCTCTGGTGATCGGTGGG	CGGGGAGAGGGTTCCACATA

дополнительно представлены в виде гистограмм. В качестве референса использовался ген *Gapdh*. Последовательности праймеров исследуемых генов представлены в табл. 1.

Измерение количества копий мтДНК. Относительное количество копий мтДНК оценивалось с помощью ПЦР в реальном времени. Для реакции использовалась смесь 5X qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Для амплификации мтДНК крыс использовали следующую пару праймеров: прямой: 5'-СТСААГГАСТТГГCGGТАCT-3'; обратный: 5'-ГСТГААТТАГCGАГААГГГГТ-3'. Амплификация участка ядерной ДНК, относительно которого проводилась нормализация, проводилась с использованием следующих праймеров: прямой: 5'-GGTCCCTAGGCCCTCCTG-3'; обратный: 5'-ТСС-СААСТCGGCCCAACA-3'. Условия реакции: общая денатурация при 95 °С – 3 мин, далее 35 циклов: денатурация при 95 °С – 10 с, отжиг праймеров при 59 °С – 30 с, элонгация при 72 °С – 30 с. Расчёт относительного количества копий мтДНК проводился с помощью стандартного ПО Bio-Rad CFX Manager (версия 2.1) на основе стандартной формулы $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$.

Оценка количества масштабных делеций мтДНК. Выделение тотальной ДНК из различных тканей крыс проводили с помощью коммерческо-

го набора ПРОБА-ГС («ДНК-технология», Россия), согласно протоколу. Относительное количество масштабных делеций мтДНК крыс (Δ мтДНК₄₈₃₄) определяли с помощью метода ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-зондов по протоколу, описанному Loshchenova et al. [19]. Количество Δ мтДНК₄₈₃₄ (участка, образующегося в результате смыкания последовательностей, фланкирующих делетируемый участок мтДНК) нормировалось на общее количество мтДНК. Для нормализации количества делеций на количество копий мтДНК амплифицировали участок D-петли. Амплификация проводилась с использованием смеси 5X qPCRmix-HS («Евроген»). Условия реакции: общая денатурация при 95 °С – 3 мин, далее 35 циклов: денатурация при 95 °С – 10 с, отжиг праймеров при 64 °С – 15 с, элонгация при 72 °С – 20 с.

Оценка количества повреждений мтДНК. Количество повреждений мтДНК оценивали с помощью ПЦР длинных фрагментов с использованием Encuslo-полимеразы («Евроген»). Протокол и панели праймеров для мтДНК крысы были разработаны и оптимизированы нами ранее [20]. Метод основан на предположении о том, что наличие повреждений в структуре ДНК, например, одноцепочечных разрывов, модифицированных

оснований или их аддуктов, будет препятствовать работе ДНК-полимеразы и накоплению ПЦР-продукта. Таким образом, эффективность амплификации участка ДНК обратно пропорциональна количеству молекул ДНК с повреждениями. Условия реакции: общая денатурация при 95 °С – 3 мин, далее 35 циклов: денатурация при 95 °С – 10 с, отжиг праймеров при 59 °С – 4 мин 30 с, элонгация при 72 °С – 30 с. Полученные значения ΔCq между контрольными и опытными (повреждёнными) длинными фрагментами сравнивались с ΔCq контрольных и опытных коротких фрагментов, которые использовали в качестве референсов.

Измерение содержания соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС). Содержание ТБКРС определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [21], с некоторыми модификациями. Ткани гомогенизировали в 1х PBS (рН 7,4) в соотношении 1 : 10 (w/v) соответственно. К 200 мкл гомогената добавляли 20 мкл 50%-ной трихлоруксусной кислоты и 800 мкл ТБК-реактанта, содержащего 0,5% (w/v) 2-тиобарбитуровой кислоты, 0,35 М гидроксида натрия и 1,75 М уксусной кислоты. Пробы кипятили 1 ч, охлаждали в ледяной бане до комнатной температуры и центрифугировали при 10 000 g 10 мин (+4 °С). В супернатанте измеряли оптическую плотность при 532 нм на спектрофотометре Экрос ПЭ-5400УФ (ООО «Экросхим», Россия). Содержание ТБКРС рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции 156 000 М⁻¹ · см⁻¹, и выражали в нмоль/мг общего белка. Содержание общего белка в гомогенате устанавливали с помощью метода Лоури [22].

Измерение содержания восстановленного глутатиона (GSH). Содержание восстановленного глутатиона определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции с реактивом Элмана [23], с некоторыми модификациями. Ткани гомогенизировали в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 0,5%-ный Triton-X100 в соотношении 1 : 10 (масса ткани/объём среды соответственно). Депротенинизацию осуществляли путём добавления 50%-ной трихлоруксусной кислоты к гомогенату в объёмном соотношении 1 : 9. Пробы центрифугировали 10 мин при 10 000 g (+4 °С). Супернатант смешивали с 0,4 М Tris-HCl (рН 8,9), содержащего 1 мМ ЭДТА в объёмном соотношении 1 : 2, и добавляли реактив Элмана (0,2 мМ). Пробы инкубировали при комнатной температуре 15 мин и измеряли оптическую плотность при 412 нм на спектрофотометре Экрос ПЭ-5400УФ (ООО «Экросхим»). Содержание глутатиона рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции 14 150 М⁻¹ · см⁻¹, и выражали в нмоль/мг белка. Содержание общего

белка в гомогенате устанавливали с помощью метода Лоури [22].

Статистический анализ. Статистический анализ проводился с помощью программного пакета STATISTICA 12 («StatSoft», США). Результаты представлены в виде средних значений ± ошибка среднего. Для статистического анализа использовали *t*-критерий или непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Старение негативно влияет на антиоксидантную систему клеток и на экспрессию генов белков, регулирующих биогенез и контроль качества митохондрий. В органах молодых и старых крыс была проанализирована экспрессия генов, ассоциированных с биогенезом митохондрий, системой контроля качества, антиоксидантной системой и воспалением (рис. 1). Было показано, что старение значительно изменяет экспрессию анализируемых генов, особенно в мозге, мышцах и лёгких (рис. 1). В частности, выявлено, что в мышцах и мозге с возрастом наблюдалось снижение уровня мРНК генов ферментов, регулирующих биогенез митохондрий (*Ppargc1a*, *Tfam*) (рис. 1, а–в). Возрастные изменения в мышцах были ассоциированы со снижением экспрессии гена *Sqstm1*, продукт которого участвует в контроле качества белков и органелл (рис. 1, г). В лёгких и мышцах старых крыс наблюдалось значительное снижение экспрессии генов, продукты которых являются компонентами системы антиоксидантной защиты, в частности, *Gpx1*, *Srxn1*, *Txnrd2*, *Slc7a11*, *Slc6a9* (рис. 1, д–м). Наблюдаемые негативные возрастные изменения сопровождались также увеличением уровня маркеров воспаления, в частности, повышенной экспрессией *Tnf*, *Ptgs2*, *Gfap*, *Il1b*, прежде всего в мозге и почках (рис. 1, н–р).

БГБ усиливает экспрессию белков биогенеза митохондрий и антиоксидантной системы в печени и мышцах молодых, но не старых крыс. Было проанализировано влияние БГБ на экспрессию исследуемых генов в органах молодых и старых крыс и выявлено, что подкожные инъекции БГБ в течение 2 недель оказывали наибольший положительный эффект на ткань печени и мышц молодых крыс. В частности, в печени БГБ увеличивал экспрессию генов, ассоциированных с биогенезом митохондрий (*Ppargc1a*, *Nrf1*, *Tfam*) (рис. 2, а–в) и антиоксидантной системой клеток (*Nfe2l2*, *Gpx1*, *Txnrd2*, *Slc7a11*, *Slc6a9*) (рис. 2, г–з). В мышцах введение БГБ также стимулировало биогенез митохондрий (*Nrf1*, *Tfam*) и антиоксидантную защиту (*Srxn1*, *Slc6a9*) (рис. 2, и–м).

