

ISSN 0320-9725

Том 90, Номер 1

Январь 2025



# БИОХИМИЯ



# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 90, № 1, 2025

---

---

4-Метилумбеллиферон, ингибитор гиалуронан-синтазы, препятствует развитию онкологических, воспалительных, дегенеративных и аутоиммунных заболеваний (обзор) <i>В.В. Федорова, А. Цитрина, Н. Халимани, Ю. В. Котелевцев</i>	3
Пересмотр представлений об эволюционном происхождении, функции и лечении рака (обзор) <i>А.В. Лихтенштейн</i>	22
Портрет трёх бицистронных мРНК млекопитающих, которые происходят из генов <i>ASNSD1</i> , <i>SLC35A4</i> и <i>MIEF1</i> (мини-обзор) <i>Д.Е. Андреев, И.Н. Шатский</i>	35
Энергозависимое нефотохимическое тушение: <i>PsbS</i> , <i>LhcSR</i> и другие игроки (обзор) <i>В.В. Птушенко, А.П. Разживин</i>	48
Колокализация нейротрансмиттеров в гиппокампе и афферентных системах: возможная функциональная роль (обзор) <i>В.Ф. Кичигина</i>	68
Роль $\beta$ - и $\alpha$ -структур мембранных белков в изменении структуры плазмалеммы <i>П.В. Мокрушинков, В.Я. Рудяк</i>	87
Оценка влияния ингибирования киназной активности <i>LRRK2</i> на активность глюкоцербозидазы на пациент-специфичных клетках пациентов с болезнью Гоше <i>Т.С. Усенко, К.С. Башарова, А.И. Безрукова, В.А. Безруких, Г.В. Байдакова, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина</i>	107
Механизмы антиоксидантной защиты частиц липопротеидов низкой плотности от свободнорадикального окисления <i>В.З. Ланкин, К.Б. Шумаев, В.А. Медведева, А.К. Тихазе, Г.Г. Коновалова</i>	117
Определение активности главной протеазы SARS-CoV-2 ( $M^{pro}$ ) путём электроокисления остатка тирозина в модельном пептиде <i>Т.А. Филиппова, Р.А. Масарпех, Т.Е. Фарафонова, Ю.Ю. Худоклинова, В.В. Шумянцева, С.А. Мошковский, А.В. Кузиков</i>	131
Физиологические концентрации кальципротеиновых частиц запускают провоспалительную активацию эндотелиальных клеток и моноцитов <i>Д.К. Шишкова, В.Е. Маркова, Ю.О. Маркова, М.Ю. Синицкий, А.В. Синицкая, В.Г. Матвеева, Е.А. Торгунакова, А.И. Лазебная, А.Д. Степанов, А.Г. Кутухин</i>	144

# CONTENTS

---

---

Vol. 90, Issue 1, 2025

---

---

4-Methylumbellifrone, an Hyaluronan Synthase Inhibitor, Prevents the Development of Oncological, Inflammatory, Degenerative and Autoimmune Disorders (Review)

*V. V. Fedorova, A. Tsitrina, N. Halimani, and Y. V. Kotelevtsev*

3

Rethinking the Evolutionary Origin, Function, and Treatment of Cancer (Review)

*A. V. Lichtenstein*

22

A Portrait of Three Mammalian Bicistronic mRNA Transcripts, Derived from the Genes *ASNSD1*, *SLC35A4*, and *MIEF1* (Mini-Review)

*D. E. Andreev and I. N. Shatsky*

35

Energy Dependent Non-Photoschemical Quenching: PsbS, LhcSR and Other Players (Review)

*V. V. Ptushenko and A. P. Razjivin*

48

Colocalization of Neurotransmitters in the Hippocampus and Afferent Systems: Possible Functional Role (Review)

*V. F. Kitchigina*

68

Role of Membrane Proteins  $\beta$ - and  $\alpha$ -Structures in Plasmalemm Structure Change

*P. V. Mokrushnikov and V. Ya. Rudyak*

87

Evaluation of the Effect of Inhibition of LRRK2 Kinase Activity on Glucocerebrosidase Activity on Patient-Specific Cells from Patients with Gaucher Disease

*T. S. Usenko, K. S. Basharova, A. I. Bezrukova, V. A. Bezrukikh, G. V. Baydakova, E. Y. Zakharova, and S. N. Pchelina*

107

Mechanisms of Antioxidant Protection of Low-Density Lipoprotein Particles Against Free Radical Oxidation

*V. Z. Larkin, K. B. Shumaev, V. A. Medvedeva, A. K. Tikhaze, and G. G. Konovalova*

117

Determination of SARS-CoV-2 Main Protease ( $M^{pro}$ ) Activity Based on Electrooxidation of the Tyrosine Residue of a Model Peptide

*T. A. Filippova, R. A. Masamreh, T. E. Farafonova, Yu. Yu. Khudoklinova, V. V. Shumyantseva, S. A. Moshkovskii, and A. V. Kuzikov*

131

Physiological Concentrations of Calciprotein Particles Trigger Activation and Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Monocytes

*D. K. Shishkova, V. E. Markova, Y. O. Markova, M. Yu. Sinitsky, A. V. Sinitskaya, V. G. Matveeva, E. A. Torgunakova, A. I. Lazebnaya, A. D. Stepanov, and A. G. Kutikhin*

144

## 4-МЕТИЛУМБЕЛЛИФЕРОН, ИНГИБИТОР ГИАЛУРОНАН-СИНТАЗЫ, ПРЕПЯТСТВУЕТ РАЗВИТИЮ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ, ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ, ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ И АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

### Обзор

© 2025 В.В. Федорова<sup>1</sup>, А. Цитрина<sup>2</sup>, Н. Халимани<sup>1</sup>, Ю. В. Котелевцев<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Сколковский институт науки и технологий,  
121205 Москва, Россия; электронная почта: y.kotelevtsev@skoltech.ru

<sup>2</sup> Университет имени Давида Бен-Гуриона в Негеве, 8410501 Беэр-Шева, Израиль

Поступила в редакцию 24.09.2024

После доработки 24.11.2024

Принята к публикации 08.12.2024

Гиалуроновая кислота (ГК) является основным структурообразующим полимером внеклеточного матрикса. Метаболизм ГК играет важную роль в межклеточном взаимодействии в норме и при различных патологиях. Синтез ГК осуществляется гиалуронан-синтазами (HAS), представленными у млекопитающих тремя высокогомологичными изоформами HAS1, HAS2 и HAS3. До настоящего времени не описано высокоспецифичных конкурентных ингибиторов HAS. Наиболее широко применяется для ингибирования синтеза ГК *in vivo* и в культуре клеток 4-метилумбеллиферон (4-МУ), природное соединение кумаринового ряда. Обзор посвящен рассмотрению молекулярных основ терапевтического действия 4-МУ. Будут рассмотрены многочисленные эксперименты на культурах тканей, животных моделях заболеваний и первые клинические исследования с применением 4-МУ, доказывающие, что, наряду со многими рецепторами и транскрипционными факторами, основной фармакологической мишенью этого соединения является наиболее распространенная изоформа гиалуронан-синтазы HAS2, и именно с ингибированием синтеза ГК связаны фармакологические эффекты 4-МУ в онкологических, аутоиммунных, дегенеративных и гиперкомпенсированных регенеративных процессах (фиброз, образование шрамов). Новые клинические препараты на основе более специфичных ингибиторов HAS2 будут первыми в классе для лечения широкого ряда заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** 4-метилумбеллиферон, одестон, гимекромон, ингибирование гиалуронан-синтазы, гиалуроновая кислота.

DOI: 10.31857/S0320972525010017 EDN: CREXLL

«Самая плодотворная основа для открытия нового лекарства – начать со старого лекарства»  
Сэр Джеймс Блэк, лауреат Нобелевской премии 1988 года в области медицины

### ВВЕДЕНИЕ

В постгеномную эру создание новых терапевтических препаратов опирается на детальное знание сигнальных путей и участвующих в них ключевых эффекторов, или фармакологических мишеней: ферментов, рецепторов, транскрипционных факторов. При этом по-прежнему важную

роль в выявлении и валидации фармакологических мишеней играют физиологически активные вещества. К настоящему времени накопилось большое количество экспериментальных данных, подтверждающих терапевтическое действие 4-метилумбеллиферон (4-МУ), природного соединения кумаринового ряда, в животных моделях онкологических, аутоиммунных, дегенеративных

Принятые сокращения: ГК – гиалуроновая кислота; ВКМ – внеклеточный матрикс; 4-МУ – 4-метилумбеллиферон; 4-МУГ – 4-метилумбеллиферон-бета-Д-глюкуронид; HAS – гиалуронан-синтаза.

\* Адресат для корреспонденции.

и гиперпролиферативных заболеваний. Данный обзор посвящен валидации гиалуронан-синтазы как главной фармакологической мишени 4-МУ, что является необходимым этапом при создании новых в классе лекарственных препаратов – ингибиторов синтеза гиалуроновой кислоты (ГК).

## РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Внеклеточный матрикс (ВКМ), составляющий основу соединительной ткани, является высокоорганизованной внеклеточной структурой, обеспечивающей механическую целостность и межклеточное взаимодействие.

ВКМ состоит из полимерных углеводов – гликозаминогликанов (ГАГ) и различных белков (в основном фибриллярных) и протеогликанов (ПГ). ВКМ является одновременно барьером и депо для пептидных гормонов и цитокинов. Он также непосредственно генерирует химические и механические сигналы, необходимые для поддержания гомеостаза тканей. Патологические процессы при ряде системных заболеваний приводят к перестройке ВКМ, изменениям в его структуре, что в конечном итоге способствует изменению тканевой архитектуры и способствует развитию таких заболеваний, как фиброз, остеоартрит и рак [1, 2].

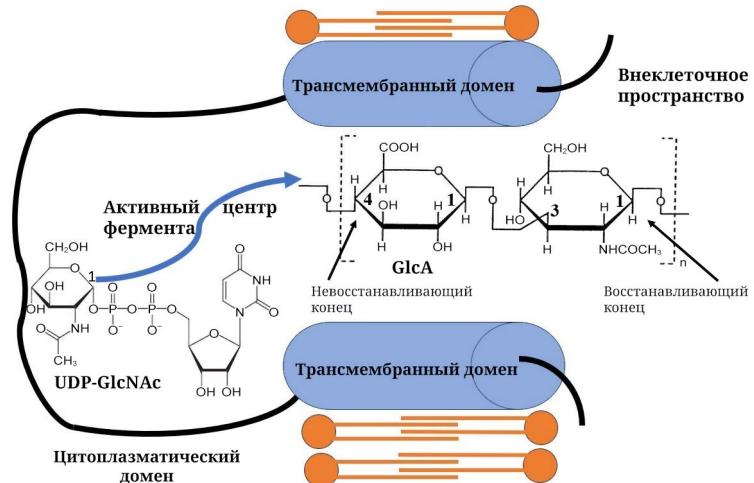
ГК, полимер, состоящий из остатков D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюказамина, соединенных поочередно  $\beta$ -1,4- и  $\beta$ -1,3-гликозидными связями; он является основным по массе компонентом внеклеточного матрикса. Гомеостаз ГК поддерживается синтетической активностью гиалуронан-синтаз (HAS) и распадом под действием гиалуронидаз и химической деградации в основном под действием активных форм кислорода. Известны три изоформы фермента гиалуронан-синтазы: HAS1, активная в эмбриогенезе; HAS2, основная изоформа как в эмбриогенезе, так и в большинстве тканей в постнатальном периоде, синтезирующая высокомолекулярные формы (ВМФ) размером 1000–6000 кДа; HAS3, синтезирующая низкомолекулярные формы ГК (НМФ), менее 250 кДа. ГК с высокой молекулярной массой обычно ассоциируется с противовоспалительными, антиангидогенными и противораковыми свойствами. Напротив, низкомолекулярные фракции ГК проявляют провоспалительные и проангидогенные эффекты и способствуют клеточной адгезии. Хотя эти свойства ГК общепризнаны, механизмы, лежащие в их основе, не полностью понятны и остаются предметом исследований [3].

Кроме того, в организме человека существуют различные типы гиалуронидаз, расщепляющих ГК. Наиболее подробно охарактеризованы

ми являются HYAL-1 и HYAL-2. HYAL-2 расщепляет ГК на фрагменты длиной приблизительно в 50 мономеров ( $\approx$ 20 кДа), в то время как HYAL-1 расщепляет ГК на тетрасахаридные фрагменты ( $\approx$ 1600 Да), которые впоследствии подвергаются дальнейшему разложению в лизосомах [4]. Патологические процессы, такие как нарушение метаболических путей ГК, рак, повреждение и воспаление тканей, могут изменить этот баланс, увеличивая концентрацию НМФ ГК. Существует множество убедительных доказательств вовлечения ГК в патологические процессы развития хронического воспаления, свойственного таким заболеваниям, как диабет 2-го типа, цирроз печени, астма, а также в процессы прогрессии и метастазирования рака. Так, ГК увеличивает адгезию и подвижность метастазирующих клеток меланомы [5], увеличивает подвижность клеток рака поджелудочной железы [6] и простаты [7], затрудняет доставку лекарств к опухолям [8–10], способствует развитию устойчивости к лекарствам [11], усиливает клеточное деление [12] и действует как фактор регуляции иммунитета [13]. Увеличение экспрессии ГК в строме опухоли является негативным прогностическим признаком [14–18].

Уровень ГК в крови является маркером фиброза печени. Синтез ГК в фиброзной печени осуществляется фибробластами, происходящими из активированных звездчатых клеток. В норме звездчатые клетки не экспрессируют основной фермент, производящий ГК во взрослых тканях, гиалуронан-синтазы 2-го типа (HAS2), и не синтезируют ГК, но поражение печени приводит к выработке TGF- $\beta$ , запускающего трансдифференциацию звездчатых клеток в миофибробласти и драматически увеличивающего экспрессию HAS2 в них [19]. Накопление ГК в паренхиме вызывает активацию Notch1-сигнального пути в звездчатых клетках, что приводит к их активации, повышенному синтезу межклеточного матрикса и развитию фиброза [20]. Таким образом, HAS2 и HAS3 являются важной фармакологической мишенью в терапии заболеваний, связанных с патологической активацией синтеза ГК, в частности, фиброза печени.

Молекулярные механизмы синтеза ГК гиалуронан-синтазами млекопитающих приобретают важное значение в связи с целенаправленным поиском специфических ингибиторов – потенциальных лекарственных препаратов. Наиболее полно эти механизмы рассмотрены в обзоре DeAngelis и Zimmer [21]. В течение нескольких лет после открытия бактериального фермента из стрептококка, SpHAS, были открыты три изоформы HAS позвоночных (изоферменты HAS1, -2, -3) и вирусная HAS (CvHAS вируса хлореллы *Paramecium bursaria*, PBCV-1). CvHAS демонстрирует сходство в общей



**Рис. 1.** Схема синтеза ГК с участием гиалуронан-сингтазы. UDP-GlcNAc – уридин-5'-дифосфат-N-ацетилглюкозамин; GlcA – глюкуроновая кислота

архитектуре трансмембранных (ТМ) доменов, с двумя ТМ-спиралами на N-конце и четырьмя – на C-конце, и цитоплазматического домена с активным центром фермента. Все эти ферменты относятся к первому классу гликозилтрансфераз, однако HAS позвоночных и вирусная CvHAS добавляют сахара с невосстанавливющим концом (рис. 1), в отличие от SpHAS, у которой рост цепи осуществляется с восстанавливающего конца.

Ферменты позвоночных, CvHAS и SpHAS, имеют гликозилтрансферазный домен второго типа (GT-2), позволяющий осуществлять реакции с обоими мономерами: как с уридин-5'-дифосфат-глюкуроновой кислотой (UDP-GlcA), так и с уридин-5'-дифосфат-N-ацетилглюкозамином (UDP-GlcNAc). Методом электронной криомикроскопии установлена трехмерная структура вирусного фермента CvHAS [22]. Повсеместно применяющимся и единственным хорошо охарактеризованным ингибитором синтеза ГК является 4-МУ, способный значительно снижать экспрессию гиалуронан-сингтаз HAS2/HAS3 [1]. В клинической медицине 4-МУ известен под торговым названием «Гимекромон» или «Одестон». Этот препарат одобрен к применению в странах Европы и Азии и рутинно используется в качестве гепатопротектора и для лечения спазмов и дискинезии желчных протоков. Так, в Италии препарат распространяется под названием «Cantabilin» и авторизован агентством лекарственных средств Италии (Italian Medicines Agency; AIC no. 02130002).

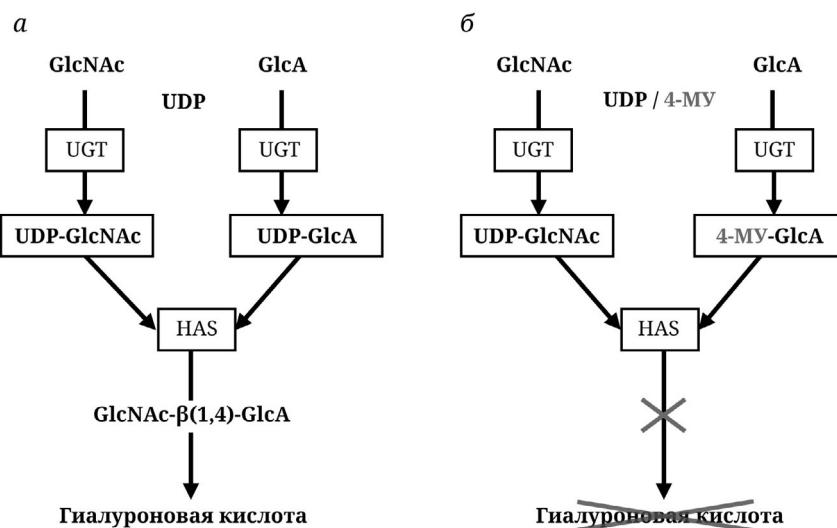
### МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ 4-МУ НА СИНТЕЗ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Данные о конкурентном ингибировании или даже о прямом взаимодействии 4-МУ с ферментом

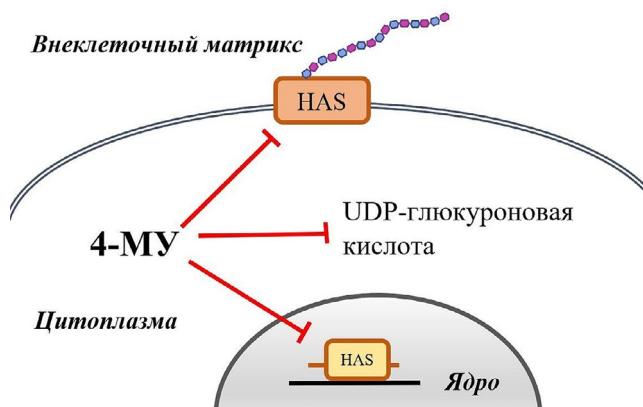
отсутствуют. 4-МУ не влияет на ферментативную активность солубилизированного фермента [23]. Наиболее распространенная гипотеза постулирует, что 4-МУ является конкурентным субстратом для уридин-5'-дифосфат-глюкуронозилтрансферазы (UGT), таким образом, истощая клеточный пул уридин-5'-дифосфат-глюкуроновой кислоты (UDP-GlcA), необходимой для синтеза ГК [24–26] (рис. 2).

Эта гипотеза также не подтверждена экспериментально. Против нее свидетельствует то, что 4-МУ не влияет на синтез других гликозаминогликанов, в состав которых входят те же мономеры, что и в ГК. Кроме того, кумарины с алкилированным гидроксилом 7, которые не могут быть субстратом для UGT, все равно обладают высокой ингибирующей способностью в исследованиях *in vitro* [27]. Показано, что 4-МУ снижает уровень экспрессии мРНК HAS2 [25, 28, 29] и одновременно повышает уровень экспрессии гиалуронидазы 1 (*Hyal1*) [30], а также снижает уровни фосфорилазы и дегидрогеназы уридин-5'-дифосфат-глюкозы [31]. При этом неизвестно, как именно осуществляется транскрипционная регуляция синтеза ГК и насколько механизм избирателен для этих мРНК (рис. 3).