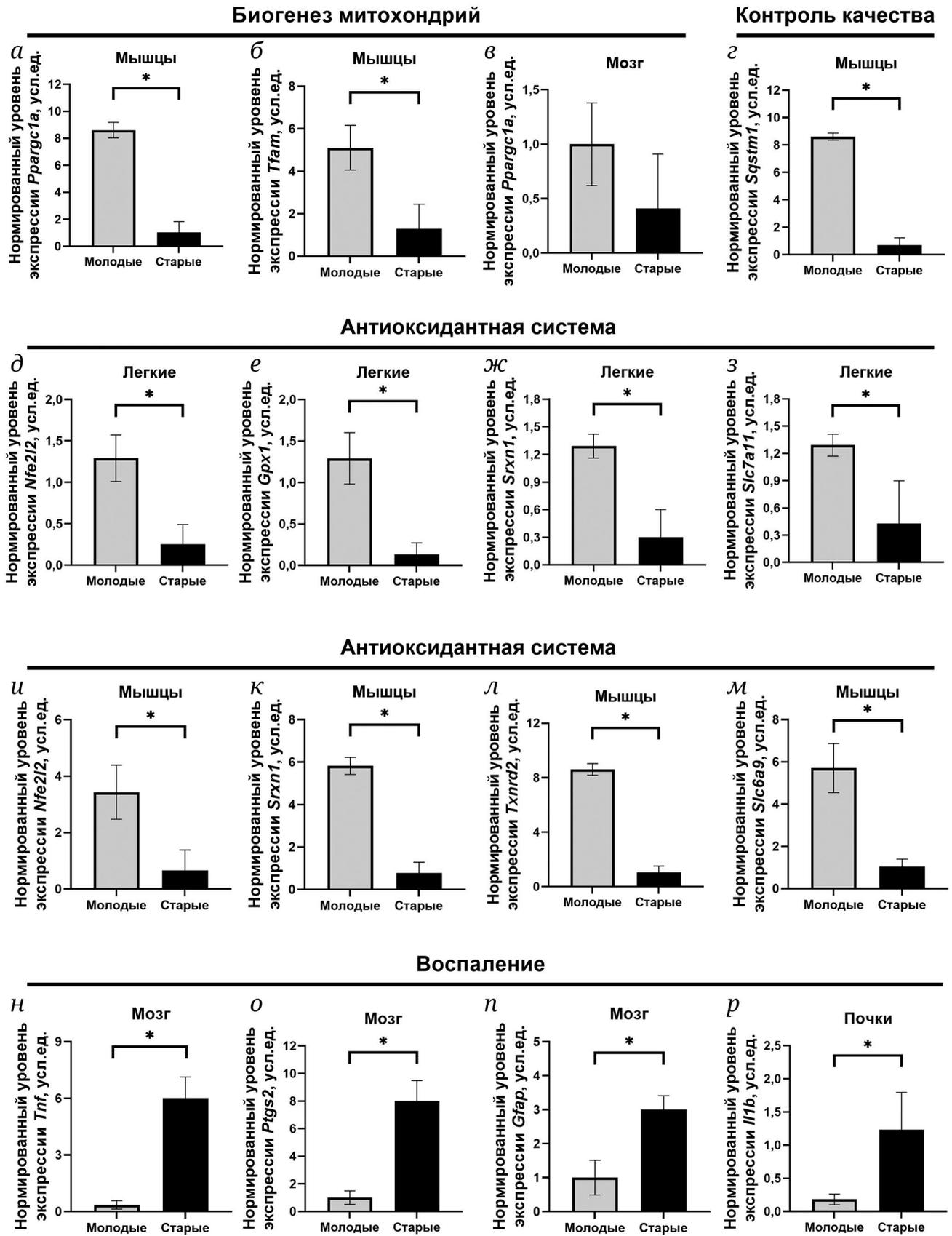


Рис. 1. Влияние старения на экспрессию генов белков, отвечающих за биогенез митохондрий (а-в), аутофагию (г), антиоксидантную систему клеток (д-м) и воспаление (н-р). Результаты представлены в виде средних значений ± ошибка среднего. Достоверность различий между группами: * $p < 0,05$ (t-критерий)

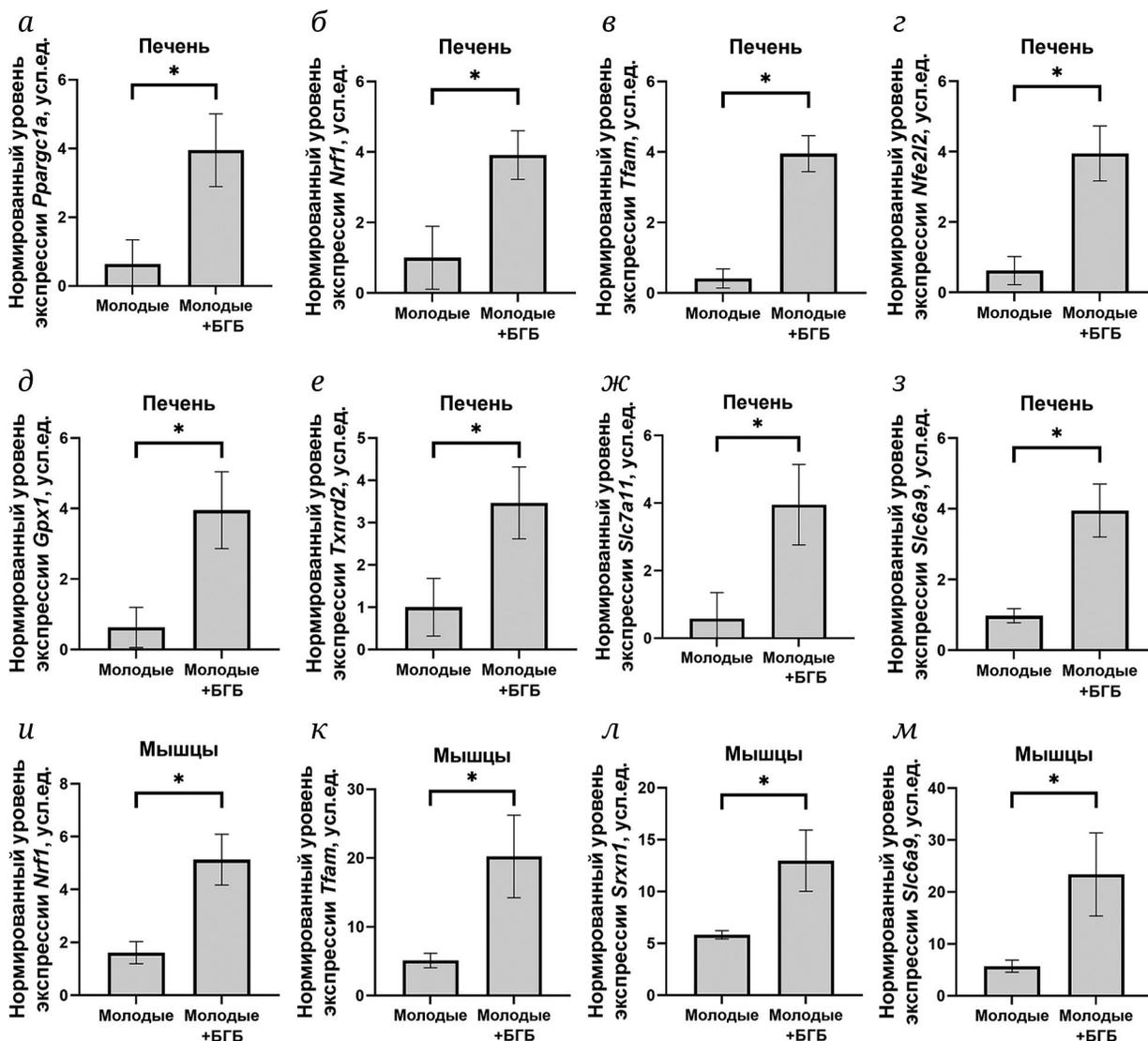


Рис. 2. Влияние подкожного введения БГБ в течение 2 недель на ткани молодых крыс. Влияние БГБ на экспрессию белков, отвечающих за биогенез митохондрий и антиоксидантную систему, в ткани печени (а–з) и мышц (и–м). Результаты представлены в виде средних значений \pm ошибка среднего. Достоверность различий между группами: * $p < 0,05$ (t-критерий)

В то же время у старых крыс инъекции БГБ в течение 2 недель оказывали слабое влияние на экспрессию анализируемых генов. В частности, у них не наблюдалось усиления экспрессии генов, отвечающих за биогенез митохондрий и антиоксидантную систему, ни в печени или мышцах, ни в других органах (рис. 3).

Старение влияет на количество копий мтДНК в тканях. В связи с тем, что старение и БГБ значительно влияли на экспрессию генов, кодирующих белки, отвечающие за биогенез митохондрий и антиоксидантную систему клеток, в органах молодых и старых крыс было измерено количество копий мтДНК, которое косвенно отражает количество митохондрий (рис. 4). Было показано, что в мозге и лёгких 27-месячных крыс значительно снижено количество копий мтДНК по

сравнению с 4-месячными крысами. В то же время в почках и сердце старых крыс, напротив, наблюдалось увеличение числа копий мтДНК (рис. 4). В других органах изменения количества мтДНК с возрастом были незначительными. Однако введение БГБ значимо не влияло на количество копий мтДНК ни у молодых, ни у старых крыс.

Старение увеличивает количество масштабных делеций в мтДНК. Известно, что при старении происходит нарушение контроля качества белков и органелл, поэтому в органах молодых и старых крыс было измерено количество масштабных делеций и повреждений мтДНК (рис. 5, 6). Было показано, что при старении в почках и сердце возрастало количество крупных делеций мтДНК, чего не было обнаружено в других органах (рис. 6). В почках старых крыс при этом

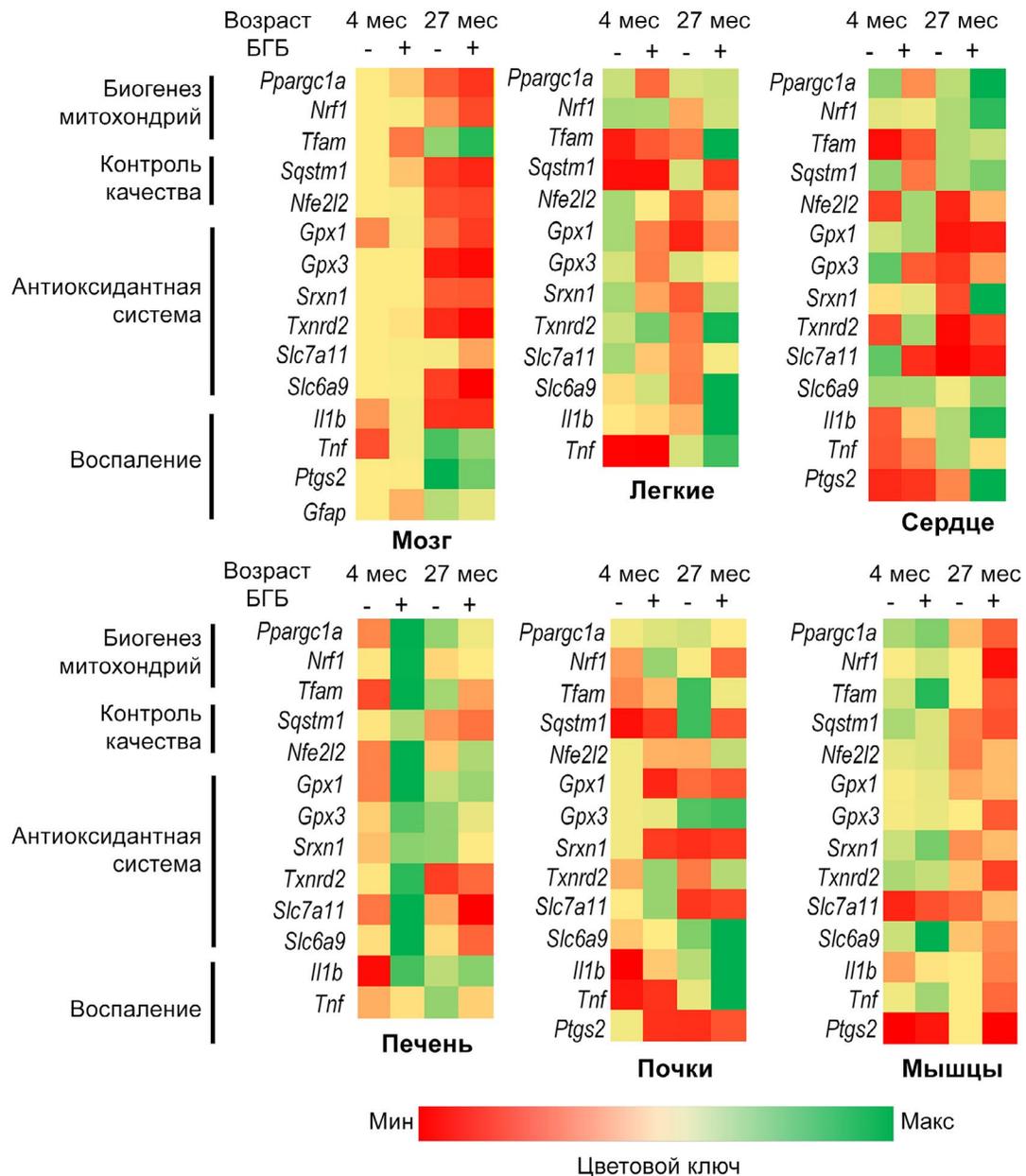


Рис. 3. Тепловые карты, отражающие влияние возраста и подкожных инъекций БГБ на уровень экспрессии генов в мозге, лёгких, сердце, печени, почках и мышцах крыс

происходило увеличение количества мелких повреждений мтДНК на 53% по сравнению с молодыми 4-месячными крысами (рис. 5). Введение БГБ не влияло на количество масштабных делеций мтДНК или уровень повреждений мтДНК ни у молодых, ни у старых животных (рис. 5, 6).

Влияние старения и введения БГБ на уровень окислительного стресса в тканях органов. Так как старение негативным образом влияло на экспрессию генов, продукты которых поддерживают функциональность антиоксидантной системы клеток, а введение БГБ, наоборот, усиливало экспрессию этих генов (по крайней мере, в ткани печени и мышц у молодых животных), были

измерены параметры окислительного стресса в органах молодых и старых животных. В качестве маркера окислительного стресса использовали содержание ТБКРС в тканях крыс. Мы обнаружили, что в мышцах у 27-месячных крыс количество ТБКРС более чем в 2 раза превышало аналогичный показатель у 4-месячных крыс (рис. 7). Содержание ТБКРС возрастало и в почках старых крыс, тогда как введение БГБ значительно снижало их уровень (рис. 7). Мы оценили также и уровень GSH, который снижался почти в 4 раза в лёгких старых крыс по сравнению с молодыми (рис. 8). Тем не менее введение БГБ не повышало уровень GSH в органах ни молодых, ни старых крыс.

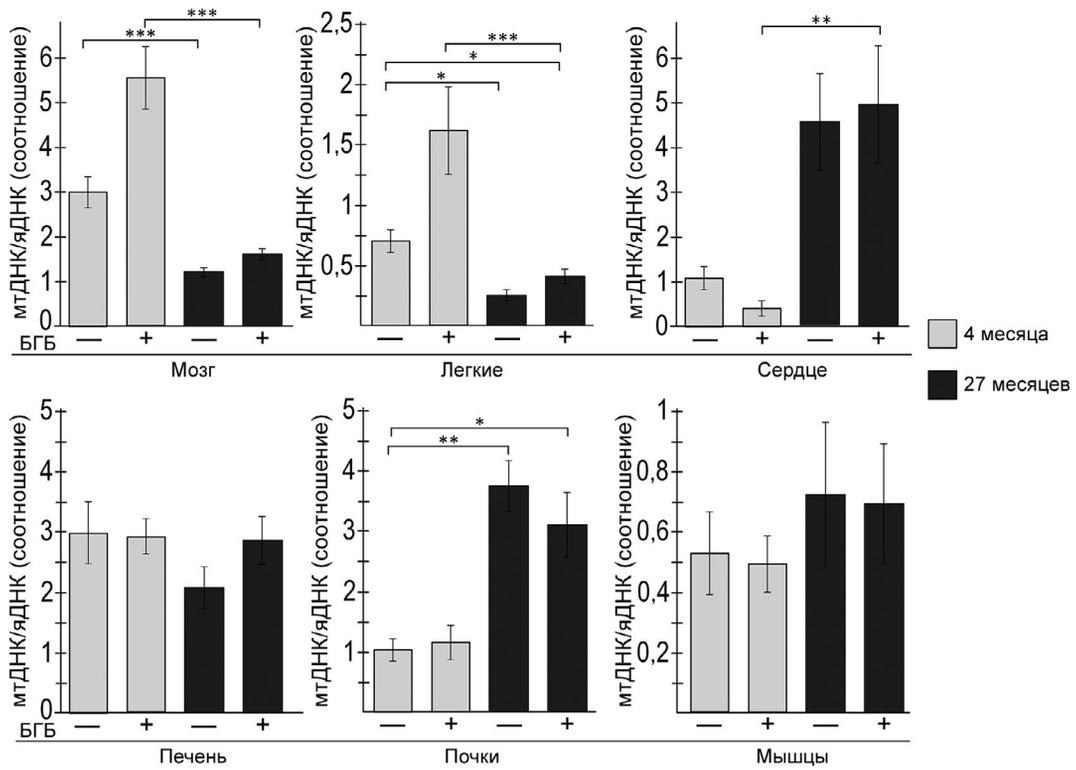


Рис. 4. Влияние подкожных инъекций БГБ на количество копий мтДНК в разных тканях крыс разного возраста. яДНК – ядерная ДНК. Результаты представлены в виде средних значений ± ошибка среднего. Достоверность различий между группами: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (критерий Краскела–Уоллиса)