4-МУ, как было показано нами и другими исследователями [32, 33], имеет множественные мишени, не связанные прямо с метаболизмом ГК. Не исключено, что снижение накопления ГК в среде при исследованиях *in vitro* является кумулятивным действием нескольких параллельных процессов, включая возможное истощение субстрата, а также экспериментально показанным снижением экспрессии HAS2 и увеличением экспрессии *Hyal1* [30]. Известно также, что экспрессия HAS2 регулируется ядерными рецепторами, в частности, глюкокортикоидным рецептором, и экспрессия HAS2 практически полностью подав-



**Рис. 2.** Предполагаемый механизм действия 4-МУ на синтез ГК. *а* – Схема представляет нормальный путь синтеза ГК. *б* – Схема показывает замещение UDP пулом 4-МУ, вследствие чего HAS не может синтезировать ГК. GlcNAc – N-ацетилглюкозамин; GlcA – глюкуроновая кислота; 4-МУ – 4-метилумбеллиферон; UDP – уридин-5'-дифосфат; UGT – уридин-5'-дифосфат-глюкуронилтрансфераза; UDP-GlcNAc – уридин-5'-дифосфат-N-ацетилглюкозамин; UDP-GlcA – уридин-5'-дифосфат-глюкуроновая кислота; HAS – гиалуронан-синтаза; GlcNAc- $\beta$ (1,4)-GlcA – N-ацетил-глюкозамин- $\beta$ (1,4)-глюкуроновая кислота. Рисунок заимствован из статьи Nagy et al., 2015 [26]



**Рис. 3.** Схематическое представление путей ингибирования синтеза ГК 4-МУ. Действие 4-МУ осуществляется несколькими способами: либо истощением предшественника ГК, UDP-глюкуроновой кислоты; либо ингибированием экспрессии гена, кодирующего HAS2 в ядре; либо опосредованным ингибированием активности гиалуронан-синтазы. 4-МУ – 4-метилумбеллиферон; HAS2 – гиалуронан-синтаза. Рисунок заимствован из обзора Vitale et al. [1]

ляется дексаметазоном [34]. Исследования выявили изменения клеточного цикла и p53-пути при воздействии 4-МУ [35, 36].

#### ДЕЙСТВИЕ 4-МУ НА РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ РАКА, АУТОИММУННЫЕ ПРОЦЕССЫ И ПРОЦЕССЫ ВОСПАЛЕНИЯ

4-МУ оказывает действие на такие связанные с прогрессией опухоли процессы, как миграция,

пролиферация, инвазия раковых клеток и ангиогенез. Клетки микроокружения опухоли, представленные эндотелиальными клетками, клетками иммунной системы и фибробластами, также испытывают влияние 4-МУ. Все эти процессы со пряжены с активными изменениями в строении и составе межклеточного матрикса, основным компонентом которого является ГК. Эти работы обосновывают разработку лекарств, направленных на изменение свойств межклеточного матрикса. Такой подход является многообещающим в лечении различных видов рака, а 4-МУ представляет собой уже допущенный к применению препарат, который может быть использован в новом качестве.

На мышиной модели фиброза печени, вызванном четыреххлористым углеродом, нами было показано, что образованию коллагеновых тяжей предшествует синтез ГК вдоль границ печеночных долек. 4-МУ препятствовал первоначальному образованию тяжей ГК и приводил к значительному уменьшению коллагеновых фибриллярных образований вокруг печеночных долек [30]. Показательно, что в нашей последующей работе нокаут гена, кодирующего HAS2, при помощи специфичной siRNA воспроизводил действие 4-МУ на ряд сигнальных путей и транскрипцию ряда ключевых генов, приводя к подавлению фиброза печени [37].

Отдельный интерес представляет возможность применения 4-МУ для лечения заболеваний головного мозга. ВКМ злокачественных глиом, а также глиобластом отличается повышенным

содержанием ГК, стимулирующей адгезивные и инвазивные процессы опухоли [38]. 4-МУ является малой молекулой, способной преодолевать гематоэнцефалический барьер и ингибировать синтез главного компонента внеклеточного матрикса, ГК, что создало предпосылки для исследования этого вещества для терапии глиом и глиобластом. Так, на мышиных моделях было показано, что высокие дозы 4-МУ снижали синтез ГК, одновременно усиливая апоптоз и снижая пролиферацию и миграцию клеток глиобластомы [39–41]. Действие 4-МУ на клетки глиомы заключалось в снижении

пролиферации *in vitro* и *in vivo* путем регуляции процессов аутофагии [42]. Кроме того, в работе Chistyakov et al. [43] доказана способность 4-МУ ингибировать воспалительный ответ астроцитов. Пероральный прием 4-МУ приводил к значимому снижению ГК в спинном и головном мозге мышей, снижению синаптической стабильности и реактивации нейропластичности, что приводило к улучшению памяти [44].

Данные по доклиническим исследованиям 4-МУ для лечения различных типов заболеваний приведены в табл. 1.

**Таблица 1.** Доклинические исследования действия 4-МУ на различные заболевания

Орган/система	Исследуемая болезнь	Год	Тип исследования	Ссылка
Воспаление	острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС)	2013	<i>in vitro</i>	[45]
		2015	<i>in vitro</i>	[46]
	аллергическое воспаление	2022	<i>in vitro</i>	[47]
	аллергический ринит	2022	<i>in vitro/in vivo</i>	[48]
	воспаление	2022	<i>in vitro</i>	[49]
Голова и шея	плоскоклеточный рак полости рта	2022	<i>in vitro</i>	[50]
Желчевыводящие пути	дискинезия желчных протоков	1984	<i>in vivo</i>	[51]
	желчные колики	1995	<i>in vivo</i>	[52]
Иммунный ответ	орбитопатия Грейвса	2020	<i>in vitro</i>	[53]
	отторжение трансплантата	2021	<i>in vitro/in vivo</i>	[54]
	автоиммунный ответ на трансплантированные островки Лангерганса	2020	<i>in vitro/in vivo</i>	[55]
	острое отторжение аллотрансплантата легкого	2021	<i>in vitro/in vivo</i>	[56]
Костный мозг	хронический миелоидный лейкоз	2013	<i>in vitro</i>	[57]
		2016	<i>in vitro</i>	[58]
		2017	<i>in vitro</i>	[59]
Легкие	мезотелиома плевры	2017	<i>in vitro/in vivo</i>	[60]
	фиброз легких и легочная гипертензия	2017	<i>in vivo</i>	[61]
Молочные железы	рак молочной железы	2019	<i>in vitro</i>	[62]
		2022	<i>in vitro</i>	[63]
Мочевой пузырь	рак мочевого пузыря	2017	<i>in vitro/in vivo</i>	[64]
Периферическая нервная система	злокачественная опухоль оболочки периферического нерва	2017	<i>in vitro/in vivo</i>	[65]

Таблица 1 (продолжение)

Орган/система	Исследуемая болезнь	Год	Тип исследования	Ссылка
Печень	гепатоцеллюлярная карцинома	2012	<i>in vitro/in vivo</i>	[66]
		2015	<i>in vitro/in vivo</i>	[67]
		2019	<i>in vitro/in vivo</i>	[29]
		2021	<i>in vitro/in vivo</i>	[68]
		2022	<i>in vitro/in vivo</i>	[69]
	метастазирование меланомы в печень	2005	<i>in vitro/in vivo</i>	[70]
	фиброз печени	2019	<i>in vivo</i>	[30]
	стеатогепатит	2021	<i>in vitro/in vivo</i>	[71]
	рак поджелудочной железы	2006	<i>in vitro/in vivo</i>	[72]
		2016	<i>in vitro/in vivo</i>	[73]
		2017	<i>in vitro/in vivo</i>	[74]
		2018	<i>in vitro/in vivo</i>	[75, 76]
	аденокарцинома протоков поджелудочной железы	2019	<i>in vitro</i>	[77, 78]
Почки	почечно-клеточная карцинома	2013	<i>in vitro</i>	[79]
	ишемически-реперфузионное повреждение почек	2013	<i>in vivo</i>	[80]
	метастатический почечно-клеточный рак	2020	<i>in vitro</i>	[81]
	диабетическая болезнь почек	2021	<i>in vivo</i>	[82]
	прогрессирующая почечно-клеточная карцинома	2022	<i>in vitro/in vivo</i>	[83]
Простата	рак предстательной железы	2010	<i>in vitro</i>	[84]
		2015	<i>in vitro/in vivo</i>	[85]
Соединительная ткань	фибросаркома	2017	<i>in vitro</i>	[86]
		2019	<i>in vitro</i>	[87]
		2020	<i>in vitro</i>	[88]
		2021	<i>in vitro</i>	[89]
Толстый кишечник	колоректальная карцинома	2015	<i>in vitro/in vivo</i>	[90]
Центральная нервная система	gliобластома	2021	<i>in vitro</i>	[39, 40]
		2022	<i>in vitro/in vivo</i>	[91]
Эндометрий	эндометриоз	2016	<i>in vitro/in vivo</i>	[92]
		2020	<i>in vitro</i>	[93]
		2023	<i>in vivo</i>	[94]

Таблица 1 (окончание)

Орган/система	Исследуемая болезнь	Год	Тип исследования	Ссылка
Яичники	рак яичников	2014	<i>in vitro</i>	[95]
		2019	<i>in vitro/in vivo</i>	[96]
		2020	<i>in vitro</i>	[97]

**ПЕРСПЕКТИВА ЛЕЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОМБИНАЦИЯМИ С 4-МУ. ДЕЙСТВИЕ НА ФИЗИЧЕСКИЙ БАРЬЕР ОПУХОЛИ. ПРИМЕНЕНИЕ 4-МУ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРА СИНТЕЗА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Окружающий клетки ВКМ, богатый ГК, составляет биологический барьер микроокружения опухоли. Этот барьер регулирует работу иммунных эффекторов [13, 98], ингибитирует диффузию лекарственных препаратов [99], затрудняет поглощение ДНК-трансгенных комплексов при проведении генной терапии [100] и играет важную роль в приобретении резистентности к противоопухолевым препаратам [1, 11, 101].

Возможность изменения свойств микроокружения опухоли с целью улучшения результата различных противоопухолевых терапий в настоящее время активно исследуется. Патологичное микроокружение опухоли характеризуется гипоксией и высоким внутриканевым давлением жидкости, приводящим к прогрессии опухоли и развитию устойчивости к проводимому лечению [102]. Повышение внутриканевого давления рассматривается как наиболее важный барьер для эффективного распределения лекарственного препарата внутри опухоли. Причины повышения внутриканевого давления опухоли многочисленны и включают в себя наличие в опухоли развитой сети кровеносных сосудов, недостаточное развитие лимфатических сосудов, изменение компонентов внеклеточного матрикса и давление, создаваемое постоянно делящимися клетками опухоли [103, 104]. Повышенное содержание в окружающих опухоль тканях ГК способствует увеличению объема внеклеточного матрикса и, как следствие, повышению давления внутри опухоли [105, 106]. Высокое содержание ГК в микроокружении опухоли создает физический барьер, ограничивающий доступ моноклональных антител и иммунных клеток к опухолевой ткани. Это один из механизмов возникновения устойчивости опухолевых тканей к проводимой иммунотерапии [107].

Способность 4-МУ ингибировать синтез ГК создает предпосылки для его использования в

качестве адъювантной терапии при лечении рака в комбинации с первичной терапией. На различных моделях показано, что использование 4-МУ в качестве сопутствующей терапии различных видов рака повышает эффективность лечения, снижает токсичность противоопухолевых препаратов и помогает преодолеть возникшую химиорезистентность (табл. 2).

Согласно имеющимся данным по исследованию 4-МУ в качестве добавки к основной терапии, 4-МУ повышает радиочувствительность устойчивых к облучению клеток плоскоклеточного рака полости рта [50] и фиброзаркомы [86–89]. Сорafenib в комбинации с 4-МУ эффективнее ингибирует пролиферацию, инвазию, формирование капилляров и индуцирует апоптоз клеток карциномы почек и эндотелиальных клеток [79, 83]. 4-МУ повышает эффективность 5-флюороурацила [68] и гемцитабина [72] в отношении рака поджелудочной железы, ингибируя пролиферацию клеток и приводя к уменьшению размеров первичных опухолей и метастазов, а также увеличивая выживаемость больных животных. 4-МУ повышает чувствительность клеток глиобластомы к темозоломиду, усиливая действие препарата на клеточную гибель [41]. 4-МУ повышает цитотоксический эффект карбоплатина на клетки химиорезистентного рака яичников [96]. При совместном применении дихлорадцетата и 4-МУ на модели плоскоклеточного рака пищевода происходит усиление апоптоза и ингибирования роста опухоли [108]. Клетки миелоидной лейкемии при обработке 4-МУ становились более чувствительными к доксирибицину [58] и увеличивали скорость старения [59]. На клетках меланомы показано, что комбинация vemurafenib с 4-МУ более эффективно снижала выживаемость раковых клеток по сравнению с монотерапией vemurafenibом [109]. 4-МУ повышает химиочувствительность клеток уретериальной карциномы мочевого пузыря к доксирибицину и цисплатину [110]. 4-МУ значительно снижает внутриканевое давление опухоли и улучшает ее перфузию, способствуя более эффективной экспрессии аденоонкального гена IL-12 (AdIL-12) для лечения колоректального рака [90]. При исследовании на модели рака печени 4-МУ

**Таблица 2.** Доклинические исследования эффективности лечения различных видов рака комбинациями лекарств с 4-МУ

Исследуемая болезнь	Основное лечение	Тип исследования	Год	Ссылка
Гепатоцеллюлярная карцинома	иммунотерапия: аденоизвестковый вирус, кодирующий IL-12 (AdIL-12)	<i>in vitro</i>	2018	[111]
Глиобластома	темозоломид	<i>in vitro</i>	2023	[41]
Злокачественная мезотелиома плевры	траметиниб	<i>in vitro/in vivo</i>	2017	[60]
Колоректальная карцинома	циклофосфамид с иммунотерапией (AdIL-12)	<i>in vitro/in vivo</i>	2015	[90]
Меланома	вемурафениб	<i>in vitro</i>	2021	[109]
Плоскоклеточный рак пищевода	дихлоруксусная кислота	<i>in vitro/in vivo</i>	2019	[108]
Плоскоклеточный рак полости рта	радиотерапия	<i>in vitro</i>	2022	[50]
Почечно-клеточная карцинома	сорафениб	<i>in vitro</i>	2013	[79]
Прогрессирующая почечно-клеточная карцинома	сорафениб	<i>in vitro/in vivo</i>	2022	[83]
Рак поджелудочной железы	5-фторурацил	<i>in vitro/in vivo</i>	2018	[76]
Рак поджелудочной железы	гемцитабин	<i>in vitro/in vivo</i>	2006	[72]
Рак яичника	карбоплатин	<i>in vitro/in vivo</i>	2019	[96]
Уротелиальная карцинома мочевого пузыря	цисплатин или доксорубицин	<i>in vivo</i>	2019	[110]
Фибросаркома	радиотерапия	<i>in vitro</i>	2021	[89]
		<i>in vitro</i>	2019	[87]
		<i>in vitro</i>	2017	[86]
Хронический миелоидный лейкоз	иматиниб	<i>in vitro</i>	2017	[59]
Хронический миелоидный лейкоз	доксорубицин	<i>in vitro</i>	2016	[58]

в комбинации с AdIL-12 привел к более выраженному ингибированию роста опухоли и повышению выживаемости мышей по сравнению с монотерапией [111].

#### ПРИМЕНЕНИЕ 4-МУ В КАЧЕСТВЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРА И ХОЛЕСТАТИКА ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ ПЕРВИЧНОЙ ТЕРАПИИ

Ингибиторы иммунных чекпойнтов, цитокины и антитела к ним, используются в качестве иммуномодуляторов для усиления иммунологического ответа организма в ответ на опухоли и очаги хронического воспаления при ревматоид-

ных, аутоиммунных и воспалительных заболеваниях [112, 113]. Эти препараты успешно прошли клинические испытания и одобрены к применению европейским и американским агентствами по лекарственным средствам [114]. Однако до 17% пациентов, получающих подобную иммунотерапию, страдают от осложнений, связанных с повреждением печени и желчевыводящих протоков [115–119].

Для лечения возникшей гепатотоксичности, в зависимости от ее тяжести, рекомендуется прекратить прием ингибиторов иммунных чекпойнтов, в некоторых случаях показано применение кортикостероидов, а в более тяжелых случаях – применение иммуносупрессии [120–123]. В случае развития холестатической формы гепатотоксич-

ности, когда кортикоиды оказываются неэффективны, улучшить показатели печени помогает урсодеоксихолиевая кислота [124–127]. Она обладает доказанными гепатопротекторными и желчегонными свойствами и считается стандартом терапии холестатических заболеваний печени с аутоиммунным компонентом, таких, например, как первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит [128–130]. В настоящее время опубликованных данных о влиянии 4-МУ на риск развития гепатотоксичности в ответ на иммунотерапию не обнаружено, но, как и в случае с урсодеоксихолиевой кислотой, доказанные холестатические и гепатопротекторные свойства 4-МУ делают его многообещающим кандидатом на проведение таких исследований.

Представленные данные создают предпосылки и указывают на необходимость проведения полноценных клинических испытаний 4-МУ в качестве адъювантной/дополнительной противоопухолевой терапии, которая способствует снижению содержания ГК, оказывает действие на ВКМ и микроокружение опухоли, снижает внутриканевое давление, улучшает перфузию опухоли, облегчает доступ лекарственных препаратов и оказывает гепатопротекторное и холестатическое действие, уменьшая таким образом риски развития гепатотоксичности при проведении иммунотерапии.

### **ТОПИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ 4-МУ В КАЧЕСТВЕ ВЕЩЕСТВА, ПРЕПЯТСТВУЮЩЕГО ОБРАЗОВАНИЮ РАСТЯЖЕК, ШРАМОВ, КЕЛОИДНЫХ РУБЦОВ, СОЛНЕЧНЫХ ОЖОГОВ И ОЧАГОВ ГИПОПИГМЕНТАЦИИ**

Топическое нанесение 4-МУ приводит к эффективному ингибированию синтеза ГК в коже [131]. Показано, что 4-МУ предотвращает активацию кератиноцитов, снижает эпидермальную гиперпролиферацию [132] и скорость миграции келоидных кератиноцитов, уменьшая вероятность образования келоидных рубцов [133].

4-МУ усиливает процессы меланогенеза, что делает его перспективным кандидатом для лечения состояний кожи, связанных с гипопигментацией, а также применения в качестве косметического средства для создания естественного загара [134].

### **МЕТАБОЛИЗМ 4-МУ. ТОКСИЧНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА**

4-МУ, как и все кумарины, слабо растворим в воде. Он является неполярной молекулой, и

поэтому легко преодолевает липидный барьер в кишечнике, практически полностью абсорбируется при оральном приеме и выводится с мочой и желчью [26]. Метильная группа в позиции 4 обеспечивает низкую токсичность препарата, предотвращая его метаболизм в кумарин-3,4-эпоксид под воздействием цитохрома P450, и слабые антикоагуляционные свойства по сравнению с другими кумаринами, такими как дикумарин и варфарин [135].

При поступлении в организм 4-МУ очень быстро и почти полностью метаболизируется в печени и тонком кишечнике в 4-метилумбеллиферон-бета-Д-глюкуронид (4-МУГ), что до настоящего времени ограничивало его применение для лечение только желчевыводящих протоков [1, 136–138]. При оральном приеме 4-МУ менее 3% исходной дозы лекарства достигает системного уровня в неизменном виде. При внутривенном введении 4-МУ его концентрация в крови в 10–30 раз выше [26, 139]. Время полужизни 4-МУ при оральном приеме составляет всего 28 минут для человека и 3 минуты – для мышей [140, 141]. При этом медианная концентрация 4-МУГ в плазме выше концентрации 4-МУ более чем в 3000 раз [26, 141]. Можно говорить, что при приеме лекарства большая его часть находится в организме в виде его метаболита 4-МУГ. Но несмотря на низкую биодоступность и короткое время полужизни препарата, 4-МУ оказывает эффективное ингибирующее влияние на синтез ГК при оральном приеме. Оказалось, что 4-МУГ так же эффективно, как и 4-МУ, ингибирует синтез ГК, а внутри клетки он гидролизуется обратно до 4-МУ [137]. Поэтому для оценки фармакодинамики препарата необходимо принимать в расчет действие его метаболита, 4-МУГ. Эти данные создают предпосылки применения 4-МУ для лечения заболеваний далеко за пределами желчевыводящих путей. Так, являясь малой неполярной молекулой, 4-МУ способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и эффективно ингибировать деление клеток глиомы [42].

Типичный режим дозирования 4-МУ для взрослого человека составляет 900–2400 мг/день [26]. При этом никаких мутагенных или генотоксических эффектов не обнаружено [1, 142, 143]. Клинические испытания в США на пациентах с хроническими гепатитами В и С (NCT00225537), а также на здоровых людях и на пациентах с заболеваниями дыхательной системы (NCT02780752) [144] доказали безопасность 4-МУ (см. табл. 3).