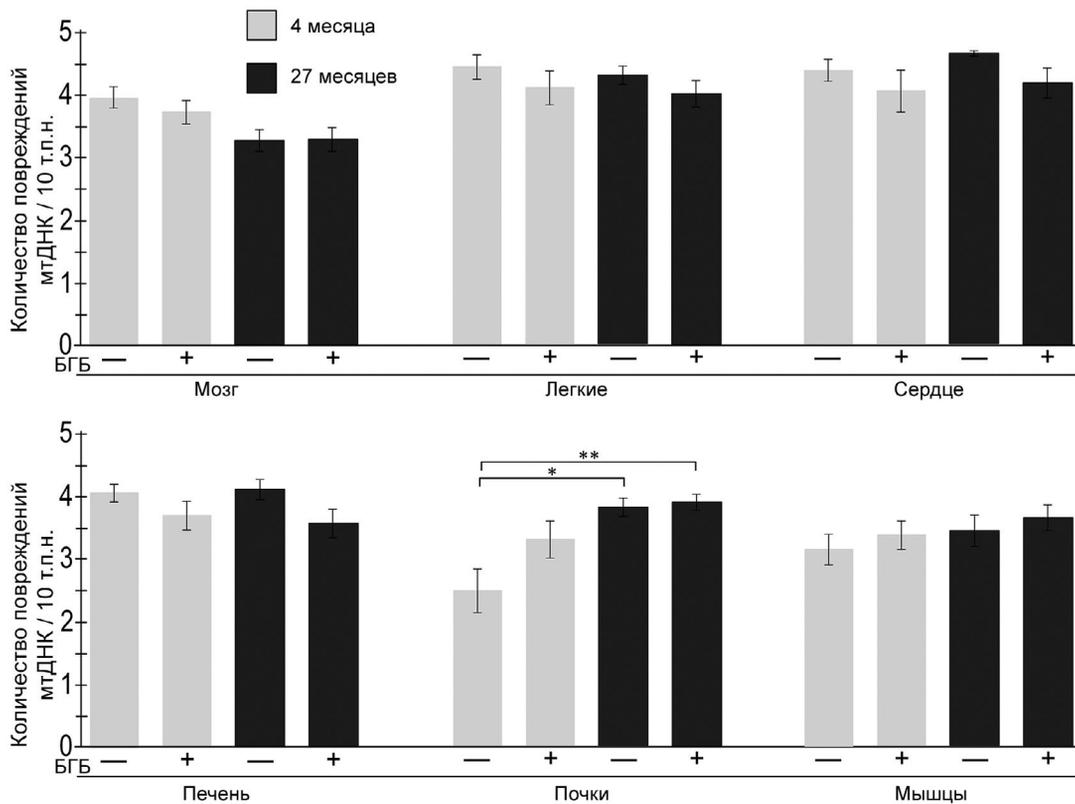


Рис. 5. Влияние подкожных инъекций БГБ на количество повреждений мтДНК в разных тканях крыс разного возраста. Результаты представлены в виде средних значений ± ошибка среднего. Достоверность различий с контрольной группой 4-месячных крыс: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (критерий Краскела–Уоллиса)

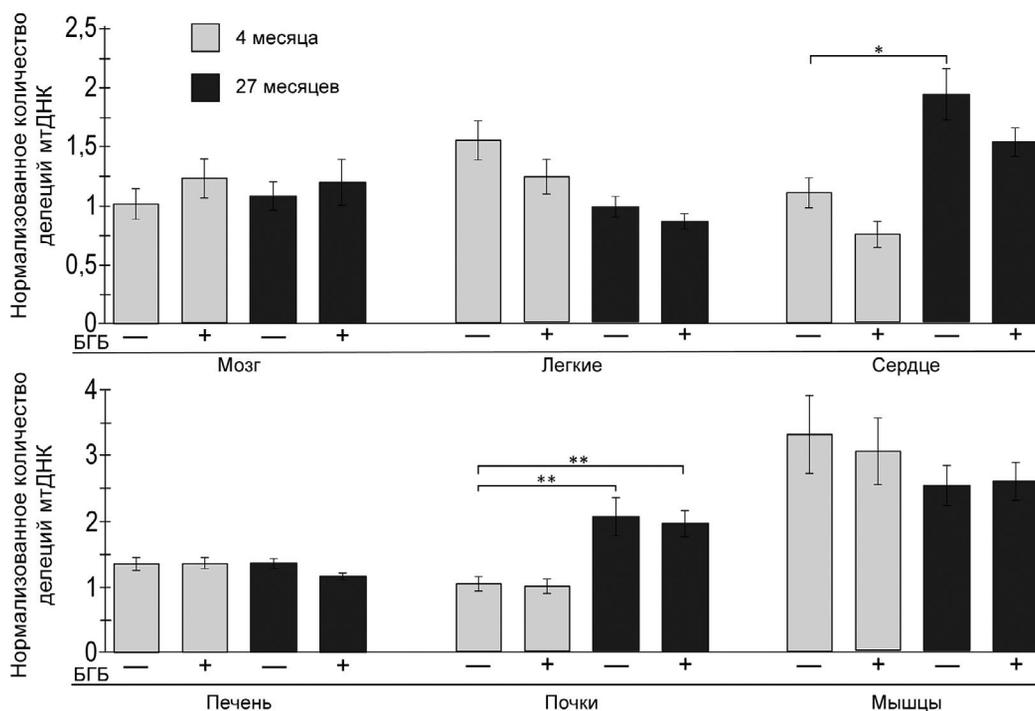


Рис. 6. Влияние подкожных инъекций БГБ на число масштабных делеций мтДНК в разных тканях крыс разного возраста. Результаты представлены в виде средних значений \pm ошибка среднего. Достоверность различий между группами: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (критерий Краскела-Уоллиса)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Старение большинством исследователей определяется как необратимый комплексный процесс, при котором происходят эпигенетические изменения [24], потеря белкового гомеостаза [25], метаболические нарушения [26], а также развивается митохондриальная дисфункция [27]. Согласно свободнорадикальной теории старения, с возрастом в митохондриях возникает дисбаланс между скоростью продукции и удаления АФК, которые вызывают окислительные повреждения различных клеточных макромолекул. Повреждение митохондрий приводит к ещё большему нарушению регуляции редокс-гомеостаза и возникновению порочного круга усиления окислительного стресса [28].

Старение может по-разному проявляться в разных тканях организма, в частности, показано, что паттерны изменения экспрессии генов с возрастом различаются в зависимости от органа [29]. В данной работе мы выявили, что старение больше всего влияло на экспрессию анализируемых генов в мышцах, мозге и лёгких и затрагивало ферменты биогенеза митохондрий, контроля качества и антиоксидантной системы (рис. 1, 3). Негативные изменения, происходящие при старении, были ассоциированы в некоторых органах с повышением окислительного стресса (рис. 7, 8) и экспрессии провоспалительных цитокинов (рис. 1, 3).

Одной из характеристик старения является изменение в клетках органов количества и функциональной активности митохондрий, что может напрямую влиять на энергетическую обеспеченность клеток [30]. Мы показали, что изменение количества митохондрий с возрастом варьирует от органа к органу, например, в мозге и лёгких количество мтДНК значительно снижалось (рис. 4), что было ассоциировано со снижением экспрессии маркеров генов, которые связаны с регуляцией митохондриального биогенеза (рис. 1, 3). В то же время мы выявили, что количество копий мтДНК в почках и сердце росло при старении (рис. 4), что может являться адаптивной реакцией данных органов на увеличение количества молекул мтДНК с делециями. Нарушение структурной целостности митохондриального генома может приводить к нарушению энергетического метаболизма клеток, по этой причине активируются сигнальные пути, направленные на увеличение интенсивности митохондриального биогенеза [31]. Действительно, в данной работе мы обнаружили возрастное увеличение экспрессии генов *Tfam* и *Nrf1* в сердце и почках (рис. 3).

Для поддержания эффективного энергетического метаболизма необходимо сохранение в клетках стабильной мтДНК. Митохондриальный геном не обладает достаточно эффективной системой репарации некоторых типов повреждений,

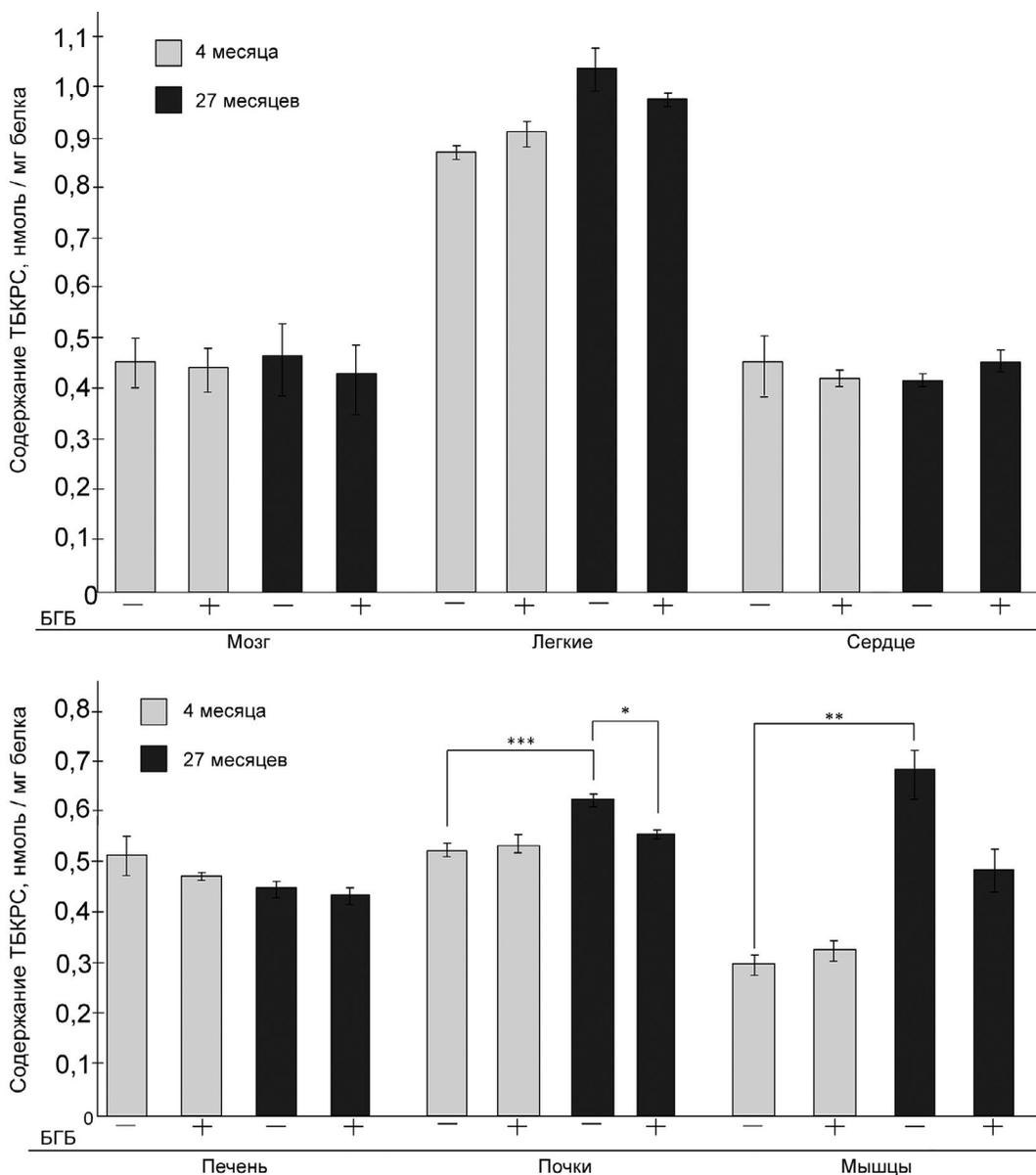


Рис. 7. Влияние подкожных инъекций БГБ на содержание ТБКРС в разных тканях крыс разного возраста. Результаты представлены в виде средних значений \pm ошибки среднего. Достоверность различий между группами: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (критерий Краскела-Уоллиса)

что делает его более восприимчивым к внешним и внутренним стрессорным факторам по сравнению с ядерным геномом [32]. Частота возникновения делеций в тканях увеличивается с возрастом, и наиболее часто данные изменения наблюдаются в тканях с высоким потреблением энергии [33]. Увеличение количества масштабных делеций может приводить к возрастной деградации тканей, так как при этом удаляются важные части кодирующих последовательностей, что приводит к неправильной сборке дыхательной цепи [34]. В данном исследовании мы показали, что наиболее чувствительным органом, в котором с возрастом накапливается больше всего масштабных делеций и повреждений мтДНК, являются почки

(рис. 5, 6). Почка является органом, богатым митохондриями, наличие мутаций и повреждений мтДНК вносит важный вклад в развитие хронических и острых почечных болезней [35].

При этом стоит отметить, что возрастное увеличение количества крупных делеций было выражено ярче, чем возрастное увеличение количества мелких повреждений мтДНК (рис. 5, 6). Это может быть связано с тем, что используемый в нашей работе подход, ПЦР длинных фрагментов, позволяет детектировать такие повреждения, как разрывы цепей, модификации оснований, апуриновые сайты [36]. Известно, что модифицированные основания и нуклеотиды в мтДНК могут подвергаться репарации, так как в мито-