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Несмотря на множество экспериментальных работ, демонстрирующих эффективность 4-МУ

**Таблица 3.** Клинические исследования 4-МУ в терапии различных заболеваний

Исследуемое заболевание/ цель исследования	Статус	Год	Ссылка/ идентификатор clinicaltrials.gov
Интерстициальные заболевания легких (The SOLID Study)	фаза II; набор участников не начат	2024	NCT06325696
	фаза II; идет набор участников	2022	NCT05295680
	неизвестно	2022	NCT05386420
	фаза II; завершен	2021	NCT05128929
	фаза I; завершен	2016	[144]/ NCT02780752
	нет информации	2016	[145]
	неизвестно	2005	NCT00225537
	нет информации	2005	[146]
	нет информации	2001	[147]
	нет информации	1995	[52]
Исследование биодоступности 4-МУ	нет информации	1993	[141]
Симптомы после операции на желчных протоках	нет информации	1988	[148]
Дискинезия желчных протоков после холецистэктомии	нет информации	1984	[51]

в различных животных моделях онкологических, иммунных и дегенеративных заболеваний, необходимо признать, что достоверные молекулярные механизмы действия остаются гипотетическими. Тем не менее существует доказательство того, что по крайней мере в модели фиброза печени нокдаун гена, кодирующего HAS2, приводит не только к подавлению фиброза, но и к изменениям транскриптома, схожим с воздействием орального применения 4-МУ [37]. При этом нельзя исключить, что некоторые из механизмов действия 4-МУ могут быть независимыми от ингибирования синтеза ГК. Так, описаны независимые от ГК эффекты действия 4-МУ [62, 149]. Также 4-МУ может обладать различными противоопухолевыми механизмами в зависимости от типа рака. Однако, в совокупности, рассмотренные нами множественные данные об эффективности 4-МУ доказывают необходимость перехода к подробному изучению фармакокинетических и фармакодинамических аспектов, определяющих схему лечения (способ введения, дозы, влияющие на его биодоступность, время интервала между ними и график приема).

Первые токсикологические исследования в фазе I клинических исследований уже проведены [144], что позволяет уже сейчас перейти к клиническим исследованиям эффективности препарата (фаза IIa). Подобная тенденция наблюдается в мире. Так, в настоящее время планируется проведение клинических испытаний 4-МУ по лечению интерстициальных заболеваний легких и холангита (см. табл. 3).

При клинических испытаниях 4-МУ необходимо подобрать дозы с учетом конкретной патологии, скорости выведения его метаболитов и биодоступности. Создание новых форм, например, наночастиц, содержащих 4-МУ, является важным фактором, который не только позволит повысить биодоступность, но также создаст предпосылки для патентной защиты нового лекарственного средства.

И, наконец, если принять наши доводы о том, что главной фармакологической мишенью 4-МУ является гиалуронан-синтаза, разработка новых химических соединений с использованием 3Д-моделей HAS2/HAS3 и докинга потенциальных

лигандов с привлечением подходов искусственного интеллекта должна неизбежно привести к созданию оригинальных первых в классе таргетных лекарственных препаратов на основе ингибиторов гиалуронан-синтазы.

**Вклад авторов.** Ю.В. Котелевцев принимал участие в формулировании общей концепции обзора, подбору основных статей и руководил собственными экспериментальными работами, отраженными в обзоре. А. Цитрина и Н. Хали-

мани предоставили основные выводы из своих экспериментальных статей и участвовали в обсуждении текста обзора, вносили изменения. В.В. Федорова осуществляла сбор, анализ литературы и написала основной текст обзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vitale, D. L., Icardi, A., Rosales, P., Spinelli, F. M., Sevic, I., and Alaniz, L. D. (2021) Targeting the tumor extracellular matrix by the natural molecule 4-methylumbelliferone: a complementary and alternative cancer therapeutic strategy, *Front. Oncol.*, **11**, 710061, <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.710061>.
- Rosales, P., Vitale, D., Icardi, A., Sevic, I., and Alaniz, L. (2024) Role of Hyaluronic acid and its chemical derivatives in immunity during homeostasis, cancer and tissue regeneration, *Semin. Immunopathol.*, **46**, 15, <https://doi.org/10.1007/s00281-024-01024-7>.
- Tavianatou, A. G., Caon, I., Franchi M., Piperigkou, Z., Galessio, D., and Karamanos, N. K. (2019) Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer, *FEBS J.*, **286**, 2883-2908, <https://doi.org/10.1111/febs.14777>.
- Jung, H. (2020) Hyaluronidase: an overview of its properties, applications, and side effects, *Arch. Plast. Surg.*, **47**, 297-300, <https://doi.org/10.5999/aps.2020.00752>.
- Kudo, D., Kon, A., Yoshihara, S., Kakizaki, I., Sasaki, M., Endo, M., and Takagaki, K. (2004) Effect of a hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 783-787, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.041>.
- Cheng, X. B., Kohi, S., Koga, A., Hirata, K., and Sato, N. (2016) Hyaluronan stimulates pancreatic cancer cell motility, *Oncotarget*, **7**, 4829-4840, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6617>.
- Ricciardelli, C., Russell, D. L., Ween, M. P., Mayne, K., Suwiwat, S., Byers, S., Marshall, V. R., Tilley, W. D., and Horsfall, D. J. (2007) Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility, *J. Biol. Chem.*, **282**, 10814-10825, <https://doi.org/10.1074/jbc.M606991200>.
- Jacobetz, M. A., Chan, D. S., Neesse, A., Bapiro, T. E., Cook, N., Frese, K. K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M. E., Zecchini, H. I., Lolkema, M. P., Jiang, P., Kultti, A., Thompson, C. B., Maneval, D. C., Jodrell, D. I., Frost, G. I., Shepard, H. M., Skepper, J. N., and Tuveson, D. A. (2013) Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer, *Gut*, **62**, 112-120, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302529>.
- Misra, S., Ghatak, S., Zoltan-Jones, A., and Toole, B. P. (2003) Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan, *J. Biol. Chem.*, **278**, 25285-25288, <https://doi.org/10.1074/jbc.C300173200>.
- Toole, B. P., and Slomiany, M. G. (2008) Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells, *Semin. Cancer Biol.*, **18**, 244-250, <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2008.03.009>.
- Vitale, D. L., Spinelli, F. M., Del Dago, D., Icardi, A., Demarchi, G., Caon, I., García, M., Bolontrade, M. F., Passi, A., Cristina, C., and Alaniz, L. (2018) Co-treatment of tumor cells with hyaluronan plus doxorubicin affects endothelial cell behavior independently of VEGF expression, *Oncotarget*, **9**, 36585-36602, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26379>.
- Kultti, A., Zhao, C., Singha, NC., Zimmerman, S., Osgood, R. J., Symons, R., Jiang, P., Li X., Thompson, CB., Infante, J. R., Jacobetz, M. A., Tuveson, D. A., Frost, G. I., Shepard, H. M., and Huang, Z. (2014) Accumulation of extracellular hyaluronan by hyaluronan synthase 3 promotes tumor growth and modulates the pancreatic cancer microenvironment, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 817613, <https://doi.org/10.1155/2014/817613>.
- McBride, W. H., and Bard, J. B. (1979) Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytotoxicity, *J. Exp. Med.*, **149**, 507-515, <https://doi.org/10.1084/jem.149.2.507>.
- Lipponen, P., Aaltomaa, S., Tammi, R., Tammi, M., Agren, U., and Kosma, V. M. (2001) High stromal hyaluronan level is associated with poor differentiation and metastasis in prostate cancer, *Eur. J. Cancer.*, **37**, 849-856, [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(00\)00448-2](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(00)00448-2).

15. Setälä, L. P., Tammi, M. I., Tammi, R. H., Eskelinne, M. J., Lippinen, P. K., Agren, U. M., Parkkinen, J., Alhava, E. M., and Kosma, V. M. (1999) Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate, *Br. J. Cancer.*, **79**, 1133-1138, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690180>.
16. Anttila, M. A., Tammi, R. H., Tammi, M., Syrjänen, K. J., Saarikoski, S. V., and Kosma, V. M. (2000) High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer, *Cancer Res.*, **60**, 150-155.
17. Bharadwaj, A. G., Kovar, J. L., Loughman, E., Elowsky, C., Oakley, G. G., and Simpson, M. A. (2009) Spontaneous metastasis of prostate cancer is promoted by excess hyaluronan synthesis and processing, *Am. J. Pathol.*, **174**, 1027-1036, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080501>.
18. Sironen, R. K., Tammi, M., Tammi, R., Auvinen, P. K., Anttila, M., and Kosma, V. M. (2011) Hyaluronan in human malignancies, *Exp. Cell Res.*, **317**, 383-391, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.11.017>.
19. Kim, J., and Seki, E. (2023) Hyaluronan in liver fibrosis: basic mechanisms, clinical implications, and therapeutic targets, *Hepatol. Commun.*, **7**, e0083, <https://doi.org/10.1097/HC9.00000000000000083>.
20. Yang, Y. M., Noureddin, M., Liu, C., Ohashi, K., Kim, S. Y., Ramnath, D., Powell, E. E., Sweet, M. J., Roh, Y. S., Hsin, I. F., Deng, N., Liu, Z., Liang, J., Mena, E., Shouhed, D., Schwabe, R. F., Jiang, D., Lu, S. C., Noble, P. W., and Seki, E. (2019) Hyaluronan synthase 2-mediated hyaluronan production mediates Notch1 activation and liver fibrosis, *Sci. Transl. Med.*, **11**, eaat9284, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat9284>.
21. DeAngelis, P. L., and Zimmer, J. (2023) Hyaluronan synthases; mechanisms, myths, and mysteries of three types of unique bifunctional glycosyltransferases, *Glycobiology*, **33**, 1117-1127, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwad075>.
22. Maloney, F. P., Kuklewicz, J., Corey, R. A., Bi, Y., Ho, R., Mateusiak, L., Pardon, E., Steyaert, J., Stansfeld, P. J., and Zimmer, J. (2022) Structure, substrate recognition and initiation of hyaluronan synthase, *Nature*, **604**, 195-201, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04534-2>.
23. Nakamura, T., Funahashi, M., Takagaki, K., Munakata, H., Tanaka, K., Saito, Y., and Endo, M. (1997) Effect of 4-methylumbelliferone on cell-free synthesis of hyaluronic acid, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**, 263-268, <https://doi.org/10.1080/15216549700204041>.
24. Kakizaki, I., Kojima, K., Takagaki, K., Endo, M., Kannagi, R., Ito, M., Maruo, Y., Sato, H., Yasuda, T., Mita, S., Kimata, K., and Itano, N. (2004) A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone, *J. Biol. Chem.*, **279**, 33281-33289, <https://doi.org/10.1074/jbc.M405918200>.
25. Kultti, A., Pasonen-Seppänen, S., Jauhainen, M., Rilla, K.J., Kärnä, R., Pyöriä, E., Tammi, R. H., and Tammi, M. I. (2009) 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3, *Exp. Cell Res.*, **315**, 1914-1923, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.03.002>.
26. Nagy, N., Kuipers, H. F., Frymoyer, A. R., Ishak, H. D., Bollyky, J. B., Wight, T. N., and Bollyky, P. L. (2015) 4-methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer, *Front. Immunol.*, **6**, 123, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00123>.
27. Tsitrina, A. A., Krasylov, I. V., Maltsev, D. I., Andreichenko, I. N., Moskvina, V. S., Ivankov, D. N., Bulgakova, E. V., Nesterchuk, M., Shashkovskaya, V., Dashenkova, N. O., Khilya, V. P., Mikaelyan, A., and Kotelevtsev, Y. (2021) Inhibition of hyaluronan secretion by novel coumarin compounds and chitin synthesis inhibitors, *Glycobiology*, **31**, 959-974, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab038>.
28. Saito, T., Dai, T., and Asano, R. (2013) The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects against mesenchymal-like canine mammary tumor cells, *Oncol. Lett.*, **5**, 1068-1074, <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1124>.
29. Sukowati, C. H. C., Anfuso, B., Fiore, E., Ie, S. I., Raseni, A., Vascotto, F., Avellini, C., Mazzolini, G., and Tiribelli, C. (2019) Hyaluronic acid inhibition by 4-methylumbelliferone reduces the expression of cancer stem cells markers during hepatocarcinogenesis, *Sci. Rep.*, **9**, 4026, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40436-6>.
30. Andreichenko, I. N., Tsitrina, A. A., Fokin, A. V., Gabdulkhakova, A. I., Maltsev, D. I., Perelman, G. S., Bulgakova, E. V., Kulikov, A. M., Mikaelyan, A. S., and Kotelevtsev, Y. V. (2019) 4-methylumbelliferone prevents liver fibrosis by affecting hyaluronan deposition, FSTL1 expression and cell localization, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 6301, <https://doi.org/10.3390/ijms20246301>.
31. Vigetti, D., Rizzi, M., Viola, M., Karousou, E., Genasetti, A., Clerici, M., Bartolini, B., Hascall, V. C., De Luca, G., and Passi, A. (2009) The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells, *Glycobiology*, **19**, 537-546, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp022>.
32. Tsitrina, A. A., Halimani, N., Andreichenko, I. N., Sabirov, M., Nesterchuk, M., Dashenkova, N. O., Romanov, R., Bulgakova, E. V., Mikaelyan, A., and Kotelevtsev, Y. (2023) 4-methylumbelliferone targets revealed by public data analysis and liver transcriptome sequencing, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2129, <https://doi.org/10.3390/ijms24032129>.
33. Díaz, M., Pibuel, M., Pagilla, N., Poodts, D., Alvarez, E., Papademetrio, D. L., Hajos, S. E., and Lombardía, S. L. (2021) 4-Methylumbelliferone induces antitumor effects independently of hyaluronan synthesis inhibition in human acute leukemia cell lines, *Life Sci.*, **287**, 120065, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120065>.

34. Zhang, W., Watson, C. E., Liu, C., Williams, K. J., and Werth, V. P. (2000) Glucocorticoids induce a near-total suppression of hyaluronan synthase mRNA in dermal fibroblasts and in osteoblasts: a molecular mechanism contributing to organ atrophy, *Biochem. J.*, **349**, 91-97, <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3490091>.
35. Saito, T., Tamura, D., Nakamura, T., Makita, Y., Ariyama, H., Komiyama, K., Yoshihara, T., and Asano, R. (2013) 4-methylumbelliferone leads to growth arrest and apoptosis in canine mammary tumor cells, *Oncol. Rep.*, **29**, 335-342, <https://doi.org/10.3892/or.2012.2100>.
36. Ban, H., Uchakina, O., and McKallip, R. J. (2015) Hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone activates the intrinsic apoptosis pathway in K562 chronic myelogenous leukemia cells, *Anticancer Res.*, **35**, 5231-5240.
37. Halimani, N., Nesterchuk, M., Tsitrina, A. A., Sabirov, M., Andreichenko, I. N., Dashenkova, N. O., Petrova, E., Kulikov, A. M., Zatsepin, T. S., Romanov, R. A., Mikaelyan, A. S., and Kotlevtsev, Y. V. (2024) Knockdown of Hyaluronan synthase 2 suppresses liver fibrosis in mice via induction of transcriptomic changes similar to 4MU treatment, *Sci. Rep.*, **14**, 2797, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53089-x>.
38. Kim, Y., and Kumar, S. (2014) CD44-mediated adhesion to hyaluronic acid contributes to mechanosensing and invasive motility, *Mol. Cancer Res.*, **12**, 1416-1429, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0629>.
39. Pibuel, M. A., Díaz, M., Molinari, Y., Poodts, D., Silvestroff, L., Lompardía, S. L., Franco, P., and Hajos, S. E. (2021) 4-Methylumbelliferone as a potent and selective antitumor drug on a glioblastoma model, *Glycobiology*, **31**, 29-43, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa046>.
40. Pibuel, M. A., Poodts, D., Díaz, M., Molinari, Y. A., Franco, P. G., Hajos, S. E., and Lompardía, S. L. (2021) Antitumor effect of 4MU on glioblastoma cells is mediated by senescence induction and CD44, RHAMM and p-ERK modulation, *Cell Death Discov.*, **7**, 280, <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00672-0>.
41. Pibuel, M. A., Poodts, D., Sias, S. A., Byrne, A., Hajos, S. E., Franco, P. G., and Lompardía, S. L. (2023) 4-Methylumbelliferone enhances the effects of chemotherapy on both temozolomide-sensitive and resistant glioblastoma cells, *Sci. Rep.*, **13**, 9356, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35045-3>.
42. Yan, T., Chen, X., Zhan, H., Yao, P., Wang, N., Yang, H., Zhang, C., Wang, K., Hu, H., Li, J., Sun, J., Dong, Y., Lu, E., Zheng, Z., Zhang, R., Wang, X., Ma, J., Gao, M., Ye, J., Wang, X., Teng, L., Liu, H., and Zhao, S. (2021) Interfering with hyaluronic acid metabolism suppresses glioma cell proliferation by regulating autophagy, *Cell Death Dis.*, **12**, 486, <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03747-z>.
43. Chistyakov, D. V., Nikolskaya, A. I., Goriainov, S. V., Astakhova, A. A., and Sergeeva, M. G. (2020) Inhibitor of hyaluronic acid synthesis 4-methylumbelliferone as an anti-inflammatory modulator of LPS-mediated astrocyte responses, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8203, <https://doi.org/10.3390/ijms21218203>.
44. Dubisova, J., Burianova, J. S., Svobodova, L., Makovicky, P., Martinez-Varea, N., Cimpean, A., Fawcett, J. W., Kwok, J. C. F., and Kubinova, S. (2022) Oral treatment of 4-methylumbelliferone reduced perineuronal nets and improved recognition memory in mice, *Brain Res. Bull.*, **181**, 144-156, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.01.011>.
45. McKallip, R. J., Hagele, H. F., and Uchakina, O. N. (2013) Treatment with the hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone suppresses SEB-induced lung inflammation, *Toxins (Basel)*, **5**, 1814-1826, <https://doi.org/10.3390/toxins5101814>.
46. McKallip, R. J., Ban, H., and Uchakina, O. N. (2015) Treatment with the hyaluronic Acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone suppresses LPS-induced lung inflammation, *Inflammation*, **38**, 1250-1259, <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0092-y>.
47. Wang, H. N., Xiang, Q. A., Lin, H. H., Chen, J. N., Guo, W. J., Guo, W. M., Yue, X. N., Zhao, Z. F., Ji K., and Chen, J. J. (2022) Plant-derived molecule 4-methylumbelliferone suppresses Fc $\epsilon$ RI-mediated mast cell activation and allergic inflammation, *Molecules*, **27**, 1577, <https://doi.org/10.3390/molecules27051577>.
48. Lee, S. N., Yoon, S. A., Song, J. M., Kim, H. C., Cho, H. J., Choi, A. M. K., and Yoon, J. H. (2022) Cell-type-specific expression of hyaluronan synthases HAS2 and HAS3 promotes goblet cell hyperplasia in allergic airway inflammation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **67**, 360-374, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0527OC>.
49. Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Golenkina, E. A., Serebryakova, M. V., Stadnichuk, V. I., Baratova, L. A., and Sud'ina, G. F. (2022) Inhibitor of hyaluronic acid synthesis 4-methylumbelliferone suppresses the secretory processes that ensure the invasion of neutrophils into tissues and induce inflammation, *Biomedicines*, **10**, 314, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020314>.
50. Hasegawa, K., Saga, R., Ohuchi, K., Kuwahara, Y., Tomita, K., Okumura, K., Sato, T., Fukumoto, M., Tsuruga, E., and Hosokawa, Y. (2022) 4-Methylumbelliferone enhances radiosensitizing effects of radioresistant oral squamous cell carcinoma cells via hyaluronan synthase 3 suppression, *Cells*, **11**, 3780, <https://doi.org/10.3390/cells11233780>.
51. Quaranta, S., Rossetti, S., and Camarri, E. (1984) Double-blind clinical study on hymecromone and placebo in motor disorders of the bile ducts after cholecystectomy, *Clin. Ter.*, **108**, 513-517.
52. Krawzak, H. W., Heistermann, H. P., Andrejewski, K., and Hohlbach, G. (1995) Postprandial bile-duct kinetics under the influence of 4-methylumbelliferone (hymecromone), *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **33**, 569-572.