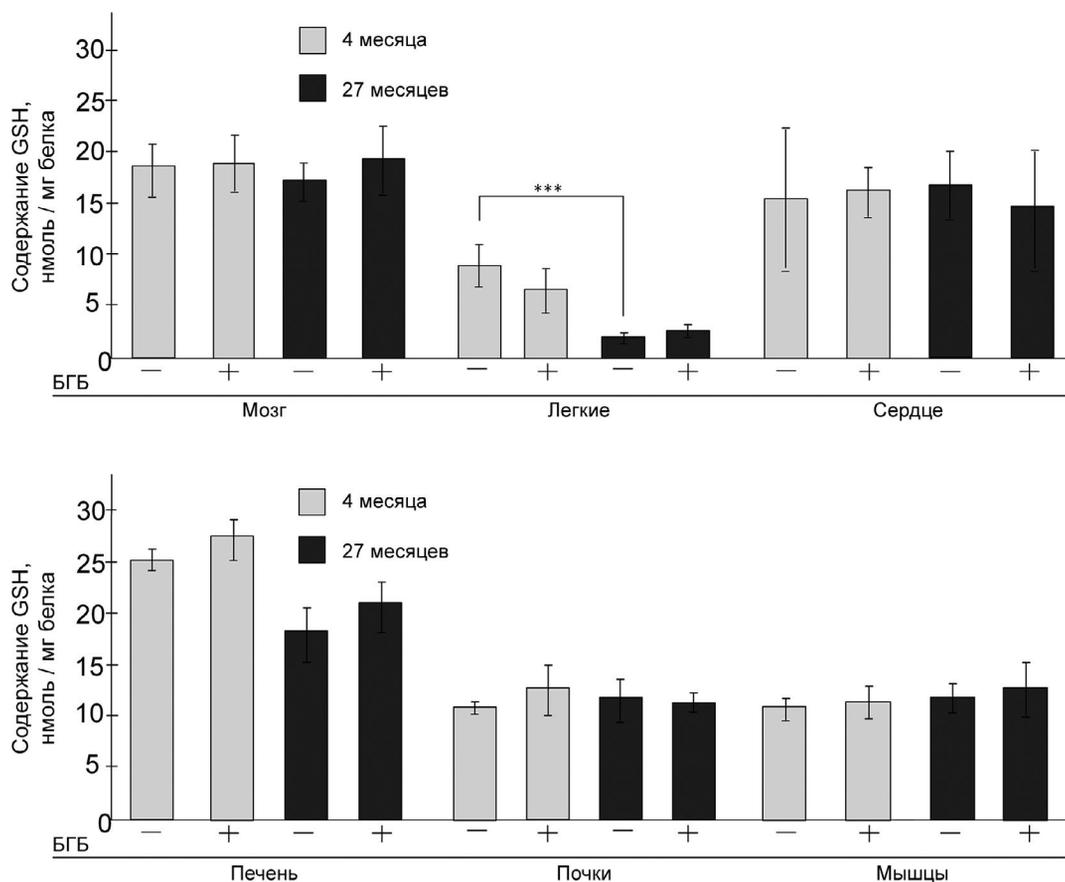


Рис. 8. Влияние подкожных инъекций БГБ на содержание восстановленного глутатиона в разных тканях молодых и старых крыс. Результаты представлены в виде средних значений \pm ошибка среднего. Достоверность различий между группами: *** $p < 0,001$ (критерий Краскела–Уоллиса)

хондриях имеются соответствующие системы эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов (BER и NER соответственно). Репарационные системы разрывов цепей, в первую очередь двуцепочечных разрывов, в митохондриях практически не представлены [37]. Большая часть молекул мтДНК, имеющих двуцепочечные разрывы, элиминируется. Однако именно двуцепочечные разрывы считаются одной из основных причин возникновения делеций мтДНК [38]. Молекулы, содержащие делеции, могут реплицироваться и накапливаться в течение всей жизни организма и даже наследоваться по материнской линии [39], тогда как молекулы с повреждениями, которые мы детектировали с помощью ПЦР длинных фрагментов, подвергаются либо репарации, либо деградации. Это может объяснить, почему точечные повреждения мтДНК в меньшей степени, чем делеции, способны аккумулироваться в клетке с возрастом.

Одним из подходов терапии возрастных заболеваний является воздействие на метаболизм клеток за счёт применения различных диет или их фармакологических миметиков. В частности, применение кетоновых тел, уровень которых

повышается при кетогенной диете или ограничении калорийности питания, активно изучается в контексте геропротекторной терапии [40]. Ранее было показано, что введение экзогенного БГБ приводит к глобальным изменениям транскрипции, включая изменения экспрессии генов, кодирующих факторы устойчивости к окислительному стрессу [41].

В данной работе мы показали, что БГБ по-разному влияет на экспрессию генов в разных органах, и его эффекты на молодых и старых крысах существенно отличаются. Мы продемонстрировали, что среди проанализированных органов наиболее широкий спектр изменений экспрессии при терапии БГБ наблюдался в печени молодых крыс (рис. 3), несмотря на то что печень синтезирует кетоновые тела, но не способна их метаболизировать [42]. БГБ увеличивал в печени экспрессию генов, участвующих в биогенезе митохондрий, а также ферментов антиоксидантной системы клеток (рис. 3). Биогенез митохондрий и митофагия поддерживают в клетках необходимое количество митохондрий и контролируют их качество [43, 44]. В связи с этим активация биогенеза митохондрий всегда должна сопровождаться

адекватной элиминацией повреждённых и неправильно функционирующих органелл [45].

Выраженное влияние БГБ на печень может быть связано с тем, что печень является основным источником эндогенного БГБ [46], и в условиях введения экзогенного БГБ наибольшие концентрации этого кетонного тела могут достигаться именно в печени. Действие БГБ в печени может реализоваться через β -гидроксибутирирование гистонов [47], влияющих на экспрессию генов, а также за счёт сигнального действия через рецептор HCAR2. В частности, ранее показано, что именно за счёт воздействия на HCAR2 БГБ ингибирует воспаление, опосредованное NLRP3-инфламмосомой, а также обладает гепатопротекторным действием [48]. За счёт сигнализации через HCAR2 БГБ активирует AMPK, что потенциально может улучшать метаболические функции, нарушенные при жировой дистрофии печени [49]. Ещё одним механизмом может быть ингибирование гистоновых деацетилаз (HDAC) класса I. HDAC1 деацетируют остатки лизина в гистоновых и негистоновых белках, регулируя работу генов, участвующих в глюконеогенезе, функционировании митохондрий и защите от окислительного стресса [50]. Известно, что ингибирование гистоновых деацетилаз блокирует протеосомальную деградацию Nrf2 и тем самым способствует его связыванию с промоторными зонами генов, отвечающих за антиоксидантную защиту [51]. Кроме того, БГБ может ингибировать гликогенсинтазу 3 β (GSK3 β), которая также является негативным регулятором Nrf2 [52]. Ранее нами было продемонстрировано, что лечение фокального ишемического инсульта с помощью БГБ способствует увеличению экспрессии некоторых ключевых антиоксидантных генов по Nrf2-зависимому механизму [53]. Таким образом, обнаруженное в данном исследовании увеличение экспрессии антиоксидантных генов на фоне терапии кетонными телами может быть связано с активацией Nrf2/ARE-сигнального пути. На это может указывать и увеличение экспрессии гена *Nfe2l2* в печени и сердце крыс, получавших инъекции БГБ (рис. 2, 3), так как известно, что в промоторной зоне гена *Nrf2* имеются ARE-последовательности [54], обеспечивающие самоусиление его экспрессии.

Помимо влияния БГБ на экспрессию, мы показали, что терапия БГБ приводила к снижению содержания продуктов перекисного окисления липидов, повышенного в почках и мышцах старых животных (рис. 7). Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными о том, что введение экзогенного БГБ защищало почки от окислительного стресса, индуцированного цисплатином [55], а кетогенная диета приводила

к позитивным изменениям в мышцах [56]. Значительного действия на уровень ТБКРС в других органах молодых и старых животных БГБ не оказывал, хотя существенно влиял на экспрессию генов белков антиоксидантных систем клетки в печени и мышцах молодых крыс (рис. 2, 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данном исследовании мы показали, что эффект терапии БГБ отличается в разных органах, а также по-разному проявляется у животных в зависимости от возраста. Мы выявили, что БГБ оказывает выраженное влияние на экспрессию генов, ответственных за биогенез митохондрий и антиоксидантную систему клеток, прежде всего в печени и мышцах молодых, но не старых крыс. Стимулирование процессов митохондриального биогенеза может запускать процесс обновления митохондрий в тканях и за счёт этого улучшать их функционирование, приводя к снижению окислительного стресса. Несмотря на положительные эффекты БГБ, не было продемонстрировано его существенного влияния на целостность мтДНК ни у молодых, ни у старых животных. Мы предполагаем, что для более выраженного действия БГБ на целостность мтДНК, окислительный стресс и воспаление необходимо использование более длительной терапии. Полученные в работе данные расширяют представление о кетонных телах как потенциальных терапевтических соединениях, в том числе подходящих для лечения возрастных заболеваний.

Вклад авторов. Е.Ю. Плотников – концепция и руководство работой; В.В. Нестерова, П.И. Бабенкова, Н.А. Самойлова, И.С. Садовникова, Д.С. Семенович, А.А. Брезгунова, Н.В. Андрианова – проведение экспериментов; Н.В. Андрианова, А.П. Гуреев, Е.Ю. Плотников – обсуждение результатов исследования; В.В. Нестерова, Н.В. Андрианова, А.П. Гуреев – написание текста; Е.Ю. Плотников – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-30009).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Протоколы работы с животными были рассмотрены и одобрены этическим комитетом НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 006-1/1/2024). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с руководствами ARRIVE.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Son, J. M., and Lee, C. (2019) Mitochondria: multifaceted regulators of aging, *BMB Rep.*, **52**, 13-23, <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.1.300>.
2. Harrington, J. S., Ryter, S. W., Plataki, M., Price, D. R., Choi, A. M. K. (2023) Mitochondria in health, disease, and aging, *Physiol. Rev.*, **103**, 2349-2422, <https://doi.org/10.1152/physrev.00058.2021>.
3. Whitehall, J. C., Smith, A. L. M., and Greaves, L. C. (2023) Mitochondrial DNA mutations and ageing, *Subcell. Biochem.*, **102**, 77-98, https://doi.org/10.1007/978-3-031-21410-3_4.
4. Nissanka, N., and Moraes, C. T. (2018) Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease, *FEBS Lett.*, **592**, 728-742, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12956>.
5. Иванникова, Е. В., Алташина, М. А., Трошина, Е. А. (2021) Кетогенная диета: история возникновения, механизм действия, показания, *Пробл. эндокринолог.*, **68**, 49-72, <https://doi.org/10.14341/probl12724>.
6. Kumar, A., Kumari, S., and Singh, D. (2022) Insights into the cellular interactions and molecular mechanisms of ketogenic diet for comprehensive management of epilepsy, *Curr. Neuropharmacol.*, **20**, 2034-2049, <https://doi.org/10.2174/1570159X20666220420130109>.
7. Shippy, D. C., Wilhelm, C., Viharkumar, P. A., Raife, T. J., and Ulland, T. K. (2020) β -Hydroxybutyrate inhibits inflammasome activation to attenuate Alzheimer's disease pathology, *J. Neuroinflammation*, **17**, 280, <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01948-5>.
8. Norwitz, N. G., Hu, M. T., and Clarke, K. (2019) The mechanisms by which the ketone body D- β -hydroxybutyrate may improve the multiple cellular pathologies of Parkinson's disease, *Front. Nutr.*, **6**, 63, <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00063>.
9. Wei, S., Binbin, L., Yuan, W., Zhong, Z., Donghai, L., and Caihua, H. (2022) β -Hydroxybutyrate in cardiovascular diseases: a minor metabolite of great expectations, *Front. Mol. Biosci.*, **13**, 823602, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.823602>.
10. Li, Y., Zhang, X., Ma, A., and Kang, Y. (2021) Rational application of β -hydroxybutyrate attenuates ischemic stroke by suppressing oxidative stress and mitochondrial-dependent apoptosis via activation of the Erk/CREB/eNOS pathway, *ACS Chem. Neurosci.*, **12**, 1219-1227, <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00046>.
11. Rojas-Morales, P., Pedraza-Chaverri, J., and Tapia, E. (2020) Ketone bodies, stress response, and redox homeostasis, *Redox Biol.*, **29**, 101395, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101395>.
12. Jin, L. W., Lucente, J. D., Mendiola, U. R., Suthprasertporn, N., Tomilov, A., Cortopassi, G., Kim, K., Ramsey, J. J., and Maezawa, I. (2023) The ketone body β -hydroxybutyrate shifts microglial metabolism and suppresses amyloid- β oligomer-induced inflammation in human microglia, *FASEB J.*, **37**, e23261, <https://doi.org/10.1096/fj.202301254R>.
13. Newman, J. C., and Verdin, E. (2017) β -Hydroxybutyrate: a signaling metabolite, *Annu. Rev. Nutr.*, **37**, 51-76, <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064916>.
14. Goshtasbi, H., Pakchin, P. S., Movafeghi, A., Barar, J., Castejon, A. M., Omidian, H., and Omid, Y. (2022) Impacts of oxidants and antioxidants on the emergence and progression of Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.*, **153**, 105268, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105268>.
15. Kim, D. H., Park, M. H., Ha, S., Bang, E. J., Lee, Y., Lee, A. K., Lee, J., Yu, B. P., and Chung, H. Y. (2019) Anti-inflammatory action of β -hydroxybutyrate via modulation of PGC-1 α and FoxO1, mimicking calorie restriction, *Aging (Albany NY)*, **11**, 1283-1304, <https://doi.org/10.18632/aging.101838>.
16. Shi, X., Li, X., Li, D., Li, Y., Song, Y., Deng, Q., Wang, J., Zhang, Y., Ding, H., Yin, L., Zhang, Y., Wang, Z., Li, X., and Liu, G. (2014) β -Hydroxybutyrate activates the NF- κ B signaling pathway to promote the expression of pro-inflammatory factors in calf hepatocytes, *Cell Physiol. Biochem.*, **33**, 920-932, <https://doi.org/10.1159/000358664>.
17. Martins, R., Lithgow, G. J., and Link, W. (2016) Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity, *Aging Cell.*, **15**, 196-207, <https://doi.org/10.1111/accel.12427>.
18. Gureev, A. P., Shaforostova, E. A., and Popov, V. N. (2019) Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways, *Front. Genet.*, **14**, 435, <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00435>.
19. Loshchenova, P. S., Sinitsyna, O. I., Fedoseeva, L. A., Stefanova, N. A., and Kolosova, N. G. (2015) Influence of antioxidant SkQ1 on accumulation of mitochondrial DNA deletions in the hippocampus of senescence-accelerated OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 596-603, <https://doi.org/10.1134/S0006297915050120>.
20. Gureev, A. P., Andrianova, N. V., Pevzner, I. B., Zorova, L. D., Chernyshova, E. V., Sadovnikova, I. S., Chistyakov, D. V., Popkov, V. A., Semenov, D. S., Babenko, V. A., Silachev, D. N., Zorov, D. B., Plotnikov, E. Y., and Popov, V. N. (2022) Dietary restriction modulates mitochondrial DNA damage and oxylipin profile in aged rats, *FEBS J.*, **289**, 5697-5713, <https://doi.org/10.1111/febs.16451>.

21. Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
22. Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2).
23. Patsoukis, N., and Georgiou, C. D. (2004) Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1783-1792, <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2525-1>.
24. Pal, S., and Tyler, J. K. (2016) Epigenetics and aging, *Sci. Adv.*, **2**, e1600584, <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600584>.
25. Hoppe, T., and Cohen, E. (2020) Organismal protein homeostasis mechanisms, *Genetics*, **215**, 889-901, <https://doi.org/10.1534/genetics.120.301283>.
26. Gregory, J. W. (2009) Metabolic disorders, *Endocr. Dev.*, **15**, 59-76, <https://doi.org/10.1159/000207610>.
27. Lin, M. T., and Beal, M. F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature*, **443**, 787-795, <https://doi.org/10.1038/nature05292>.
28. Zorov, D. B., Isaev, N. K., Plotnikov, E. Y., Zorova, L. D., Stelmashook, E. V., Vasileva, A. K., Arkhangelskaya, A. A., and Khrjapenkova, T. G. (2007) The mitochondrion as Janus Bifrons, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1115-1126, <https://doi.org/10.1134/s0006297907100094>.
29. Schaum, N., Lehallier, B., Hahn, O., Pálovics, R., Hosseinzadeh, S., Lee, S. E., Sit, R., Lee, D. P., Losada, P. M., Zardeneta, M. E., Fehlmann, T., and Webber, J. T. (2020) Ageing hallmarks exhibit organ-specific temporal signatures, *Nature*, **583**, 596-602, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2499-y>.
30. Lima, T., Li, T. Y., Mottis, A., and Auwerx, J. (2022) Pleiotropic effects of mitochondria in aging, *Nat. Aging.*, **2**, 199-213, <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00191-2>.
31. Masuyama, M., Iida, R., Takatsuka, H., Yasuda, T., and Matsuki, T. (2005) Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1723**, 302-308, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.03.001>.
32. Sharma, P., and Sampath, H. (2019) Mitochondrial DNA integrity: role in health and disease, *Cells*, **8**, 100, <https://doi.org/10.3390/cells8020100>.
33. Gadaleta, M. N., Rainaldi, G., Lezza, A. M., Milella, F., Fracasso, F., and Cantatore, P. (1992) Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats, *Mutat. Res.*, **275**, 181-193, [https://doi.org/10.1016/0921-8734\(92\)90022-h](https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90022-h).
34. Bank, C., Soulimane, T., Schröder, J. M., Buse, G., and Zanssen, S. (2000) Multiple deletions of mtDNA remove the light strand origin of replication, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, 595-601, <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3951>.
35. Feng, J., Chen, Z., Liang, W., Wei, Z., and Ding, G. (2022) Roles of mitochondrial DNA damage in kidney diseases: a new biomarker, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 15166, <https://doi.org/10.3390/ijms232315166>.
36. Edwards, J. G. (2009) Quantification of mitochondrial DNA (mtDNA) damage and error rates by real-time QPCR, *Mitochondrion*, **9**, 31-35, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2008.11.004>.
37. Zinovkina, L. A. (2018) Mechanisms of mitochondrial DNA repair in mammals, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 233-249, <https://doi.org/10.1134/S0006297918030045>.
38. Nissanka, N., Minczuk, M., and Moraes, C. T. (2019) Mechanisms of mitochondrial DNA deletion formation, *Trends Genet.*, **35**, 235-244, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.01.001>.
39. Yan, C., Duanmu, X., Zeng, L., Liu, B., and Song, Z. (2019) Mitochondrial DNA: distribution, mutations, and elimination, *Cells*, **8**, 379, <https://doi.org/10.3390/cells8040379>.
40. Wang, L., Chen, P., and Xiao, W. (2021) β -Hydroxybutyrate as an anti-aging metabolite, *Nutrients*, **13**, 3420, <https://doi.org/10.3390/nu13103420>.
41. Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Moan, N. L., Grueter, C. A., Lim, H., Saunders, L. R., Stevens, R. D., Newgard, C. B., Farese, R. V., Cabo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K., and Verdin, E. (2013) Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor, *Science*, **339**, 211-214, <https://doi.org/10.1126/science.1227166>.
42. Makievskaya, C. I., Popkov, V. A., Andrianova, N. V., Liao, X., Zorov, D. B., and Plotnikov, E. Y. (2023) Ketogenic diet and ketone bodies against ischemic injury: targets, mechanisms, and therapeutic potential, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2576, <https://doi.org/10.3390/ijms24032576>.
43. Jornayvaz, F. R., and Shulman, G. I. (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis, *Essays Biochem.*, **47**, 69-84, <https://doi.org/10.1042/bse0470069>.
44. Lu, Y., Li, Z., Zhang, S., Zhang, T., Liu, Y., and Zhang, L. (2023) Cellular mitophagy: Mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation, *Theranostics*, **13**, 736-766, <https://doi.org/10.7150/thno.79876>.
45. Ashrafi, G., and Schwarz, T. L. (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria, *Cell Death Differ.*, **20**, 31-42, <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81>.