53. Yoon, Y., Chae, M. K., Lee, E. J., and Yoon, J. S. (2020) 4-Methylumbelliferone suppresses hyaluronan and adipogenesis in primary cultured orbital fibroblasts from Graves' orbitopathy, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **258**, 1095-1102, <https://doi.org/10.1007/s00417-019-04528-3>.
54. Marshall, P. L., Nagy, N., Kaber, G., Barlow, G. L., Ramesh, A., Xie, B. J., Linde, M. H., Haddock, N. L., Lester, C. A., Tran, Q. L., de Vries, C. R., Hargil, A., Malkovskiy, A. V., Gurevich, I., Martinez, H. A., Kuipers, H. F., Yadava, K., Zhang, X., Evanko, S. P., Gebe, J. A., Wang, X., Vernon, R. B., de la Motte, C., Wight, T. N., Engleman, E. G., Krams, S. M., Meyer, E. H., and Bollyky, P. L. (2021) Hyaluronan synthesis inhibition impairs antigen presentation and delays transplantation rejection, *Matrix Biol.*, **96**, 69-86, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2020.12.001>.
55. Gebe, J. A., Gooden, M. D., Workman, G., Nagy, N., Bollyky, P. L., Wight, T. N., and Vernon, R. B. (2020) Modulation of hyaluronan synthases and involvement of T cell-derived hyaluronan in autoimmune responses to transplanted islets, *Matrix Biol. Plus*, **9**, 100052, <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100052>.
56. Imani, J., Liu, K., Cui, Y., Assaker, J. P., Han, J., Ghosh, A. J., Ng, J., Shrestha, S., Lamattina, A. M., Louis, P. H., Hentschel, A., Esposito, A. J., Rosas, I. O., Liu, X., Perrella, M. A., Azzi, J., Visner, G., and El-Chemaly, S. (2021) Blocking hyaluronan synthesis alleviates acute lung allograft rejection, *JCI Insight.*, **6**, e142217, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142217>.
57. Uchakina, O. N., Ban, H., and McKallip, R. J. (2013) Targeting hyaluronic acid production for the treatment of leukemia: treatment with 4-methylumbelliferone leads to induction of MAPK-mediated apoptosis in K562 leukemia, *Leuk. Res.*, **37**, 1294-1301, <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.07.009>.
58. Uchakina, O. N., Ban, H., Hostetler, B. J., and McKallip, R. J. (2016) Inhibition of hyaluronic acid formation sensitizes chronic myelogenous leukemia to treatment with doxorubicin, *Glycobiology*, **26**, 1171-1179, <https://doi.org/10.1093/glycob/cww064>.
59. Lombardía, S. L., Díaz, M., Papademetrio, D. L., Pibuel, M., Álvarez, É., and Hajos, S. E. (2017) 4-methylumbelliferone and imatinib combination enhances senescence induction in chronic myeloid leukemia cell lines, *Invest. New Drugs*, **35**, 1-10, <https://doi.org/10.1007/s10637-016-0397-9>.
60. Cho, H., Matsumoto, S., Fujita, Y., Kuroda, A., Menju, T., Sonobe, M., Kondo, N., Torii, I., Nakano, T., Lara, P. N., Gandara, D. R., Date, H., and Hasegawa, S. (2017) Trametinib plus 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects by ERK blockade and CD44 downregulation and affects PD-1 and PD-L1 in malignant pleural mesothelioma, *J. Thorac. Oncol.*, **12**, 477-490, <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.023>.
61. Collum, S. D., Chen, N. Y., Hernandez, A. M., Hanmandlu, A., Sweeney, H., Mertens, T. C. J., Weng, T., Luo, F., Molina, J. G., Davies, J., Horan, I. P., Morrell, N. W., Amione-Guerra, J., Al-Jabbari, O., Youker, K., Sun, W., Rajadas, J., Bollyky, P. L., Akkanti, B. H., Jyothula, S., Sinha, N., Guha, A., and Karmouty-Quintana, H. (2017) Inhibition of hyaluronan synthesis attenuates pulmonary hypertension associated with lung fibrosis, *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 3284-3301, <https://doi.org/10.1111/bph.13947>.
62. Karalis, T. T., Heldin, P., Vynios, D. H., Neill, T., Buraschi, S., Iozzo, R. V., Karamanos, N. K., and Skandalis, S. S. (2019) Tumor-suppressive functions of 4-MU on breast cancer cells of different ER status: regulation of hyaluronan/HAS2/CD44 and specific matrix effectors, *Matrix Biol.*, **78-79**, 118-138, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.04.007>.
63. Choi, B. H., Ryoo, I., Sim, K. H., Ahn, H. J., Lee, Y. J., and Kwak, M. K. (2022) High levels of hyaluronic acid synthase-2 mediate NRF2-driven chemoresistance in breast cancer cells, *Biomol. Ther. (Seoul)*, **30**, 368-379, <https://doi.org/10.4062/biomolther.2022.074>.
64. Morera, D. S., Hennig, M. S., Talukder, A., Lokeshwar, S. D., Wang, J., Garcia-Roig, M., Ortiz, N., Yates, T. J., Lopez, L. E., Kallifatidis, G., Kramer, M. W., Jordan, A. R., Merseburger, A. S., Manoharan, M., Soloway, M. S., Terris, M. K., and Lokeshwar, V. B. (2017) Hyaluronic acid family in bladder cancer: potential prognostic biomarkers and therapeutic targets, *Br. J. Cancer*, **117**, 1507-1517, <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.318>.
65. Ikuta, K., Ota, T., Zhuo, L., Urakawa, H., Kozawa, E., Hamada, S., Kimata, K., Ishiguro, N., and Nishida, Y. (2017) Antitumor effects of 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthesis inhibitor, on malignant peripheral nerve sheath tumor, *Int. J. Cancer*, **140**, 469-479, <https://doi.org/10.1002/ijc.30460>.
66. Piccioni, F., Malvicini, M., Garcia, MG., Rodriguez, A., Atorrasagasti, C., Kippes, N., Piedra Buena, I. T., Rizzo, M. M., Bayo, J., Aquino, J., Viola, M., Passi, A., Alaniz, L., and Mazzolini, G. (2012) Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice, *Glycobiology*, **22**, 400-410, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr158>.
67. Piccioni, F., Fiore, E., Bayo, J., Atorrasagasti, C., Peixoto, E., Rizzo, M., Malvicini, M., Tirado-González, I., García, M. G., Alaniz, L., and Mazzolini, G. (2015) 4-methylumbelliferone inhibits hepatocellular carcinoma growth by decreasing IL-6 production and angiogenesis, *Glycobiology*, **25**, 825-835, <https://doi.org/10.1093/glycob/cvw023>.
68. Rodríguez, M. M., Onorato, A., Cantero, M. J., Domínguez, L., Bayo, J., Fiore, E., García, M., Atorrasagasti, C., Canbay, A., Malvicini, M., and Mazzolini, G. D. (2021) 4-methylumbelliferone-mediated polarization of

- M1 macrophages correlate with decreased hepatocellular carcinoma aggressiveness in mice, *Sci. Rep.*, **11**, 6310, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85491-0>.
69. Weiz, G., Molejon, M.I., Malvicini, M., Sukowati, C. H. C., Tiribelli, C., Mazzolini, G., and Breccia, J. D. (2022) Glycosylated 4-methylumbelliferone as a targeted therapy for hepatocellular carcinoma, *Liver Int.*, **42**, 444-457, <https://doi.org/10.1111/liv.15084>.
70. Yoshihara, S., Kon, A., Kudo, D., Nakazawa, H., Kakizaki, I., Sasaki, M., Endo, M., and Takagaki, K. (2005) A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells, *FEBS Lett.*, **579**, 2722-2726, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.079>.
71. Yang, Y. M., Wang, Z., Matsuda, M., and Seki, E. (2021) Inhibition of hyaluronan synthesis by 4-methylumbelliferone ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in choline-deficient L-amino acid-defined diet-induced murine model, *Arch. Pharm. Res.*, **44**, 230-240, <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01309-7>.
72. Nakazawa, H., Yoshihara, S., Kudo, D., Morohashi, H., Kakizaki, I., Kon, A., Takagaki, K., and Sasaki, M. (2006) 4-methylumbelliferone, a hyaluronan synthase suppressor, enhances the anticancer activity of gemcitabine in human pancreatic cancer cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **57**, 165-170, <https://doi.org/10.1007/s00280-005-0016-5>.
73. Yoshida, E., Kudo, D., Nagase, H., Shimoda, H., Suto, S., Negishi, M., Kakizaki, I., Endo, M., and Hakamada, K. (2016) Antitumor effects of the hyaluronan inhibitor 4-methylumbelliferone on pancreatic cancer, *Oncol. Lett.*, **12**, 2337-2344, <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4930>.
74. Nagase, H., Kudo, D., Suto, A., Yoshida, E., Suto, S., Negishi, M., Kakizaki, I., and Hakamada, K. (2017) 4-methylumbelliferone suppresses hyaluronan synthesis and tumor progression in SCID mice intra-abdominally inoculated with pancreatic cancer cells, *Pancreas*, **46**, 190-197, <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000741>.
75. Cheng, X. B., Sato, N., Kohi, S., Koga, A., and Hirata, K. (2018) 4-Methylumbelliferone inhibits enhanced hyaluronan synthesis and cell migration in pancreatic cancer cells in response to tumor-stromal interactions, *Oncol. Lett.*, **15**, 6297-6301, <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8147>.
76. Yoshida, E., Kudo, D., Nagase, H., Suto, A., Shimoda, H., Suto, S., Kakizaki, I., Endo, M., and Hakamada, K. (2018) 4-methylumbelliferone decreases the hyaluronan-rich extracellular matrix and increases the effectiveness of 5-fluorouracil, *Anticancer Res.*, **38**, 5799-5804, <https://doi.org/10.21873/anticanres.12919>.
77. Kudo, Y., Kohi, S., Hirata, K., Goggins, M., and Sato, N. (2019) Hyaluronan activated-metabolism phenotype (HAMP) in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Oncotarget*, **10**, 5592-5604, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27172>.
78. Suto, A., Kudo, D., Yoshida, E., Nagase, H., Suto, S., Mimura, J., Itoh, K., and Hakamada, K. (2019) Increase of tumor infiltrating  $\gamma\delta$  T-cells in pancreatic ductal adenocarcinoma through remodeling of the extracellular matrix by a hyaluronan synthesis suppressor, 4-methylumbelliferone, *Pancreas*, **48**, 292-298, <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001211>.
79. Benitez, A., Yates, T. J., Shamaldevi, N., Bowen, T., Lokeshwar, V. B. (2013) Dietary supplement hymecromone and sorafenib: a novel combination for the control of renal cell carcinoma, *J. Urol.*, **190**, 285-290, <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.12.011>.
80. Colombaro, V., Declèves, A. E., Jadot, I., Voisin, V., Giordano, L., Habsch, I., Nonclercq, D., Flamion, B., and Caron, N. (2013) Inhibition of hyaluronan is protective against renal ischaemia-reperfusion injury, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **28**, 2484-2493, <https://doi.org/10.1093/ndt/gft314>.
81. Jordan, A. R., Wang, J., Yates, T. J., Hasanali, S. L., Lokeshwar, S. D., Morera, D. S., Shamaladevi, N., Li, C. S., Klaassen, Z., Terris, M. K., Thangaraju, M., Singh, A. B., Soloway, M. S., and Lokeshwar, V. B. (2020) Molecular targeting of renal cell carcinoma by an oral combination, *Oncogenesis*, **9**, 52, <https://doi.org/10.1038/s41389-020-0233-0>.
82. Selman, G., Martinez, L., Lightle, A., Aguilar, A., Woltmann, D., Xiao, Y., Vazquez-Padron, R. I., and Salman, L. H. (2021) A hyaluronan synthesis inhibitor delays the progression of diabetic kidney disease in a mouse experimental model, *Kidney360*, **2**, 809-818, <https://doi.org/10.34067/KID.0004642020>.
83. Wang, J., Jordan, A. R., Zhu, H., Hasanali, S. L., Thomas, E., Lokeshwar, S. D., Morera, D. S., Alexander, S., McDaniels, J., Sharma, A., Aguilar, K., Sarcan, S., Zhu, T., Soloway, M. S., Terris, M. K., Thangaraju, M., Lopez, L. E., and Lokeshwar, V. B. (2022) Targeting hyaluronic acid synthase-3 (HAS3) for the treatment of advanced renal cell carcinoma, *Cancer Cell Int.*, **22**, 421, <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02818-1>.
84. Lokeshwar, V. B., Lopez, L. E., Munoz, D., Chi, A., Shirodkar, S. P., Lokeshwar, S. D., Escudero, D. O., Dhir, N., and Altman, N. (2010) Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells, *Cancer Res.*, **70**, 2613-2623, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3185>.
85. Yates, T. J., Lopez, L. E., Lokeshwar, S. D., Ortiz, N., Kallifatidis, G., Jordan, A., Hoye, K., Altman, N., and Lokeshwar, V. B. (2015) Dietary supplement 4-methylumbelliferone: an effective chemopreventive and therapeutic agent for prostate cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, **107**, djv085, <https://doi.org/10.1093/jnci/djv085>.

86. Saga, R., Monzen, S., Chiba, M., Yoshino, H., Nakamura, T., and Hosokawa, Y. (2017) Anti-tumor and anti-invasion effects of a combination of 4-methylumbelliferone and ionizing radiation in human fibrosarcoma cells, *Oncol. Lett.*, **13**, 410-416, <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5385>.
87. Saga, R., Hasegawa, K., Murata, K., Chiba, M., Nakamura, T., Okumura, K., Tsuruga, E., and Hosokawa, Y. (2019) Regulation of radiosensitivity by 4-methylumbelliferone via the suppression of interleukin-1 in fibrosarcoma cells, *Oncol. Lett.*, **17**, 3555-3561, <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9990>.
88. Hasegawa, K., Saga, R., Takahashi, R., Fukui, R., Chiba, M., Okumura, K., Tsuruga, E., and Hosokawa, Y. (2020) 4-methylumbelliferone inhibits clonogenic potency by suppressing high molecular weight-hyaluronan in fibrosarcoma cells, *Oncol. Lett.*, **19**, 2801-2808, <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11370>.
89. Saga, R., Matsuya, Y., Takahashi, R., Hasegawa, K., Date, H., and Hosokawa, Y. (2021) 4-Methylumbelliferone administration enhances radiosensitivity of human fibrosarcoma by intercellular communication, *Sci. Rep.*, **11**, 8258, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87850-3>.
90. Malvicini, M., Fiore, E., Ghiaccio, V., Piccioni, F., Rizzo, M., Olmedo, Bonadeo L., García, M., Rodríguez, M., Bayo, J., Peixoto, E., Atorrasagasti, C., Alaniz, L., Aquino, J., Matar, P., and Mazzolini, G. (2015) Tumor microenvironment remodeling by 4-methylumbelliferone boosts the antitumor effect of combined immunotherapy in murine colorectal carcinoma, *Mol. Ther.*, **23**, 1444-1455, <https://doi.org/10.1038/mt.2015.112>.
91. Zhan, D., Yalcin, F., Ma, D., Fu, Y., Wei, S., Lal, B., Li, Y., Dzaye, O., Laterra, J., Ying, M., Lopez-Bertoni, H., and Xia, S. (2021) Targeting UDP- $\alpha$ -D-glucose 6-dehydrogenase alters the CNS tumor immune microenvironment and inhibits glioblastoma growth, *Genes Dis.*, **9**, 717-730, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.08.008>.
92. Olivares, C. N., Alaniz, L. D., Menger, M. D., Barañao, R. I., Laschke, M. W., and Meresman, G. F. (2016) Inhibition of hyaluronic acid synthesis suppresses angiogenesis in developing endometriotic lesions, *PLoS One*, **11**, e0152302, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152302>.
93. McLaughlin, J. E., Santos, M. T., Binkley, P. A., Sultana, M., Tekmal, R. R., Schenken, R. S., and Knudtson, J. F. (2020) Inhibition of hyaluronic acid synthesis decreases endometrial cell attachment, migration, and invasion, *Reprod. Sci.*, **27**, 1058-1063, <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00100-w>.
94. Olivares, C. N., Ricci, A. G., Bilotas, M. A., Alaniz, L., Barañao, R. I., and Meresman, G. F. (2023) Effects of pharmacological inhibition of hyaluronic acid synthesis on experimental endometriosis, *Eur. J. Clin. Invest.*, **53**, e13899, <https://doi.org/10.1111/eci.13899>.
95. Tamura, R., Yokoyama, Y., Yoshida, H., Imaizumi, T., and Mizunuma, H. (2014) 4-Methylumbelliferone inhibits ovarian cancer growth by suppressing thymidine phosphorylase expression, *J. Ovarian Res.*, **7**, 94, <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0094-2>.
96. Lokman, N. A., Price, Z. K., Hawkins, E. K., Macpherson, A. M., Oehler, M. K., and Ricciardelli, C. (2019) 4-Methylumbelliferone inhibits cancer stem cell activation and overcomes chemoresistance in ovarian cancer, *Cancers (Basel)*, **11**, 1187, <https://doi.org/10.3390/cancers11081187>.
97. An, G., Park, S., Lee, M., Lim, W., and Song, G. (2020) Antiproliferative effect of 4-methylumbelliferone in epithelial ovarian cancer cells is mediated by disruption of intracellular homeostasis and regulation of PI3K/AKT and MAPK signaling, *Pharmaceutics*, **12**, 640, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070640>.
98. Spinelli, F. M., Vitale, D. L., Icardi, A., Caon, I., Brandone, A., Giannoni, P., Saturno, V., Passi, A., García, M., Sevic, I., and Alaniz, L. (2019) Hyaluronan preconditioning of monocytes/macrophages affects their angiogenic behavior and regulation of TSG-6 expression in a tumor type-specific manner, *FEBS J.*, **286**, 3433-3449, <https://doi.org/10.1111/febs.14871>.
99. Höbarth, K., Maier, U., and Marberger, M. (1992) Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin C and adjuvant hyaluronidase, *Eur. Urol.*, **21**, 206-210, <https://doi.org/10.1159/000474839>.
100. Ruponen, M., Honkakoski, P., Tammi, M., and Urtti, A. (2004) Cell-surface glycosaminoglycans inhibit cation-mediated gene transfer, *J. Gene Med.*, **6**, 405-414, <https://doi.org/10.1002/jgm.522>.
101. Miyamoto, H., Murakami, T., Tsuchida, K., Sugino, H., Miyake, H., and Tashiro, S. (2004) Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins, *Pancreas*, **28**, 38-44, <https://doi.org/10.1097/00006676-200401000-00006>.
102. Fang, H., and Declerck, Y. A. (2013) Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials, *Cancer Res.*, **73**, 4965-4977, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0661>.
103. Hedin, C. H., Rubin, K., Pietras, K., and Ostman, A. (2004) High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 806-813, <https://doi.org/10.1038/nrc1456>.
104. Padera, T. P., Stoll, B. R., Tooredman, J. B., Capen, D., di Tomaso, E., and Jain, R. K. (2004) Pathology: cancer cells compress intratumour vessels, *Nature*, **427**, 695, <https://doi.org/10.1038/427695a>.
105. Toole, B. P. (2004) Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 528-539, <https://doi.org/10.1038/nrc1391>.

106. Friman, T., Gustafsson, R., Stuhr, LB., Chidiac, J., Hedin, N. E., Reed, R. K., Oldberg, A., and Rubin, K. (2012) Increased fibrosis and interstitial fluid pressure in two different types of syngeneic murine carcinoma grown in integrin  $\beta 3$ -subunit deficient mice, *PLoS One*, 7, e34082, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034082>.
107. Singha, N. C., Nekoroski, T., Zhao, C., Symons, R., Jiang, P., Frost, G. I., Huang, Z., and Shepard, H. M. (2015) Tumor-associated hyaluronan limits efficacy of monoclonal antibody therapy, *Mol. Cancer Ther.*, **14**, 523-532, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0580>.
108. Twarock, S., Reichert, C., Bach, K., Reiners, O., Kretschmer, I., Gorski, D. J., Gorges, K., Grandoch, M., and Fischer, J. W. (2019) Inhibition of the hyaluronan matrix enhances metabolic anticancer therapy by dichloroacetate *in vitro* and *in vivo*, *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 4474-4490, <https://doi.org/10.1111/bph.14808>.
109. Abildgaard, C., Rizza, S., Christiansen, H., Schmidt, S., Dahl, C., Abdul-Al, A., Christensen, A., Filomeni, G., and Guldberg, P. (2021) Screening of metabolic modulators identifies new strategies to target metabolic reprogramming in melanoma, *Sci. Rep.*, **11**, 4390, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83796-8>.
110. Anand, V., Khandelwal, M., Appunni, S., Gupta, N., Seth, A., Singh, P., Mathur, S., and Sharma, A. (2019) CD44 splice variant (CD44v3) promotes progression of urothelial carcinoma of bladder through Akt/ERK/STAT3 pathways: novel therapeutic approach, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **145**, 2649-2661, <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03024-9>.
111. Rodríguez, M. M., Fiore, E., Bayo, J., Atorrasagasti, C., García, M., Onorato, A., Domínguez, L., Malvicini, M., and Mazzolini, G. (2018) 4Mu decreases CD47 expression on hepatic cancer stem cells and primes a potent antitumor T cell response induced by interleukin-12, *Mol. Ther.*, **26**, 2738-2750, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.09.012>.
112. Houatondji, L., Ferreira De Matos, C., Lebossé, F., Quantin, X., Lesage, C., Palassin, P., Rivet, V., Faure, S., Pageaux, G. P., Assenat, É., Alric, L., Zahhaf, A., Larrey, D., Witkowski Durand Viel, P., Riviere, B., Janick, S., Dalle, S., Maria, A. T. J., Comont, T., and Meunier, L. (2023) Clinical pattern of checkpoint inhibitor-induced liver injury in a multicentre cohort, *JHEP Rep.*, **5**, 100719, <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100719>.
113. Tawbi, H. A., Schadendorf, D., Lipson, E. J., Ascierto, P. A., Matamala, L., Castillo, Gutiérrez, E., Rutkowski, P., Gogas, H. J., Lao, C. D., De Menezes, J. J., Dalle, S., Arance, A., Grob, J. J., Srivastava, S., Abaskharoun, M., Hamilton, M., Keidel, S., Simonsen, K. L., Sobiesk, A. M., Li B., Hodi, F. S., and Long, G. V. (2022) Relatlimab and nivolumab versus nivolumab in untreated advanced melanoma, *N. Engl. J. Med.*, **386**, 24-34, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2109970>.
114. Malnick, S. D. H., Abdullah, A., and Neuman, M. G. (2021) Checkpoint Inhibitors and Hepatotoxicity, *Biomedicines*, **9**, 101, <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020101>.
115. De Martin, E., Michot, JM., Rosmorduc, O., Guettier, C., and Samuel, D. (2020) Liver toxicity as a limiting factor to the increasing use of immune checkpoint inhibitors, *JHEP Rep.*, **2**, 100170, <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100170>.
116. Hernandez, N., and Bessone, F. (2022) Hepatotoxicity induced by biological agents: clinical features and current controversies, *J. Clin. Transl. Hepatol.*, **10**, 486-495, <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00243>.
117. Shah, P., Sundaram, V., and Björnsson, E. (2020) Biologic and checkpoint inhibitor-induced liver injury: a systematic literature review, *Hepatol. Commun.*, **4**, 172-184, <https://doi.org/10.1002/hep4.1465>.
118. Peeraphatdit, T. B., Wang, J., Odenwald, M. A., Hu, S., Hart, J., and Charlton, M. R. (2020) Hepatotoxicity from immune checkpoint inhibitors: a systematic review and management recommendation, *Hepatology*, **72**, 315-329, <https://doi.org/10.1002/hep.31227>.
119. Delire, B., De Martin, E., Meunier, L., Larrey, D., and Horsmans, Y. (2022) Immunotherapy and gene therapy: new challenges in the diagnosis and management of drug-induced liver injury, *Front. Pharmacol.*, **12**, 786174, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.786174>.
120. Haanen, J., Obeid, M., Spain, L., Carbonnel, F., Wang, Y., Robert, C., Lyon, A. R., Wick, W., Kostine, M., Peters, S., Jordan, K., and Larkin, J. (2022) Management of toxicities from immunotherapy: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann. Oncol.*, **33**, 1217-1238, <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.001>.
121. Puzanov, I., Diab, A., Abdallah, K., Bingham, C. O. 3rd., Brogdon, C., Dadu, R., Hamad, L., Kim, S., Lacouture, M. E., LeBoeuf, N. R., Lenihan, D., Onofrei, C., Shannon, V., Sharma, R., Silk, A. W., Skondra, D., Suarez-Almazor, M. E., Wang, Y., Wiley, K., Kaufman, H. L., and Ernstoff, M. S. (2017) Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group, *J. Immunother. Cancer*, **5**, 95, <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0300-z>.
122. Brahmer, J. R., Lacchetti, C., Schneider, B. J., Atkins, M. B., Brassil, K. J., Caterino, J. M., Chau, I., Ernstoff, M. S., Gardner, J. M., Ginex, P., Hallmeyer, S., Holter Chakrabarty, J., Leighl, N. B., Mammen, J. S., McDermott, D. F., Naing, A., Nastoupil, L. J., Phillips, T., Porter, L. D., Puzanov, I., Reichner, C. A., Santomasso, B. D., Seigel, C., Spira, A., Suarez-Almazor, M. E., Wang, Y., Weber, J. S., Wolchok, J. D., and Thompson, J. A. (2018) Management of immune-related adverse events in patients treated with immune checkpoint inhibitor therapy: American society of clinical oncology clinical practice guideline, *J. Clin. Oncol.*, **36**, 1714-1768, <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.77.6385>.

123. Dougan, M., Wang, Y., Rubio-Tapia, A., and Lim, J. K. (2021) AGA Clinical practice update on diagnosis and management of immune checkpoint inhibitor colitis and hepatitis: expert review, *Gastroenterology*, **160**, 1384-1393, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.08.063>.
124. Doherty, G. J., Duckworth, A. M., Davies, S. E., Mells, G. F., Brais, R., Harden, S. V., Parkinson, C. A., and Corrie, P. G. (2017) Severe steroid-resistant anti-PD1 T-cell checkpoint inhibitor-induced hepatotoxicity driven by biliary injury, *ESMO Open*, **2**, e000268, <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2017-000268>.
125. Onishi, S., Tajika, M., Bando, H., Matsubara, Y., Hosoda, W., Muro, K., and Niwa, Y. (2020) Ursodeoxycholic acid and bezafibrate were useful for steroid-refractory, immune-related hepatitis: a case report, *J. Med. Case Rep.*, **14**, 230, <https://doi.org/10.1186/s13256-020-02541-3>.
126. Sato, K., Hayashi, M., Abe, K., Fujita, M., Takahashi, A., and Ohira, H. (2020) Pembrolizumab-induced sclerosing cholangitis in a lung adenocarcinoma patient with a remarkable response to chemotherapy: a case report, *Clin. J. Gastroenterol.*, **13**, 1310-1314, <https://doi.org/10.1007/s12328-020-01178-5>.
127. Robles-Díaz, M., Nezic, L., Vujic-Aleksic, V., and Björnsson, E. S. (2021) Role of ursodeoxycholic acid in treating and preventing idiosyncratic drug-induced liver injury. A systematic review, *Front. Pharmacol.*, **12**, 744488, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.744488>.
128. Cullen, S. N., Rust, C., Fleming, K., Edwards, C., Beuers, U., and Chapman, R. W. (2008) High dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis is safe and effective, *J. Hepatol.*, **48**, 792-800, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.12.023>.
129. Ma, H., Zeng, M., Han, Y., Yan, H., Tang, H., Sheng, J., Hu, H., Cheng, L., Xie, Q., Zhu, Y., Chen, G., Gao, Z., Xie, W., Wang, J., Wu, S., Wang, G., Miao, X., Fu, X., Duan, L., Xu, J., Wei, L., Shi, G., Chen, C., Chen, M., Ning, Q., Yao, C., and Jia, J. (2016) A multicenter, randomized, double-blind trial comparing the efficacy and safety of TUDCA and UDCA in Chinese patients with primary biliary cholangitis, *Medicine (Baltimore)*, **95**, e5391, <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000005391>.
130. Xiang, X., Yang, X., Shen, M., Huang, C., Liu, Y., Fan, X., and Yang, L. (2021) Ursodeoxycholic acid at 18-22 mg/kg/d showed a promising capacity for treating refractory primary biliary cholangitis, *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2021**, 6691425, <https://doi.org/10.1155/2021/6691425>.
131. Steen, E. H., Short, W. D., Li, H., Parikh, U. M., Blum, A., Templeman, N., Nagy, N., Bollyky, P. L., Keswani, S. G., and Balaji, S. (2021) Skin-specific knockdown of hyaluronan in mice by an optimized topical 4-methylumbellif erone formulation, *Drug Deliv.*, **28**, 422-432, <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1886376>.
132. Rilla, K., Pasonen-Seppänen, S., Rieppo, J., Tammi, M., and Tammi, R. (2004) The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor, *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 708-714, <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23409.x>.
133. Supp, D. M., Hahn, J. M., McFarland, K. L., and Glaser, K. (2014) Inhibition of hyaluronan synthase 2 reduces the abnormal migration rate of keloid keratinocytes, *J. Burn Care Res.*, **35**, 84-92, <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e3182a2a9dd>.
134. Kim, T., Kim, K. B., and Hyun, C. G. (2023) A 7-hydroxy 4-methylcoumarin enhances melanogenesis in B16-F10 melanoma cells, *Molecules*, **28**, 3039, <https://doi.org/10.3390/molecules28073039>.
135. Vassallo, J. D., Hicks, S. M., Born, S. L., and Daston, G. P. (2004) Roles for epoxidation and detoxification of coumarin in determining species differences in Clara cell toxicity, *Toxicol. Sci.*, **82**, 26-33, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh237>.
136. Egan, D., O'Kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., and Thornes, R. D. (1990) The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds, *Drug Metab. Rev.*, **22**, 503-529, <https://doi.org/10.3109/03602539008991449>.
137. Nagy, N., Gurevich, I., Kuipers, H. F., Ruppert, S. M., Marshall, P. L., Xie, B. J., Sun, W., Malkovskiy, A. V., Rajadas, J., Grandoch, M., Fischer, J. W., Frymoyer, A. R., Kaber, G., and Bollyky, P. L. (2019) 4-Methylumbel liferyl glucuronide contributes to hyaluronan synthesis inhibition, *J. Biol Chem.*, **294**, 7864-7877, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006166>.
138. Охлобыстин А. В., Уфимцева А. К. (2020) Применение гимекромона при заболеваниях желчевыводящих путей: возможности и перспективы, *Вопросы детской диетологии*, **18**, 66-74, <https://doi.org/10.20953/1727-5784-2020-5-66-74>.
139. Garrett, E. R., and Venitz, J. (1994) Comparisons of detections, stabilities, and kinetics of degradation of hymecromone and its glucuronide and sulfate metabolites, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 115-116, <https://doi.org/10.1002/jps.2600830128>.
140. Takeda, S., and Aburada, M. (1981) The choleric mechanism of coumarin compounds and phenolic compounds, *J. Pharmacobiodyn.*, **4**, 724-734, <https://doi.org/10.1248/bpb1978.4.724>.
141. Garrett, E. R., Venitz, J., Eberst, K., and Cerda, J. J. (1993) Pharmacokinetics and bioavailabilities of hymecromone in human volunteers, *Biopharm. Drug Dispos.*, **14**, 13-39, <https://doi.org/10.1002/bdd.2510140103>.

142. Marshall, M. E., Mohler, J. L., Edmonds, K., Williams, B., Butler, K., Ryles, M., Weiss, L., Urban, D., Bueschen, A., and Markiewicz, M. (1994) An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **120**, S39-S42, <https://doi.org/10.1007/BF01377124>.
143. Lake, B. G. (1999) Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment, *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 423-453, [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(99\)00010-1](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(99)00010-1).
144. Rosser, J. I., Nagy, N., Goel, R., Kaber, G., Demirdjian, S., Saxena, J., Bollyky, J. B., Frymoyer, A. R., Pacheco-Navarro, A. E., Burgener, E. B., Rajadas, J., Wang, Z., Arbach, O., Dunn, C. E., Kalinowski, A., Milla, C. E., and Bollyky, P. L. (2022) Oral hymecromone decreases hyaluronan in human study participants, *J. Clin. Invest.*, **132**, e157983, <https://doi.org/10.1172/JCI157983>.
145. Селезнева Э. Я., Мечетина Т. А., Орлова Ю. Н., Коричева Е. С., Войнован И. Н., Безаева И. В., Дубцова Е. А., Бордин Д. С. (2016) Сравнительное исследование эффективности монотерапии УДХК и комбинации УДХК с гимекромоном у больных с билиарным сладжем 2 стадии, *Экспериментальная клиническая гастроэнтерология*, **10**, 94-98.
146. Hoffmann, R. M., Schwarz, G., Pohl, C., Ziegenhagen, D. J., and Kruis, W. (2005) Bile acid-independent effect of hymecromone on bile secretion and common bile duct motility, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **130**, 1938-1943, <https://doi.org/10.1055/s-2005-872606>.
147. Abate, A., Dimartino, V., Spina, P., Costa, P. L., Lombardo, C., Santini, A., Del Piano, M., and Alimonti, P. (2001) Hymecromone in the treatment of motor disorders of the bile ducts: a multicenter, double-blind, placebo-controlled clinical study, *Drugs Exp. Clin. Res.*, **27**, 223-231.
148. Camarri, E., Marchettini, G. (1988) Hymecromone in the treatment of symptoms following surgery of the bile ducts, *Recenti Prog. Med.*, **79**, 198-202.
149. Ishizuka, S., Askew, E. B., Ishizuka, N., Knudson, C. B., and Knudson, W. (2016) 4-methylumbelliferone diminishes catabolically activated articular chondrocytes and cartilage explants via a mechanism independent of hyaluronan inhibition, *J. Biol. Chem.*, **291**, 12087-12104, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.709683>.

## 4-METHYLUMBELLIFERONE, AN HYALURONAN SYNTHASE INHIBITOR, PREVENTS THE DEVELOPMENT OF ONCOLOGICAL, INFLAMMATORY, DEGENERATIVE AND AUTOIMMUNE DISORDERS

### Review

**V. V. Fedorova<sup>1</sup>, A. Tsitrina<sup>2</sup>, N. Halimani<sup>1</sup>, and Y. V. Kotelevtsev<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, 121205 Moscow, Russia; e-mail: y.kotelevtsev@skoltech.ru

<sup>2</sup> Ben-Gurion University of the Negev, 8410501 Be'er Sheva, Israel

In present review we consider numerous experiments on tissue cultures, animal models of diseases and the first clinical studies providing the prospects of creating new drugs based on 4-MU. We believe that along with many receptors and transcription factors, the main pharmacological target of 4-MU is the hyaluronan synthase, which produces the main component of the extracellular matrix, glycosaminoglycan, hyaluronic acid (HA). The pharmacological effects of 4-MU in oncological, autoimmune, degenerative and hypercompensated regenerative processes (fibrosis, scarring) are associated with inhibition of HA synthesis. Clinical drugs based on 4-MU will be the first in the class for the treatment of a wide range of diseases.

**Keywords:** 4-methylumbelliferone, odeston, hymecromone, hyaluronan synthase inhibition, hyaluronan synthase

## ПЕРЕСМОТР ПРЕДСТАВЛЕНИЙ ОБ ЭВОЛЮЦИОННОМ ПРОИСХОЖДЕНИИ, ФУНКЦИИ И ЛЕЧЕНИИ РАКА

### Обзор

© 2025 А.В. Лихтенштейн

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: [alicht@mail.ru](mailto:alicht@mail.ru)

Поступила в редакцию 29.09.2024

После доработки 29.09.2024

Принята к публикации 08.12.2024

Несмотря на значительные достижения фундаментальной онкологии, практические результаты остаются неудовлетворительными. Это несоответствие отчасти объясняется исключительной сосредоточенностью исследователей на процессах внутри раковой клетки, что приводит к недооценке рака как системного заболевания. Очевидно, что необходим разумный баланс между двумя альтернативными методологическими подходами: редукционизмом, который предполагает разделение сложного явления на элементы, подлежащие детальному изучению, и холизмом, подчеркивающим необходимость изучения сложной системы как единого целого. Последовательный холистический подход приводит к представлению о раке как особом органе, что стимулирует обсуждение его функции и эволюционной роли. В статье рассматриваются следующие вопросы: рак как механизм очищающей селекции генофонда, соотношение между наследственным и спорадическим раком, раковый интерактом, роль метастазирования в летальном исходе. Предполагается, что нейтрализация ракового интерактома может стать альтернативной стратегией лечения злокачественных опухолей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** война против рака, происхождение рака, лечение рака, отличительные признаки рака, феноптоз, злокачественность рака, стратегия нейтрализации.

DOI: 10.31857/S0320972525010023 EDN: CQRSYR

Памяти В.П. Скулачева

### ВВЕДЕНИЕ

Недавняя публикация «Why do cancer patients die?» [1] открывает новую рубрику «Roadmap Articles», в которой редакция «Nature Reviews Cancer» планирует помещать статьи, открывающие новые подходы в исследовании и лечении рака [2]. Авторы работы констатируют, что непосредственные причины смерти онкологического больного остаются малоизученными, и это препятствует разработке новых методов лечения. Предполагается, что соответствующие эксперименты будут способствовать прогрессу фундаментальной онкологии и улучшению клинической практики.

Тот же вопрос («Отчего погибает онкологический больной?») был задан 10 годами ранее как приглашение к обсуждению проблем взаимоот-

ношений опухоли и организма не только с утилитарно-медицинской, но и с биологической точки зрения [3]. Действительно, понимание механизма гибели может открыть много возможностей для лечения рака путем блокирования различных стадий этого процесса, тогда как незнание этого механизма обрекает врача на единственную возможную стратегию лечения – физическое уничтожение раковой клетки. Именно этот подход реализуется сегодня, каким бы сложным, трудным и болезненным он ни был. Концентрация внимания онкологического «мейнстрима» на внутриклеточных процессах [4], обусловленная надеждой найти глубоко спрятанные уязвимости раковой клетки, постоянно множит число ее отличительных признаков («hallmarks») [5–8], но при этом отсутствуют попытки связать их с клиническими проявлениями заболевания, такими как слабость и потеря веса, хроническое воспаление, анорексия, кахексия, анемия, коагулопатия, нетоз, множественная органная недостаточность [9–18].

Сегодня, как и 20 лет назад, «исследования рака имеют тенденцию фокусироваться на отдельных клеточных механизмах, практически игнорируя все, что происходит в организме в целом» [19]. В результате, несмотря на многие замечательные достижения фундаментальной онкологии, укрепляется мнение, что исследования рака находятся на пороге смены парадигм [20]: практические достижения остаются ограниченными, стоимость индивидуализированной терапии неприемлемо высока, главная надежда по-прежнему на искусство хирурга.

Несоответствие между достижениями фундаментальной и практической онкологии представляется, по крайней мере частично, следствием торжества редукционистского подхода в ущерб холизму [21]. (Этот конфликт, как в древнеиндийской притче о слепых мудрецах, ощупывающих слона, заключается в том, что глубокое погружение в детали может увести исследователя от понимания объекта в целом.) Холистический подход использует эволюционную перспективу при изучении взаимоотношений опухоли и организма [22]. Согласно общепринятой точке зрения, рак – следствие несовершенства эволюции и результат случайных мутаций, приводящих к нарушению межклеточной кооперации; раковые клетки – «обманщики» (cheaters), вернувшиеся к своему исходному одноклеточному образу жизни [23, 24]. По механизму дарвиновской эволюции они эгоистично реплицируются, конкурируют за выживание, распространяются по организму и достигают репродуктивного успеха за его счет [25–27].

В противовес общепринятым мнению, две статьи открыли онкологическому сообществу «слона» – рак как особый орган [28, 29]. Действительно, опухоль отвечает формальному определению органа как «анатомически дискретной совокупности тканей, предназначеннной для выполнения специфических функций» [28], и обладает соответствующими атрибутами – сложной иерархической структурой, зачастую имитирующей структуру нормальной ткани [30], наличием стволовых и дифференцированных клеток, определенными стадиями развития и интеграцией с системами организма. Рак эволюционно консервативен: возникнув, по-видимому, одновременно с многоклеточными организмами около миллиарда лет назад, он поражает большинство видов животных [24, 27, 31].

Концепция «рак как орган» означает радикальный отход от общепринятых представлений. Но хотя этот термин и вошел в научный обиход (показательно признание того, что сложность раковой опухоли может превышать сложность нормальных тканей [6]), произошедшая смена парадигм осталась практически незамеченной.

Причина, видимо, в том, что за первым решающим шагом (признанием принципиально иной, чем считалось ранее, природы этого феномена) не последовал второй, необходимый и очевидный – обсуждение функции, породившей этот орган (невозможно изучать орган в отрыве от его функции и вне эволюционной перспективы). В данной работе сделана попытка восполнить этот пробел: наследственный рак рассматривается как механизм очистительной селекции генофонда, спорадический рак – как побочный продукт наследственного рака, а вредоносность раковой клетки – как ее главное отличительное свойство. Предполагается, что нейтрализация ракового интерактома может стать альтернативной стратегией лечения.

## ЭВОЛЮЦИОННОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ РАКА

Ранние предположения, что рак выполняет функцию очищающего отбора [22, 32–35], не получили развития, поскольку большинство особей, которых убивает рак, находятся в постстрепродуктивном возрасте [36]. Однако концепция «рак как орган» возрождает дискуссию, поскольку каждый орган имеет эволюционную основу своего существования.

Есть два типа рака (наследственный и спорадический), и только первый способен осуществлять отрицательный отбор. Наследственный рак является следствием герминальной мутации в одном из нескольких десятков критически важных генов [34, 37], участвующих в reparации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптозе [38]. Герминальная драйверная мутация, присутствующая в каждой клетке организма (в том числе в его зародышевых клетках), создает высокий риск развития рака у ее носителя по двум причинам: во-первых, сокращается путь клеточной трансформации, и, во-вторых, будущая раковая клетка изначально находится в генетически неблагополучном микроокружении (ситуация «криминального “семени” в криминогенной “почве”» [39]). Таким образом, герминальная драйверная мутация создает двойную опасность: для организма (большой риск высокопенетрантного рака в раннем возрасте) и для вида (высокая вероятность передачи потомству). Однако реализация первой возможности предотвращает вторую (по выражению Стива Соммера, «рак убивает индивида и спасает вид» [33]). Наследственные раковые синдромы с менделевским доминантным наследованием резко снижают репродуктивный успех потомства [40] и очищают генофонд от мутантных аллелей (частота предрасполагающих аллелей в популяции < 1%) [41, 42].

Наследственный рак встречается относительно редко [43–51], составляя лишь ~1% онкологической заболеваемости. Возникает вопрос, как объяснить огромное количественное преобладание спорадического рака, который вызывается соматическими (не наследуемыми) мутациями, развивается на протяжении десятилетий и поражает в основном людей пострепродуктивного возраста. Действительно, зачем убивать стариков, не участвующих в эволюции? Возможно, ответ кроется в самом вопросе: рак убивает стариков именно потому, что они не участвуют в эволюции. В духе концепции антагонистической плейотропии [40, 52, 53] можно допустить, что рак присутствует в старости «по инерции», т.е. не по необходимости, а из-за невозможности от него избавиться (старость, не производящая потомства, не способна эволюционировать). Таким образом, спорадический рак, вероятно, является побочным продуктом наследственного рака, а его огромное количественное преобладание у *Homo sapiens* – плата за искусственно созданную комфортную жизнь (со всеми ее излишествами и вредными привычками), за постоянно растущую (~2,5 года в десятилетие) продолжительность жизни, обусловленную изменениями в гигиене, здравоохранении и питании [40], а также за обусловленное старением снижение трансформационной резистентности стволовых клеток [54]. В странах со средней продолжительностью жизни 75–80 лет риск заболеть раком составляет сегодня ~50%, а при продолжительности жизни 120 лет он составит, по прогнозам, почти 90% у мужчин и более 70% у женщин [55]. Высокая заболеваемость раком является, вероятно, особенностью *H. sapiens* – этого далеко не типичного представителя животного мира. У большинства других видов млекопитающих уровень заболеваемости гораздо ниже [27, 56].

Чтобы проиллюстрировать разницу между наследственной и спорадической формами, рассмотрим аналогию рака с механизмом самоуничтожения, встроенным в ракету; скрытый в нормальных условиях, он обнаруживает себя лишь при аварии. Этот механизм может работать штатно, предотвращая катастрофические последствия в редких случаях отказа ракеты (наследственный рак), но может дать сбой в результате старения и порчи деталей в процессе хранения. Чем продолжительнее хранение, тем чаще сбои (спорадический рак). Если в первом случае процесс инициируется одним из небольшого числа определенных отклонений от стандартной процедуры (и, соответственно, реализуется по нескольким четко определенным сценариям), то во втором случае его инициирует сочетание многих случайных дефектов, накапливающихся в течение длительного времени (и, соответственно, реализация

возможна во множестве вариантов). Эта аналогия может объяснить различия мутационных ландшафтов наследственных и спорадических форм рака [57–59], а также их клинические, морфологические и молекулярные различия.

Широкое использование секвенирования нового поколения (NGS) для наследственного тестирования позволило экспериментально исследовать корреляции генотипа и фенотипа у онкологических больных [60]. Хотя феномен очищающего отбора при наследственном раке кажется несомненным, недавние исследования поставили под вопрос его эффективность. Оказалось, что герминальные патогенные варианты (germline pathogenic variants, GPV), предрасполагающие к высокопенетрантному раку, встречаются чаще, чем предполагалось [51, 61, 62]. Более четверти раковых опухолей у носителей таких GPV не имели специфических признаков, связанных с герминальным аллелем [58]. Это позволило предположить, что опухоли развивались независимо от него и, следовательно, GPV менее пенетрантны, чем считалось ранее [63].

В связи с этими данными можно высказать несколько соображений. Во-первых, определение статуса наследственных мутаций осложняется неожиданно широким распространением таких явлений, как постзиготный мозаицизм, аберрантная клональная экспансия и клональное кроветворение [47, 64–76], что иногда приводит к неправильной классификации. Во-вторых, при изучении рака как биологического феномена *H. sapiens* вряд ли можно рассматривать в качестве референтной экспериментальной модели. В животном мире рак оказывает значительное влияние на конкурентные способности особей, их восприимчивость к патогенам, уязвимость для хищников, способность к расселению [31]. Условия среды обитания, в свою очередь, влияют на патогенез заболевания. Тысячи лет цивилизации привели к таким радикальным изменениям в образе жизни человека (гигиена, здравоохранение, питание) и окружающей его среде, что они могли значительно снизить селективное давление наследственного рака. В-третьих, в недавнем исследовании эволюционного воздействия детского рака на генофонд человека было установлено, что гены синдрома предрасположенности к детскому раку (pediatric cancer predisposition syndrome genes) находятся под сильным селективным давлением. Авторы резюмируют, что наследственный детский рак осуществляет естественный отбор, существенно влияющий на современный генофонд [77].

Гипотеза о том, что «рак убивает индивида и спасает вид» [33], приводит к континутивному взгляду на рак как альтруистический феномен. Основой биологической эволюции,

согласно Дарвину, является индивидуальный отбор (т.е. эгоизм – ее движущая сила). Однако, «возможно, самым замечательным свойством эволюции является ее способность порождать сотрудничество в конкурентном мире» [78]. Противоречие между положениями теории Дарвина и обилием примеров кооперации и альтруизма в дикой природе было разрешено столетие спустя в теориях инклюзивной приспособленности, родственного отбора [79, 80] и «эгоистичного гена» [81]. Хотя теоретические споры продолжаются до сих пор (см. работы Nowak et al. [82], Abbot et al. [83], Kay et al. [84] и Efferson et al. [85]), существование кооперации и альтруизма в биологических сообществах сомнений не вызывает.

Альтруизм наиболее активно обсуждается в связи с феноменом старения, начиная с ранних идей Вейсмана о программируемом старении и заканчивая концепцией программируемого и альтруистического старения, выдвинутой в работе Скулачева с соавторами [86]. В рамках последней развивается идея *феноптоза* (программируемой гибели организма). По аналогии с клетками многоклеточных организмов, обладающих механизмом самоуничтожения (апоптоз) [87], предполагается, что «сложные биологические системы снабжены программами, устраниющими те элементы системы, которые стали опасными или ненужными для системы в целом» [88]. Можно предположить, что рак – частный случай феноптоза. На уровне многоклеточного организма распространению опасных дефектов противодействует апоптоз, а на уровне популяции эту работу выполняет рак. Кажется вероятным, что апоптоз и рак – первая и вторая линии защиты биологической иерархии от вредоносных генетических повреждений.

### **ДРАЙВЕРНЫЕ МУТАЦИИ ЗАПУСКАЮТ ПРЕДСУЩЕСТВУЮЩУЮ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКУЮ ПРОГРАММУ**

Широко распространено мнение, что рак возникает в результате накопления в клетке драйверных мутаций и что рак так же необратим, как и сами мутации. Хотя в подавляющем большинстве случаев мутации действительно предшествуют раку, они не являются абсолютно обязательными для канцерогенеза. Известны опухоли с небольшим числом мутаций или вовсе без них [89], а реверсия рака может происходить, несмотря на их присутствие [90, 91]. Эпигенетическое перепрограммирование само по себе может стимулировать опухлевый рост [92], в частности ингибирование синтеза Polycomb group proteins вызывает необратимый рост опухоли у плодовых

мушек [93]. Эти факты согласуются с представлением о раке как изменении нормальной клеточной дифференцировки [94]. В свете концепции эпигенетических ландшафтов Уоддингтона драйверные мутации индуцируют эпигенетическое перепрограммирование, приводящее к критическому переходу от фиксированного состояния нормальной клетки к фиксированному состоянию раковой клетки [91]. В пользу этой точки зрения свидетельствует генетический анализ нескольких видов рака (молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы, глиобластомы), который показал, что драйверные мутации, значительно различающиеся у этих видов, повреждают тем не менее одни и те же сигнальные пути [95].

Эти данные заставляют пересмотреть роль драйверных мутаций в канцерогенезе. Они, возможно, не движущая сила стохастического процесса канцерогенеза, а, скорее, триггеры предсуществующей эволюционно консервативной эпигенетической программы. Очевидное сходство между эмбриогенезом и туморогенезом предполагает онкофетальное перепрограммирование, позволяющее раковым клеткам ускользать от иммунного ответа и способствующее их размножению и метастазированию [96]. Концепция драйверных мутаций как триггера эпигенетической трансдифференцировки может примирить конфликтующие теории: SMT (Somatic Mutation Theory) [97], которая рассматривает рак как клеточную патологию, и TOFT (Tissue Organization Field Theory) [98, 99], которая считает рак тканевой патологией, обусловленной дефектами развития.

### **РАК КАК ПРОГРАММИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ ОРГАНИЗМА**

Рак как орган должен иметь функцию, и она очевидна – это киллерная функция, реализующаяся поэтапно и имеющая черты программируемой гибели организма [35, 100]. Термин «раковая трансформация» обозначает более глубокое изменение, чем просто обретение клеткой ряда фенотипических признаков, таких как нерегулируемое деление, а именно радикальное изменение ее социального поведения: «клетка-созидатель» становится «клеткой-разрушителем». Если нормальная клетка поддерживает гомеостаз организма, то раковая клетка, подобно «зомби», подчиняет метаболизм хозяина своим потребностям [101], строит «нишу» [102, 103], обеспечивает себя кровоснабжением [104], энергией [105] и иннервацией [8, 106, 107], формирует микроокружение и преметастатические ниши [108–112], колонизирует организм [113] и, наконец, убивает его и себя.

Смерть онкологического больного воспринимается как нечто настолько очевидное, само собой разумеющееся и присущее раку, что его киллерная функция не артикулируется явно, ей не уделяется должное внимание, и она не присутствует в списке его отличительных свойств. Традиционное мнение о том, что смертность от рака есть следствие метастазирования, отождествляет метастазирование с *вредоносностью*, т.е. способностью раковой клетки убить организм (термин «*вредоносность*» используется здесь для отличия от «*злокачественности*», обозначающей онкологическую патологию в целом). Очевидно, однако, что метастазирование (распространение по организму) и *вредоносность* – свойства раковой клетки, хотя и тесно связанные, но, по сути, разные. В этом отношении показателен тот факт, что ген *NALCN* регулирует как метастазирование раковых клеток, так и диссеминацию нормальных клеток без метастазов [114]. Есть много свидетельств того, что причиной большинства случаев смерти от рака являются системные воздействия, а не метастазы *per se* [1, 29, 115].

Вредоносность является, по-видимому, тем свойством раковой клетки, которое «еще ждет своего признания» [116]: именно она формирует функциональную связь опухоли и организма, тогда как все остальные свойства играют, по-видимому, лишь вспомогательную роль. Вредоносность реализуется посредством разнообразного инструментария, включающего секретируемые факторы, внеклеточные везикулы, циркулирующие нуклеиновые кислоты и нейрогенные факторы [8, 101, 117–133]. Этот арсенал, который можно обозначить как раковый интерактом, способен влиять на отдаленные ткани, вызывая различные паранеопластические синдромы [9–13, 101, 134–136]. Интерактомы нормальных и раковых клеток, обладающих одним геномом, должны быть в принципе одинаковы. Различия, видимо, лишь в «целеполагании»: те средства, которые нормальная клетка использует для поддержания гомеостаза организма, раковая клетка направляет на его разрушение, используя неадекватно времени и/или месту, в неприемлемых концентрациях и/или сочетаниях. Одним из таких средств «двойного назначения» является ассоциированный с клеточным старением секреторный фенотип (*senescence-associated secretory phenotype, SASP*), который служит механизмом противоопухолевой защиты при нормальном старении, но противогенным фактором у клеток, индуцированных генотоксическим стрессом [121, 137, 138]. Возможно, наиболее значимым проявлением вредоносности раковой клетки является хроническое воспаление, которое часто предшествует и всегда сопровождает злокачественный рост [96, 139–145].

Являясь фундаментальным защитным механизмом, призванным бороться с инфекциями и способствовать заживлению ран, «оно антагонистично гомеостатическим механизмам организма, что объясняет неизбежное нарушение многих функций» [146]. Недавно было показано, что слияние внеклеточных везикул с клетками-мишениями является триггером системного воспаления [147]. Одним из следствий воспаления является также нетоз (*neutrophil extracellular traps, NET*) – защитный механизм, предназначенный для захвата и нейтрализации микробов, но способный при патологической хронической активации вызывать полиорганную недостаточность [17, 148–152]. Кахексия также связана с воспалительным процессом [153–155]. Недавно было выявлено вовлечение в онкологический процесс периферической и центральной нервной системы [8, 156–158].

## НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ РАКОВОГО ИНТЕРАКТОМА КАК СТРАТЕГИЯ ЛЕЧЕНИЯ

Если рассматривать рак как особый орган, его развитие – как серию предопределенных событий, а летальный исход – как результат присущей ему специфической функции, то понимание механизма последней есть необходимое условие успешной борьбы с этим злом. Общепринятое утверждение «рак – не одна, а много разных болезней», констатирующее многообразие его проявлений, отражает клиническую точку зрения. Однако экспериментатор видит в этом многообразии единый, хотя и многовариантный, патогенетический механизм.

Прогресс в войне против рака неудовлетворителен по двум основным причинам. Во-первых, раковые клетки быстро учатся избегать средств поражения и после первых, часто очень значительных потерь, восстанавливают свои прежние позиции и переходят в наступление [159]. Во-вторых, глубинное родство раковых и нормальных клеток превращает химиотерапию в форму «дружественного огня» с сопутствующими, порой тяжелыми, потерями. Эта ситуация заставляет рассматривать альтернативы существующей сегодня стратегии лечения, направленной на уничтожение раковых клеток, такие как адаптивная терапия [160, 161], стратегия «толерантной защиты» [162, 163], стратегия реверсии рака [91], стратегия нейтрализации, основанная на «антидотах» вместо «ядов» [164]. В последнем случае предполагается переориентировать средства борьбы с органа на его функцию, т.е. на раковый интерактом. Именно такую стратегию «нейтрализации» применяет человек в борьбе со своими внешними врагами (ядовитыми животными):

вместо безнадежных и губительных попыток полного уничтожения самих животных используются эффективные и относительно безвредные специфические антидоты. Такая стратегия лечения может иметь ряд преимуществ перед существующей сегодня: (1) быть менее токсичной; (2) иметь меньшую стоимость (при условии, что различные виды рака имеют сходный вредоносный интерактом); (3) быть пригодной для химиопрофилактики, применяющей лекарства для блокирования ранних стадий канцерогенеза [165]. Известные сегодня примеры нейтрализующей стратегии – применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) для облегчения симптомов и улучшения самочувствия раковых больных [166] и инъекции ДНКазы I подопытным животным для ингибирования ассоциированного с нетозом метастазирования [148].

Для получения эффективного противоудара необходимо знание механизма вредоносного эффекта. Применительно к раку это означает тщательное изучение опосредуемого интерактомом воздействия опухоли на отдаленные ткани. Необходимо выяснить степень вариабельности и специфики как самого ракового интерактома,

так и его тканевых и метаболических мишней. В этом контексте показательны исследования процесса старения, объектом которых является целостный организм. При этом для изучения молекулярных процессов в различных тканях на геномном, эпигеномном, транскриптомном, протеомном и метаболомном уровнях был использован весь спектр высокопроизводительных «омик»-технологий [167–169]. Можно предположить, что, как и в случае со старением, где полученные знания привели к значительным практическим результатам [170], целостный подход к пораженному злокачественной опухолью организму позволит найти способы избежать ее губительного воздействия.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов.

**Соблюдение этических норм.** Статья не содержит описания исследований, проведенных автором с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boire, A., Burke, K., Cox, T. R., Guise, T., Jamal-Hanjani, M., Janowitz, T., Kaplan, R., Lee, R., Swanton, C., Vander Heiden, M. G., and Sahai, E. (2024) Why do patients with cancer die? *Nat. Rev. Cancer*, **24**, 578-589, <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00708-4>.
- Editorial (2024) The road less travelled, *Nat. Rev. Cancer*, **24**, 515, <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00720-8>.
- Lichtenstein, A. V. (2014) Cancer research: a hurdle race, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 385-390, <https://doi.org/10.1134/S0006297914050010>.
- Laplane, L., and Maley, C. C. (2024) The evolutionary theory of cancer: challenges and potential solutions, *Nat. Rev. Cancer*, **24**, 718-733, <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00734-2>.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell*, **100**, 57-70, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, D., and Weinberg, R. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hanahan, D. (2022) Hallmarks of cancer: new dimensions, *Cancer Discov.*, **12**, 31-46, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- Hanahan, D., and Monje, M. (2023) Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment, *Cancer Cell*, **41**, 573-580, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.02.012>.
- Tisdale, M. J. (2002) Cachexia in cancer patients, *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 862-871, <https://doi.org/10.1038/nrc927>.
- Finora, K. (2003) Common paraneoplastic syndromes, *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, **18**, 123-126, <https://doi.org/10.1053/svms.2003.36629>.
- Kim, H. L., Belldegrun, A. S., Freitas, D. G., Bui, M. H., Han, K. R., Dorey, F. J., and Figlin, R. A. (2003) Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis, *J. Urol.*, **170**, 1742-1746, <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000092764.81308.6a>.
- Mazzzone, P. J., and Arroliga, A. C. (2003) Endocrine paraneoplastic syndromes in lung cancer, *Curr. Opin. Pulm. Med.*, **9**, 313-320, <https://doi.org/10.1097/00063198-200307000-00012>.
- Posner, J. B. (2003) Immunology of paraneoplastic syndromes: overview, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **998**, 178-186, <https://doi.org/10.1196/annals.1254.018>.
- Spivak, J. L. (2005) The anaemia of cancer: death by a thousand cuts, *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 543-555, <https://doi.org/10.1038/nrc1648>.