46. Newman, J., and Verdin, E. (2017) β -Hydroxybutyrate: a signaling metabolite, *Annu. Rev. Nutr.*, **21**, 51-76, <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064916>.
47. Koronowski, K. B., Greco, C. M., Huang, H., Kim, J., Fribourgh, J. L., Crosby, P., Mathur, L., Ren, X., Partch, C. L., Jang, C., Qiao, F., Zhao, Y., and Sassone-Corsi, P. (2021) Ketogenesis impact on liver metabolism revealed by proteomics of lysine β -hydroxybutyrylation, *Cell Rep.*, **36**, 109487, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109487>.
48. Pan, A., Sun, X., Huang, F., Liu, J., Cai, Y., and Wu, X. (2022) The mitochondrial β -oxidation enzyme HADHA restrains hepatic glucagon response by promoting β -hydroxybutyrate production, *Nat. Commun.*, **13**, 386, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28044-x>.
49. Lee, A. K., Kim, D. H., Bang, E., Choi, Y. J., and Chung, H. Y. (2020) β -Hydroxybutyrate suppresses lipid accumulation in aged liver through GPR109A-mediated signaling, *Aging Dis.*, **11**, 777-790, <https://doi.org/10.14336/AD.2019.0926>.
50. Newman, J. C., and Verdin, E. (2014) β -Hydroxybutyrate: much more than a metabolite, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **106**, 173-181, <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.08.009>.
51. Komaravelli, N., Tian, B., Ivanciuc, T., Mautemps, N., Brasier, A. R., Garofalo, R. P., and Casola, A. (2015) Respiratory syncytial virus infection down-regulates antioxidant enzyme expression by triggering deacetylation-proteasomal degradation of Nrf2, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 391-403, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.043>.
52. Fang, Y., Chen, B., Gong, A. Y., Malhotra, D. K., Gupta, R., Dworkin, L. D., and Gong, R. (2021) The ketone body β -hydroxybutyrate mitigates the senescence response of glomerular podocytes to diabetic insults, *Kidney Int.*, **100**, 1037-1053, <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.06.031>.
53. Gureev, A. P., Sadovnikova, I. S., Chernyshova, E. V., Tsvetkova, A. D., Babenkova, P. I., Nesterova, V. V., Krutskikh, E. P., Volodina, D. E., Samoylova, N. A., Andrianova, N. V., Silachev, D. N., and Plotnikov, E. Y. (2024) Beta-hydroxybutyrate mitigates sensorimotor and cognitive impairments in a photothrombosis-induced ischemic stroke in mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 5710, <https://doi.org/10.3390/ijms25115710>.
54. Kwak, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Kensler, T. W. (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the *nrf2* promoter, *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 2883-2892, <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.2883-2892.2002>.
55. Luo, S., Yang, M., Han, Y., Zhao, H., Jiang, N., Li, L., Chen, W., Li, C., Yang, J., Liu, Y., Liu, C., Zhao, C., and Sun, L. (2022) β -Hydroxybutyrate against Cisplatin-Induced acute kidney injury via inhibiting NLRP3 inflammasome and oxidative stress, *Int. Immunopharmacol.*, **111**, 109101, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109101>.
56. Huang, T., Linden, M. A., Fuller, S. E., Goldsmith, F. R., Simon, J., Batdorf, H. M., Scott, M. C., Essajee, N. M., Brown, J. M., and Noland, R. C. (2021) Combined effects of a ketogenic diet and exercise training alter mitochondrial and peroxisomal substrate oxidative capacity in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **320**, E1053-E1067, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00410.2020>.

DIFFERENCES IN THE EFFECTS OF BETA-HYDROXYBUTYRATE ON MITOCHONDRIA BIOGENESIS, MARKERS OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN YOUNG AND OLD RAT TISSUES

V. V. Nesterova¹, P. I. Babenkova¹, A. A. Brezgunova², N. A. Samoylova¹,
I. S. Sadovnikova¹, D. S. Semenovich², N. V. Andrianova², A. P. Gureev^{1,3},
and E. Y. Plotnikov^{2*}

¹ Voronezh State University, 394018 Voronezh, Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: plotnikov@belozersky.msu.ru

³ Voronezh State University of Engineering Technology, 394036 Voronezh, Russia

One of the therapeutic approaches to age-related diseases is to affect the metabolism of the body's cells through certain diets or their pharmacological mimetics. The ketogenic diet significantly affects the energy metabolism of cells and the functioning of mitochondria, which is being actively studied in various age-related pathologies. In this study, we investigated the effect of the ketogenic diet mimetic beta-hydroxybutyrate (BHB) on the gene expression of proteins regulating mitochondrial biogenesis (*Ppargc1a*, *Nrf1*, *Tfam*), quality control (*Sqstm1*), the work of the antioxidant system (*Nfe2l2*, *Gpx1*, *Gpx3*, *Srxn1*, *Txnr2*, *Slc6a9*, *Slc7a11*), and the inflammatory response (*Il1b*, *Tnf*, *Ptgs2*, *Gfap*) in the brain, lungs, heart, liver, kidneys, and muscles of young and old rats. In addition, we analyzed mitochondrial

DNA (mtDNA) copy number, the accumulation of mtDNA damage, and the level of oxidative stress by the concentration of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), and reduced glutathione level. We showed that aging in a number of organs disrupts mitochondrial biogenesis and the functioning of the cell's antioxidant system, which was accompanied by increased oxidative stress and inflammation. Administration of BHB for 2 weeks had different effects on organs of young and old rats. In particular, BHB increased the expression of genes of proteins associated with mitochondrial biogenesis and the antioxidant system, especially in the liver tissue and muscles of the young but not the old rats. At the same time, BHB contributed to the reduction of TBARS in the kidneys of the old rats. Thus, our study has shown that the administration of ketone bodies can significantly affect gene expression in organs, especially in young rats, by increasing mitochondrial biogenesis, improving the antioxidant system and partially reducing the level of oxidative stress. However, these changes were much less pronounced in old animals.

Keywords: aging, beta-hydroxybutyrate, ketogenic diet, mitochondria, mitochondrial DNA, oxidative stress

Готовятся к публикации следующие специальные выпуски:

Том 89, выпуск 10, 2024

Метаболизм аминокислот в норме и при патологии

Приглашённые редакторы: В.И. Буник, В.С. Покровский

Том 89, выпуск 11, 2024

Молекулярные механизмы расстройств, связанных с употреблением
психоактивных веществ

Приглашённые редакторы: Н.В. Гуляева, Д.И. Перегуд