15. Rak, J., Klement, P., and Yu, J. (2006) Genetic determinants of cancer coagulopathy, angiogenesis and disease progression, *Vnitr. Lek.*, **52 Suppl 1**, 135-138.
16. Rak, J., Yu, J. L., Luyendyk, J., and Mackman, N. (2006) Oncogenes, Troussseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans, *Cancer Res.*, **66**, 10643-10646, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2350>.
17. Jorch, S. K., and Kubes, P. (2017) An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease, *Nat. Med.*, **23**, 279-287, <https://doi.org/10.1038/nm.4294>.
18. Inoue, M., Nakashima, R., Enomoto, M., Koike, Y., Zhao, X., Yip, K., Huang, S. H., Waldron, J. N., Ikura, M., Liu, F. F., and Bratman, S. V. (2018) Plasma redox imbalance caused by albumin oxidation promotes lung-predominant NETosis and pulmonary cancer metastasis, *Nat. Commun.*, **9**, 5116, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07550-x>.
19. Leaf, C. (2004) Why we're losing the war on cancer (and how to win it), *Fortune*, **149**, 76-82, 84-86, 88.
20. Goldstein, I., Madar, S., and Rotter, V. (2012) Cancer research, a field on the verge of a paradigm shift? *Trends Mol. Med.*, **18**, 299-303, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.002>.
21. Yuzhalin, A. E. (2024) Redefining cancer research for therapeutic breakthroughs, *Br. J. Cancer*, **130**, 1078-1082, <https://doi.org/10.1038/s41416-024-02634-6>.
22. Lichtenstein, A. V. (2005) On evolutionary origin of cancer, *Cancer Cell Int.*, **5**, 5, <https://doi.org/10.1186/1475-2867-5-5>.
23. Bozic, I., and Nowak, M. A. (2013) Unwanted evolution, *Science*, **342**, 938-939, <https://doi.org/10.1126/science.1247887>.
24. Greaves, M. (2007) Darwinian medicine: a case for cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 213-221, <https://doi.org/10.1038/nrc2071>.
25. Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J., and Maley, C. C. (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process, *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 924-935, <https://doi.org/10.1038/nrc2013>.
26. Aktipis, C. A., and Nesse, R. M. (2013) Evolutionary foundations for cancer biology, *Evol. Appl.*, **6**, 144-159, <https://doi.org/10.1111/eva.12034>.
27. Aktipis, C. A., Boddy, A. M., Jansen, G., Hibner, U., Hochberg, M. E., Maley, C. C., and Wilkinson, G. S. (2015) Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **370**, 20140219, <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0219>.
28. Bissell, M. J., and Radisky, D. (2001) Putting tumours in context, *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 46-54, <https://doi.org/10.1038/35094059>.
29. Egeblad, M., Nakasone, E. S., and Werb, Z. (2010) Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism, *Dev. Cell*, **18**, 884-901, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>.
30. Perez-Losada, J., and Balmain, A. (2003) Stem-cell hierarchy in skin cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 434-443, <https://doi.org/10.1038/nrc1095>.
31. Vittecoq, M., Roche, B., Daoust, S. P., Ducasse, H., Misse, D., Abadie, J., Labrut, S., Renaud, F., Gauthier-Clerc, M., and Thomas, F. (2013) Cancer: a missing link in ecosystem functioning? *Trends Ecol. Evol.*, **28**, 628-635, <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.07.005>.
32. Graham, J. (1992) *Cancer Selection: The New Theory of Evolution*, Aculeus Press, pp. 1-213.
33. Sommer, S. S. (1994) Does cancer kill the individual and save the species? *Hum. Mutat.*, **3**, 166-169, <https://doi.org/10.1002/humu.1380030214>.
34. Thomas, M. A., Weston, B., Joseph, M., Wu, W., Nekrutenko, A., and Tonellato, P. J. (2003) Evolutionary dynamics of oncogenes and tumor suppressor genes: higher intensities of purifying selection than other genes, *Mol. Biol. Evol.*, **20**, 964-968, <https://doi.org/10.1093/molbev/msg110>.
35. Lichtenstein, A. V. (2010) Cancer: evolutionary, genetic and epigenetic aspects, *Clin Epigenetics*, **1**, 85-100, <https://doi.org/10.1007/s13148-010-0010-6>.
36. Leroi, A. M., Koufopanou, V., and Burt, A. (2003) Opinion: cancer selection, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 226-231, <https://doi.org/10.1038/nrc1016>.
37. Rahman, N. (2014) Realizing the promise of cancer predisposition genes, *Nature*, **505**, 302-308, <https://doi.org/10.1038/nature12981>.
38. Frank, S. A. (2004) Genetic predisposition to cancer – insights from population genetics, *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 764-772, <https://doi.org/10.1038/nrg1450>.
39. Lichtenstein, A. V. (2018) Genetic mosaicism and cancer: cause and effect, *Cancer Res.*, **78**, 1375-1378, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2769>.
40. Byars, S. G., and Voskarides, K. (2020) Antagonistic pleiotropy in human disease, *J. Mol. Evol.*, **88**, 12-25, <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09923-2>.
41. Ponder, B. A. (2001) Cancer genetics, *Nature*, **411**, 336-341, <https://doi.org/10.1038/35077207>.
42. Yang, X., Kar, S., Antoniou, A. C., and Pharoah, P. D. P. (2023) Polygenic scores in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **23**, 619-630, <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00599-x>.

43. Marsh, D. J., and Zori, R. T. (2002) Genetic insights into familial cancers – update and recent discoveries, *Cancer Lett.*, **181**, 125-164, [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00023-X).
44. Frank, S. A. (2004) Inheritance of cancer, *Discov. Med.*, **4**, 396-400.
45. Nagy, R., Sweet, K., and Eng, C. (2004) Highly penetrant hereditary cancer syndromes, *Oncogene*, **23**, 6445-6470, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207714>.
46. Lynch, H. T., Drescher, K., Knezevic, J., and Lanspa, S. (2014) Genetics, biomarkers, hereditary cancer syndrome diagnosis, heterogeneity and treatment: a review, *Curr. Treat. Options Oncol.*, **15**, 429-442, <https://doi.org/10.1007/s11864-014-0293-5>.
47. Coffee, B., Cox, H. C., Kidd, J., Sizemore, S., Brown, K., Manley, S., and Mancini-DiNardo, D. (2017) Detection of somatic variants in peripheral blood lymphocytes using a next generation sequencing multigene pan cancer panel, *Cancer Genet.*, **211**, 5-8, <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2017.01.002>.
48. Poliani, L., Greco, L., Barile, M., Dal, B. A., Bianchi, P., Basso, G., Giatti, V., Genuardi, M., Malesci, A., and Laghi, L. (2022) Canonical and uncanonical pathogenic germline variants in colorectal cancer patients by next-generation sequencing in a European referral center, *ESMO Open*, **7**, 100607, <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100607>.
49. Chang, Y. S., Chao, D. S., Chung, C. C., Chou, Y. P., Chang, et al. (2023) Cancer carrier screening in the general population using whole-genome sequencing, *Cancer Med.*, **12**, 1972-1983, <https://doi.org/10.1002/cam4.5034>.
50. Garutti, M., Foffano, L., Mazzeo, R., Michelotti, A., Da, R. L., Viel, A., Miolo, G., Zambelli, A., and Puglisi, F. (2023) Hereditary cancer syndromes: a comprehensive review with a visual tool, *Genes (Basel)*, **14**, 1025, <https://doi.org/10.3390/genes14051025>.
51. Imyanitov, E. N., Kuligina, E. S., Sokolenko, A. P., Suspitsin, E. N., Yanus, G. A., Iyevleva, A. G., Ivantsov, A. O., and Aleksakhina, S. N. (2023) Hereditary cancer syndromes, *World J. Clin. Oncol.*, **14**, 40-68, <https://doi.org/10.5306/wjco.v14.i2.40>.
52. Williams, G. C. (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence, *Evolution*, **11**, 398-411, <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1957.tb02911.x>.
53. Austad, S. N., and Hoffman, J. M. (2018) Is antagonistic pleiotropy ubiquitous in aging biology? *Evol. Med. Public Health*, **2018**, 287-294, <https://doi.org/10.1093/emph/eoy033>.
54. Jassim, A., Rahrmann, E. P., Simons, B. D., and Gilbertson, R. J. (2023) Cancers make their own luck: theories of cancer origins, *Nat. Rev. Cancer*, **23**, 710-724, <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00602-5>.
55. Ahmad, A. S., Ormiston-Smith, N., and Sasieni, P. D. (2015) Trends in the lifetime risk of developing cancer in Great Britain: comparison of risk for those born from 1930 to 1960, *Br. J. Cancer*, **112**, 943-947, <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.606>.
56. Vincze, O., Colchero, F., Lemaitre, J. F., Conde, D. A., Pavard, S., Bieuville, M., Urrutia, A. O., Ujvari, B., Boddy, A. M., Maley, C. C., Thomas, F., and Giraudeau, M. (2022) Cancer risk across mammals, *Nature*, **601**, 263-267, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04224-5>.
57. Martincorena, I., Raine, K. M., Gerstung, M., Dawson, K. J., Haase, K., Van Loo, P., Davies, H., Stratton, M. R., and Campbell, P. J. (2017) Universal patterns of selection in cancer and somatic tissues, *Cell*, **171**, 1029-1041, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.042>.
58. Srinivasan, P., Bandlamudi, C., Jonsson, P., Kemel, Y., Chavan, S. S., Richards, A. L., Penson, A. V., Bielski, C. M., Fong, C., Syed, A., Jayakumaran, G., Prasad, M., Hwee, J., Sumer, S. O., et al. (2021) The context-specific role of germline pathogenicity in tumorigenesis, *Nat. Genet.*, **53**, 1577-1585, <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00949-1>.
59. Dolgin, E. (2020) Cancer genome complexity made simple, *Cancer Discov.*, **10**, 480, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2020-010>.
60. Fortuno, C., Pesaran, T., Mester, J., Dolinsky, J., Yussuf, A., McGoldrick, K., James, P. A., and Spurdle, A. B. (2020) Genotype-phenotype correlations among TP53 carriers: Literature review and analysis of probands undergoing multi-gene panel testing and single-gene testing, *Cancer Genet.*, **248-249**, 11-17, <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2020.09.002>.
61. Amadou, A., Waddington Achatz, M. I., and Hainaut, P. (2018) Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome, *Curr. Opin. Oncol.*, **30**, 23-29, <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000423>.
62. De Andrade, K. C., Mirabello, L., Stewart, D. R., Karlins, E., Koster, R., Wang, M., Gapstur, S. M., Gaudet, M. M., Freedman, N. D., Landi, M. T., Lemonnier, N., Hainaut, P., Savage, S. A., and Achatz, M. I. (2017) Higher-than-expected population prevalence of potentially pathogenic germline TP53 variants in individuals unselected for cancer history, *Hum. Mutat.*, **38**, 1723-1730, <https://doi.org/10.1002/humu.23320>.
63. Torrezan, G. T. (2023) Untangling the mechanisms of cancer predisposition, *Nat. Rev. Cancer*, **23**, 429-429, <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00577-3>.
64. Riviere, J. B., Mirzaa, G. M., O'Roak, B. J., Beddaoui, M., Alcantara, D., Conway, R. L., St-Onge, J., Schwartzentruber, J. A., Gripp, K. W., Nikkel, S. M., Worthylake, T., Sullivan, C. T., Ward, T. R., Butler, H. E., Kramer, N. A., Albrecht, B.,

- Armour, C. M., Armstrong, L., Caluseriu, O., Cytrynbaum, C., Drolet, B., Innes, A. M., Lauzon, J. L., Lin, A. E., Mancini, G., et al. (2012) *De novo* germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes, *Nat. Genet.*, **44**, 934-940, <https://doi.org/10.1038/ng.2331>.
65. Carethers, J. M., and Stoffel, E. M. (2015) Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: the growing complex landscape of hereditary colon cancer, *World J. Gastroenterol.*, **21**, 9253-9261, <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i31.9253>.
66. Huang, A. Y., Yang, X., Wang, S., Zheng, X., Wu, Q., Ye, A. Y., and Wei, L. (2018) Distinctive types of postzygotic single-nucleotide mosaisms in healthy individuals revealed by genome-wide profiling of multiple organs, *PLoS Genet.*, **14**, e1007395, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007395>.
67. Weitzel, J. N., Chao, E. C., Nehoray, B., Van Tongeren, L. R., LaDuca, H., Blazer, K. R., Slavin, T., Facmug, D. A. B. M., Pesaran, T., Rybak, C., Solomon, I., Niell-Swiller, M., Dolinsky, J. S., Castillo, D., Elliott, A., Gau, C. L., Speare, V., and Jasperson, K. (2018) Somatic TP53 variants frequently confound germ-line testing results, *Genet. Med.*, **20**, 809-816, <https://doi.org/10.1038/gim.2017.196>.
68. Slavin, T. P., Coffee, B., Bernhisel, R., Logan, J., Cox, H. C., Marcucci, G., Weitzel, J., Neuhausen, S. L., and Mancini-DiNardo, D. (2019) Prevalence and characteristics of likely-somatic variants in cancer susceptibility genes among individuals who had hereditary pan-cancer panel testing, *Cancer Genet.*, **235-236**, 31-38, <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2019.04.005>.
69. Wright, C. F., Prigmore, E., Rajan, D., Handsaker, J., McRae, J., Kaplanis, J., Fitzgerald, T. W., FitzPatrick, D. R., Firth, H. V., and Hurles, M. E. (2019) Clinically-relevant postzygotic mosaicism in parents and children with developmental disorders in trio exome sequencing data, *Nat. Commun.*, **10**, 2985, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11059-2>.
70. Jaiswal, S., and Ebert, B. L. (2019) Clonal hematopoiesis in human aging and disease, *Science*, **366**, eaan4673, <https://doi.org/10.1126/science.aan4673>.
71. Mester, J. L., Jackson, S. A., Postula, K., Stettner, A., Solomon, S., Bissonnette, J., Murphy, P. D., Klein, R. T., and Hruska, K. S. (2020) Apparently heterozygous TP53 pathogenic variants may be blood limited in patients undergoing hereditary cancer panel testing, *J. Mol. Diagn.*, **22**, 396-404, <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.12.003>.
72. Coffee, B., Cox, H. C., Bernhisel, R., Manley, S., Bowles, K., Roa, B. B., and Mancini-DiNardo, D. (2020) A substantial proportion of apparently heterozygous TP53 pathogenic variants detected with a next-generation sequencing hereditary pan-cancer panel are acquired somatically, *Hum. Mutat.*, **41**, 203-211, <https://doi.org/10.1002/humu.23910>.
73. Latorre-Pellicer, A., Gil-Salvador, M., Parenti, I., Lucia-Campos, C., Trujillano, L., Marcos-Alcalde, I., Arnedo, M., Ascaso, A., Ayerza-Casas, A., Antonanzas-Perez, R., Gervasini, C., Piccione, M., Mariani, M., Weber, A., Kanber, D., Kuechler, A., et al. (2021) Clinical relevance of postzygotic mosaicism in Cornelia de Lange syndrome and purifying selection of NIPBL variants in blood, *Sci. Rep.*, **11**, 15459, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94958-z>.
74. Castillo, D., Yuan, T. A., Nehoray, B., Cervantes, A., Tsang, K. K., Yang, K., Sand, S. R., Mokhnatkin, J., Herzog, J., Slavin, T. P., Hyman, S., Schwartz, A., Ebert, B. L., Amos, C. I., Garber, J. E., and Weitzel, J. N. (2022) Clonal hematopoiesis and mosaicism revealed by a multi-tissue analysis of constitutional TP53 status, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **31**, 1621-1629, <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-1296>.
75. Hendricks, L. A. J., Schuurs-Hoeijmakers, J., Spier, I., Haadsma, M. L., Eijkelenboom, A., Cremer, K., Mensenkamp, A. R., Aretz, S., Vos, J. R., and Hoogerbrugge, N. (2022) Catch them if you are aware: PTEN postzygotic mosaicism in clinically suspicious patients with PTEN Hamartoma Tumour Syndrome and literature review, *Eur. J. Med. Genet.*, **65**, 104533, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2022.104533>.
76. Salazar, R., Arbeithuber, B., Ivankovic, M., Heinzl, M., Moura, S., Hartl, I., Mair, T., Lahnsteiner, A., Ebner, T., Shebl, O., Proll, J., and Tiemann-Boege, I. (2022) Discovery of an unusually high number of *de novo* mutations in sperm of older men using duplex sequencing, *Genome Res.*, **32**, 499-511, <https://doi.org/10.1101/gr.275695.121>.
77. Stoltze, U. K., Foss-Skitesvik, J., Hansen, T. O., Rasmussen, S., Karczewski, K. J., Wadt, K. A. W., and Schmiegelow, K. (2024) The evolutionary impact of childhood cancer on the human gene pool, *Nat. Commun.*, **15**, 1881, <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45975-9>.
78. Nowak, M. A. (2006) Five rules for the evolution of cooperation, *Science*, **314**, 1560-1563, <https://doi.org/10.1126/science.1133755>.
79. Hamilton, W. D. (1964) The genetical evolution of social behaviour. I and II, *J. Theor. Biol.*, **7**, 17-52, [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(64\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90039-6).
80. Maynard-Smith, J. (1964) Group selection and kin selection, *Nature*, **201**, 1145-1147, <https://doi.org/10.1038/2011145a0>.
81. Dawkins, R. (1989) *The Selfish Gene*, Oxford University Press.
82. Nowak, M. A., Tarnita, C. E., and Wilson, E. O. (2010) The evolution of eusociality, *Nature*, **466**, 1057-1062, <https://doi.org/10.1038/nature09205>.
83. Abbot, P., Abe, J., Alcock, J., Alizon, S., Alpedrinha, J. A. C., Andersson, M., Andre, J. B., van Baalen, M., Balloux, F., Balshine, S., Barton, N., Beukeboom, L. W., Biernaskie, J. M., Bilde, T., Borgia, G., Breed, M., Brown, S., Bshary, R., et al. (2011) Inclusive fitness theory and eusociality, *Nature*, **471**, E1-E4, <https://doi.org/10.1038/nature09831>.

84. Kay, T., Keller, L., and Lehmann, L. (2020) The evolution of altruism and the serial rediscovery of the role of relatedness, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 28894-28898, <https://doi.org/10.1073/pnas.2013596117>.
85. Efferson, C., Bernhard, H., Fischbacher, U., and Fehr, E. (2024) Super-additive cooperation, *Nature*, **626**, 1034-1041, <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07077-w>.
86. Longo, V. D., Mitteldorf, J., and Skulachev, V. P. (2005) Programmed and altruistic ageing, *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 866-872, <https://doi.org/10.1038/nrg1706>.
87. Ameisen, J. C. (2002) On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years, *Cell Death. Differ.*, **9**, 367-393, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400950>.
88. Skulachev, V. P. (2001) The programmed death phenomena, ageing, and the Samurai law of biology, *Exp. Gerontol.*, **36**, 995-1024, [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00109-7).
89. Feinberg, A. P., Koldobskiy, M. A., and Gondor, A. (2016) Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression, *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 284-299, <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.13>.
90. Mintz, B., and Illmensee, K. (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3585-3589, <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3585>.
91. Shin, D., and Cho, K. H. (2023) Critical transition and reversion of tumorigenesis, *Exp. Mol. Med.*, **55**, 692-705, <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00969-3>.
92. Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., Soejima, H., Moriwaki, H., Yamanaka, S., Woltjen, K., and Yamada, Y. (2014) Premature termination of reprogramming *in vivo* leads to cancer development through altered epigenetic regulation, *Cell*, **156**, 663-677, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.005>.
93. Parreno, V., Loubiere, V., Schuettengruber, B., Fritsch, L., Rawal, C. C., Erokhin, M., Gyorffy, B., Normanno, D., Di Stefano, M., Moreaux, J., Butova, N. L., Chiolo, I., Chetverina, D., Martinez, A. M., and Cavalli, G. (2024) Transient loss of Polycomb components induces an epigenetic cancer fate, *Nature*, **629**, 688-696, <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07328-w>.
94. Sporn, M. B. (1996) The war on cancer, *Lancet*, **347**, 1377-1381, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)91015-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)91015-6).
95. Bessarabova, M., Pustovalova, O., Shi, W., Serebriyskaya, T., Ishkin, A., Polyak, K., Velculescu, V. E., Nikolskaya, T., and Nikolsky, Y. (2011) Functional synergies yet distinct modulators affected by genetic alterations in common human cancers, *Cancer Res.*, **71**, 3471-3481, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3038>.
96. Sharma, A., Bleriot, C., Currenti, J., and Ginhoux, F. (2022) Oncofetal reprogramming in tumour development and progression, *Nat. Rev. Cancer*, **22**, 593-602, <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00497-8>.
97. Greaves, M., and Maley, C. C. (2012) Clonal evolution in cancer, *Nature*, **481**, 306-313, <https://doi.org/10.1038/nature10762>.
98. Sonnenschein, C., Soto, A. M., Rangarajan, A., and Kulkarni, P. (2014) Competing views on cancer, *J. Biosci.*, **39**, 281-302, <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9403-y>.
99. Soto, A. M., and Sonnenschein, C. (2011) The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory, *Bioessays*, **33**, 332-340, <https://doi.org/10.1002/bies.201100025>.
100. Lichtenstein, A. (2005) Cancer as a programmed death of an organism, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 1055-1064, <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0224-y>.
101. Wang, G., Li, J., Bojmar, L., Chen, H., Li, Z., Tobias, G. C., Hu, M., Homan, E. A., Lucotti, S., Zhao, F., Posada, V., Oxley, P. R., Cioffi, M., Kim, H. S., Wang, H., Lauritzen, P., Boudreau, N., Shi, Z., Burd, C. E., Zippin, J. H., Lo, J. C., Pitt, G. S., Hernandez, J., Zambirinis, C. P., Hollingsworth, M. A., et al. (2023) Tumour extracellular vesicles and particles induce liver metabolic dysfunction, *Nature*, **618**, 374-382, <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06114-4>.
102. Barcellos-Hoff, M. H., Lyden, D., and Wang, T. C. (2013) The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis, *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 511-518, <https://doi.org/10.1038/nrc3536>.
103. Plaks, V., Kong, N., and Werb, Z. (2015) The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*, **16**, 225-238, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.015>.
104. Bergers, G., and Benjamin, L. E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 401-410, <https://doi.org/10.1038/nrc1093>.
105. Luo, Y., Yoneda, J., Ohmori, H., Sasaki, T., Shimbo, K., Eto, S., Kato, Y., Miyano, H., Kobayashi, T., Sasahira, T., Chihara, Y., and Kuniyasu, H. (2014) Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository, *Cancer Res.*, **74**, 330-340, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1052>.
106. Magnon, C., Hall, S. J., Lin, J., Xue, X., Gerber, L., Freedland, S. J., and Frenette, P. S. (2013) Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression, *Science*, **341**, 1236361, <https://doi.org/10.1126/science.1236361>.
107. Magnon, C., and Hondermarck, H. (2023) The neural addiction of cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **23**, 317-334, <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00556-8>.
108. Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V.,

- Jensen, K. K., Rafii, S., and Lyden, D. (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche, *Nature*, **438**, 820-827, <https://doi.org/10.1038/nature04186>.
109. Kaplan, R. N., Rafii, S., and Lyden, D. (2006) Preparing the “soil”: the premetastatic niche, *Cancer Res.*, **66**, 11089-11093, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2407>.
  110. Peinado, H., Zhang, H., Matei, I. R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R. N., Bromberg, J. F., Kang, Y., Bissell, M. J., Cox, T. R., Giaccia, A. J., Erler, J. T., Hiratsuka, S., Ghajar, C. M., and Lyden, D. (2017) Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases, *Nat. Rev. Cancer*, **17**, 302-317, <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.6>.
  111. De Visser, K. E., and Joyce, J. A. (2023) The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth, *Cancer Cell*, **41**, 374-403, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.02.016>.
  112. Patras, L., Shaashua, L., Matei, I., and Lyden, D. (2023) Immune determinants of the pre-metastatic niche, *Cancer Cell*, **41**, 546-572, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.02.018>.
  113. Karras, P., Black, J. R. M., McGranahan, N., and Marine, J. C. (2024) Decoding the interplay between genetic and non-genetic drivers of metastasis, *Nature*, **629**, 543-554, <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07302-6>.
  114. Rahrmann, E. P., Shorthouse, D., Jassim, A., Hu, L. P., Ortiz, M., Mahler-Araujo, B., Vogel, P., Paez-Ribes, M., Fatemi, A., Hannon, G. J., Iyer, R., Blundon, J. A., Lourenco, F. C., Kay, J., Nazarian, R. M., Hall, B. A., Zakharenko, S. S., Winton, D. J., Zhu, L., and Gilbertson, R. J. (2022) The NALCN channel regulates metastasis and nonmalignant cell dissemination, *Nat. Genet.*, **54**, 1827-1838, <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01182-0>.
  115. McAllister, S. S., and Weinberg, R. A. (2010) Tumor-host interactions: a far-reaching relationship, *J. Clin. Oncol.*, **28**, 4022-4028, <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.4257>.
  116. Bilder, D., Ong, K., Hsi, T. C., Adiga, K., and Kim, J. (2021) Tumour-host interactions through the lens of *Drosophila*, *Nat. Rev. Cancer*, **21**, 687-700, <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00387-5>.
  117. Wen, F., Shen, A., Choi, A., Gerner, E. W., and Shi, J. (2013) Extracellular DNA in pancreatic cancer promotes cell invasion and metastasis, *Cancer Res.*, **73**, 4256-4266, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3287>.
  118. Anastasiadou, E., and Slack, F. J. (2014) Malicious exosomes, *Science*, **346**, 1459-1460, <https://doi.org/10.1126/science.aaa4024>.
  119. Ayala, G. E., Dai, H., Powell, M., Li, R., Ding, Y., Wheeler, T. M., Shine, D., Kadmon, D., Thompson, T., Miles, B. J., Ittmann, M. M., and Rowley, D. (2008) Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer, *Clin. Cancer Res.*, **14**, 7593-7603, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1164>.
  120. Balkwill, F. (2004) Cancer and the chemokine network, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 540-550, <https://doi.org/10.1038/nrc1388>.
  121. Coppe, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor, *PLoS Biol.*, **6**, 2853-2868, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>.
  122. Gusachenko, O. N., Zenkova, M. A., and Vlassov, V. V. (2013) Nucleic acids in exosomes: disease markers and intercellular communication molecules, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1-7, <https://doi.org/10.1134/S000629791301001X>.
  123. Kharaziha, P., Ceder, S., Li, Q., and Panaretakis, T. (2012) Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1826**, 103-111, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.006>.
  124. Khwaja, F. W., Svoboda, P., Reed, M., Pohl, J., Pyrzynska, B., and Van Meir, E. G. (2006) Proteomic identification of the wt-p53-regulated tumor cell secretome, *Oncogene*, **25**, 7650-7661, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209969>.
  125. Kim, S., Takahashi, H., Lin, W. W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J. L., and Karin, M. (2009) Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis, *Nature*, **457**, 102-106, <https://doi.org/10.1038/nature07623>.
  126. Kulbe, H., Levinson, N. R., Balkwill, F., and Wilson, J. L. (2004) The chemokine network in cancer – much more than directing cell movement, *Int. J. Dev. Biol.*, **48**, 489-496, <https://doi.org/10.1387/ijdb.041814hk>.
  127. Kulbe, H., Thompson, R., Wilson, J. L., Robinson, S., Hagemann, T., Fatah, R., Gould, D., Ayhan, A., and Balkwill, F. (2007) The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells, *Cancer Res.*, **67**, 585-592, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2941>.
  128. Moller, A., and Lobb, R. J. (2020) The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **20**, 697-709, <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00299-w>.
  129. Nikitina, I. G., Sabirova, E. Yu., Karpov, V. L., Lisitsyn, N. A., and Beresten, S. F. (2013) The role of exosomes and microvesicles in carcinogenesis, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **47**, 767-773, <https://doi.org/10.1134/S0026893313050166>.
  130. Rak, J. (2013) Extracellular vesicles – biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer, *Front. Pharmacol.*, **4**, 21, <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00021>.
  131. Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Zhordania, K. I., Bagrov, D. V., Vinokurova, S. V., Galetsky, S. A., Elkina, N. V., Denisova, D. A., Enikeev, A. D., and Tchevkina, E. M. (2022) Extracellular vesicles from uterine aspirates represent a promising source for screening markers of gynecologic cancers, *Cells*, **11**, 1064, <https://doi.org/10.3390/cells11071064>.

132. Wels, J., Kaplan, R. N., Rafii, S., and Lyden, D. (2008) Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells, *Genes Dev.*, **22**, 559-574, <https://doi.org/10.1101/gad.1636908>.
133. Rak, J. (2015) Cancer: organ-seeking vesicles, *Nature*, **527**, 312-314, <https://doi.org/10.1038/nature15642>.
134. Darnell, R. B., and Posner, J. B. (2003) Paraneoplastic syndromes involving the nervous system, *N. Engl. J. Med.*, **349**, 1543-1554, <https://doi.org/10.1056/NEJMra023009>.
135. Sato, K., Onuma, E., Yocom, R. C., and Ogata, E. (2003) Treatment of malignancy-associated hypercalcemia and cachexia with humanized anti-parathyroid hormone-related protein antibody, *Semin. Oncol.*, **30**, 167-173, <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2003.08.019>.
136. Yamada, G., Ohguro, H., Aketa, K., Itoh, T., Shijubo, N., Takahashi, H., Fujiwara, O., Satoh, M., Ohtsuka, K., and Abe, S. (2003) Invasive thymoma with paraneoplastic retinopathy, *Hum. Pathol.*, **34**, 717-719, [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(03\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(03)00183-7).
137. Campisi, J. (2013) Aging, cellular senescence, and cancer, *Annu. Rev. Physiol.*, **75**, 685-705, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>.
138. Faget, D. V., Ren, Q., and Stewart, S. A. (2019) Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 439-453, <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>.
139. Dvorak, H. F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing, *N. Engl. J. Med.*, **315**, 1650-1659, <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>.
140. Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, **357**, 539-545, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0).
141. Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer, *Nature*, **420**, 860-867, <https://doi.org/10.1038/nature01322>.
142. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation, *Nature*, **454**, 436-444, <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
143. Coussens, L. M., Zitvogel, L., and Palucka, A. K. (2013) Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*, **339**, 286-291, <https://doi.org/10.1126/science.1232227>.
144. Grivennikov, S. I., Greten, F. R., and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer, *Cell*, **140**, 883-899, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.
145. Abu-Remaileh, M., Bender, S., Raddatz, G., Ansari, I., Cohen, D., Gutekunst, J., Musch, T., Linhart, H., Breiling, A., Pikarsky, E., Bergman, Y., and Lyko, F. (2015) Chronic inflammation induces a novel epigenetic program that is conserved in intestinal adenomas and in colorectal cancer, *Cancer Res.*, **75**, 2120-2130, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3295>.
146. Okin, D., and Medzhitov, R. (2012) Evolution of inflammatory diseases, *Curr. Biol.*, **22**, R733-R740, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.029>.
147. Papareddy, P., Tapken, I., Kroh, K., Varma Bhongir, R. K., Rahman, M., Baumgarten, M., Cim, E. I., Gyorffy, L., Smeds, E., Neumann, A., Veerla, S., Olinder, J., Thorlacius, H., Ryden, C., Bartakova, E., Holub, M., and Herwald, H. (2024) The role of extracellular vesicle fusion with target cells in triggering systemic inflammation, *Nat. Commun.*, **15**, 1150, <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45125-1>.
148. Hawes, M. C., Wen, F., and Elquiza, E. (2015) Extracellular DNA: a bridge to cancer, *Cancer Res.*, **75**, 4260-4264, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1546>.
149. Cedervall, J., Zhang, Y., Huang, H., Zhang, L., Femel, J., Dimberg, A., and Olsson, A. K. (2015) Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals, *Cancer Res.*, **75**, 2653-2662, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3299>.
150. Cedervall, J., Zhang, Y., and Olsson, A. K. (2016) Tumor-induced NETosis as a risk factor for metastasis and organ failure, *Cancer Res.*, **76**, 4311-4315, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3051>.
151. Bonaventura, A., Liberale, L., Carbone, F., Vecchie, A., Diaz-Canestro, C., Camici, G., Montecucco, F., and Dallegrì, F. (2018) The pathophysiological role of neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases, *Thromb. Haemost.*, **118**, 6-27, <https://doi.org/10.1160/TH17-09-0630>.
152. Yang, L., Liu, Q., Zhang, X., Liu, X., Zhou, B., Chen, J., Huang, D., Li, J., Li, H., Chen, F., Liu, J., Xing, Y., Chen, X., Su, S., and Song, E. (2020) DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25, *Nature*, **583**, 133-138, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2394-6>.
153. McGovern, J., Dolan, R. D., Skipworth, R. J., Laird, B. J., and McMillan, D. C. (2022) Cancer cachexia: a nutritional or a systemic inflammatory syndrome? *Br. J. Cancer*, **127**, 379-382, <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01826-2>.
154. Rounis, K., Makrakis, D., Gioulbasanis, I., Ekman, S., De, P. L., Mavroudis, D., and Agelaki, S. (2022) Cancer cachexia and antitumor immunity: common mediators and potential targets for new therapies, *Life (Basel)*, **12**, 880, <https://doi.org/10.3390/life12060880>.
155. Maccio, A., Madeddu, C., Lai, E., and Scartozzi, M. (2023) Cancer cachexia and chronic inflammation: an unbreakable bond, *Br. J. Cancer*, **128**, 1609-1610, <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02200-6>.

156. Silverman, D. A., Martinez, V. K., Dougherty, P. M., Myers, J. N., Calin, G. A., and Amit, M. (2021) Cancer-associated neurogenesis and nerve-cancer cross-talk, *Cancer Res.*, **81**, 1431-1440, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2793>.
157. Wang, H., Zheng, Q., Lu, Z., Wang, L., Ding, L., Xia, L., Zhang, H., Wang, M., Chen, Y., and Li, G. (2021) Role of the nervous system in cancers: a review, *Cell Death Discov.*, **7**, 76, <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00450-y>.
158. Zahalka, A. H., and Frenette, P. S. (2020) Nerves in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **20**, 143-157, <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0237-2>.
159. Hanahan, D. (2014) Rethinking the war on cancer, *Lancet*, **383**, 558-563, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62226-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62226-6).
160. Gatenby, R. A., Silva, A. S., Gillies, R. J., and Frieden, B. R. (2009) Adaptive therapy, *Cancer Res.*, **69**, 4894-4903, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3658>.
161. Jansen, G., Gatenby, R., and Aktipis, C. A. (2015) Opinion: control vs. eradication: applying infectious disease treatment strategies to cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 937-938, <https://doi.org/10.1073/pnas.1420297111>.
162. Medzhitov, R., Schneider, D. S., and Soares, M. P. (2012) Disease tolerance as a defense strategy, *Science*, **335**, 936-941, <https://doi.org/10.1126/science.1214935>.
163. Rao, S., and Ayres, J. (2017) Resistance and tolerance defenses in cancer: Lessons from infectious diseases, *Semin. Immunol.*, **32**, 61, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.004>.
164. Lichtenstein, A. V. (2018) Strategies of the war on cancer: to kill or to neutralize? *Front. Oncol.*, **8**, 667, <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00667>.
165. Sporn, M. B., and Suh, N. (2002) Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 537-543, <https://doi.org/10.1038/nrc844>.
166. Roxburgh, C. S. D., and McMillan, D. C. (2014) Cancer and systemic inflammation: treat the tumour and treat the host, *Br. J. Cancer*, **110**, 1409-1412, <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.90>.
167. Valdes, A. M., Glass, D., and Spector, T. D. (2013) Omics technologies and the study of human ageing, *Nat. Rev. Genet.*, **14**, 601-607, <https://doi.org/10.1038/nrg3553>.
168. Gurkar, A. U., Gerencser, A. A., Mora, A. L., Nelson, A. C., Zhang, A. R., Lagnado, A. B., Enninful, A., Benz, C., Furman, D., Beaulieu, D., Jurk, D., Thompson, E. L., Wu, F., Rodriguez, F., Barthel, G., Chen, H., Phatnani, H., Heckenbach, I., Chuang, J. H., Horrell, J., Petrescu, J., Alder, J. K., et al. (2023) Spatial mapping of cellular senescence: emerging challenges and opportunities, *Nat. Aging*, **3**, 776-790, <https://doi.org/10.1038/s43587-023-00446-6>.
169. Rutledge, J., Oh, H., and Wyss-Coray, T. (2022) Measuring biological age using omics data, *Nat. Rev. Genet.*, **23**, 715-727, <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00511-7>.
170. Campisi, J., Kapahi, P., Lithgow, G. J., Melov, S., Newman, J. C., and Verdin, E. (2019) From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing, *Nature*, **571**, 183-192, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1365-2>.

## RETHINKING THE EVOLUTIONARY ORIGIN, FUNCTION, AND TREATMENT OF CANCER

### Review

**A. V. Lichtenstein**

*N. N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,  
115478 Moscow, Russia; e-mail: alicht@mail.ru*

Despite remarkable progress in basic oncology, practical results remain unsatisfactory. This discrepancy is partly due to the exclusive focus on processes within the cancer cell, which results in a lack of recognition of cancer as a systemic disease. It is evident that a wise balance is needed between two alternative methodological approaches: reductionism, which would break down complex phenomena into smaller units to be studied separately, and holism, which emphasizes the study of complex systems as integrated wholes. A consistent holistic approach has so far led to the notion of cancer as a special organ, stimulating debate about its function and evolutionary significance. This article discusses the role of cancer as a mechanism of purifying selection of the gene pool, the correlation between hereditary and sporadic cancer, the cancer interactome, and the role of metastasis in a lethal outcome. It is also proposed that neutralizing the cancer interactome may be a novel treatment strategy.

**Keywords:** war on cancer, cancer origin, cancer therapy, hallmarks of cancer, phenoptosis, cancer malfeasance, neutralization strategy

## ПОРТРЕТ ТРЁХ БИЦИСТРОННЫХ мРНК МЛЕКОПИТАЮЩИХ, КОТОРЫЕ ПРОИСХОДЯТ ИЗ ГЕНОВ *ASNSD1*, *SLC35A4* И *MIEF1*

### Мини-обзор

© 2025 Д.Е. Андреев<sup>1,2\*</sup>, И.Н. Шатский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 Москва, Россия; электронная почта: cycloheximide@yandex.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.10.2024

После доработки 25.11.2024

Принята к публикации 07.12.2024

Последние достижения в области функциональной геномики позволили идентифицировать тысячи коротких открытых рамок считывания (sORF) в 5'-лидерах мРНК млекопитающих. Хотя большинство sORF, по всей видимости, не кодирует функциональные белки, установлено, что небольшое их количество эволюционирует как белок-кодирующие гены. В результате десятки таких sORF уже аннотированы как белок-кодирующие гены. мРНК, которые содержат и белок-кодирующую sORF, и аннотированную белок-кодирующую открытую рамку считывания, называют бицистронными. В этой работе рассматриваются три гена, *ASNSD1*, *SLC35A4* и *MIEF1*, из которых происходят соответствующие бицистронные мРНК. Обсуждается функциональная роль соответствующих белковых продуктов и регуляция трансляции этих бицистронных мРНК, а также то, как такая необычная организация генов могла возникнуть в процессе эволюции.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** инициация трансляции, реинициация, проскальзывающее сканирование, двойное кодирование, бицистронная мРНК.

DOI: 10.31857/S0320972525010034 EDN: CQDSNX

### ВВЕДЕНИЕ

Ранние работы Marylin Kozak позволили установить основные принципы регуляции трансляции в клетках эукариот, которые основаны на сканировании рибосомой 5'-лидеров мРНК [1]. В соответствии с моделью сканирования, т<sup>7</sup>G-кеп, расположенный на 5'-конце всех молекул мРНК, узнаётся фактором инициации eIF4F. Этот фактор привлекает 43S рибосомный комплекс на мРНК за счёт взаимодействия между eIF4F и eIF3. Затем 43S рибосомный комплекс начинает сканирование 5'-лидера мРНК до тех пор, пока не происходит узнавание стартового кодона (обычно AUG). После этого происходит диссоциация инициаторных факторов, присоединение 60S субчастицы, и начинается синтез полипептида (см. соответствующие обзоры [2–5]).

Последовательности 5'-лидеров мРНК оказывают значительное влияние на процесс сканирования, поскольку препятствия на пути сканирующей рибосомы могут снижать количество рибосомных комплексов, которые достигают стартового кодона. Интересно отметить, что примерно половина мРНК млекопитающих содержит как минимум один AUG-кодон в своих 5'-лидерах, что приводит к возникновению коротких открытых рамок считывания, uORF [6–10]. Метод рибосомного профилирования, который позволяет детектировать транслирующие рибосомы с одноклеотидным разрешением на полногеномном уровне [11], позволил обнаружить множественные трансляционные события в 5'-лидерах мРНК. Этот результат делает устаревшим ранее используемый термин «5'-нетранслируемая область» (5'-НТО).

Принятые сокращения: ISR – интегрированный стрессовый ответ; PFDL – префолдин-подобный модуль; sORF – короткая открытая рамка считывания; uORF – открытая рамка считывания в 5'-лидере мРНК.

\* Адресат для корреспонденции.

Функциональная роль uORF интенсивно изучается. Множество работ посвящено изучению регуляторной функции uORF в регуляции трансляции продукта основной рамки считывания, однако мы не будем подробно останавливаться на этом аспекте, поскольку он подробно обсуждается в недавних обзорных статьях [4, 12–21]. Однако некоторые uORF кодируют функциональные белки. Бицистронными мРНК называют те мРНК, которые кодируют два белка в двух разделённых открытых рамках считывания. Такая организация позволяет регулировать соотношение двух белковых продуктов на трансляционном уровне. В данной работе обсуждаются три наиболее хорошо изученные бицистронные мРНК млекопитающих и приводятся данные об их трансляционной регуляции. Также в данной работе выдвинут ряд предположений о том, как изменение соотношения двух белков, закодированных в бицистронных мРНК, может влиять на клеточную физиологию.

## ASDURF-ASNSD1

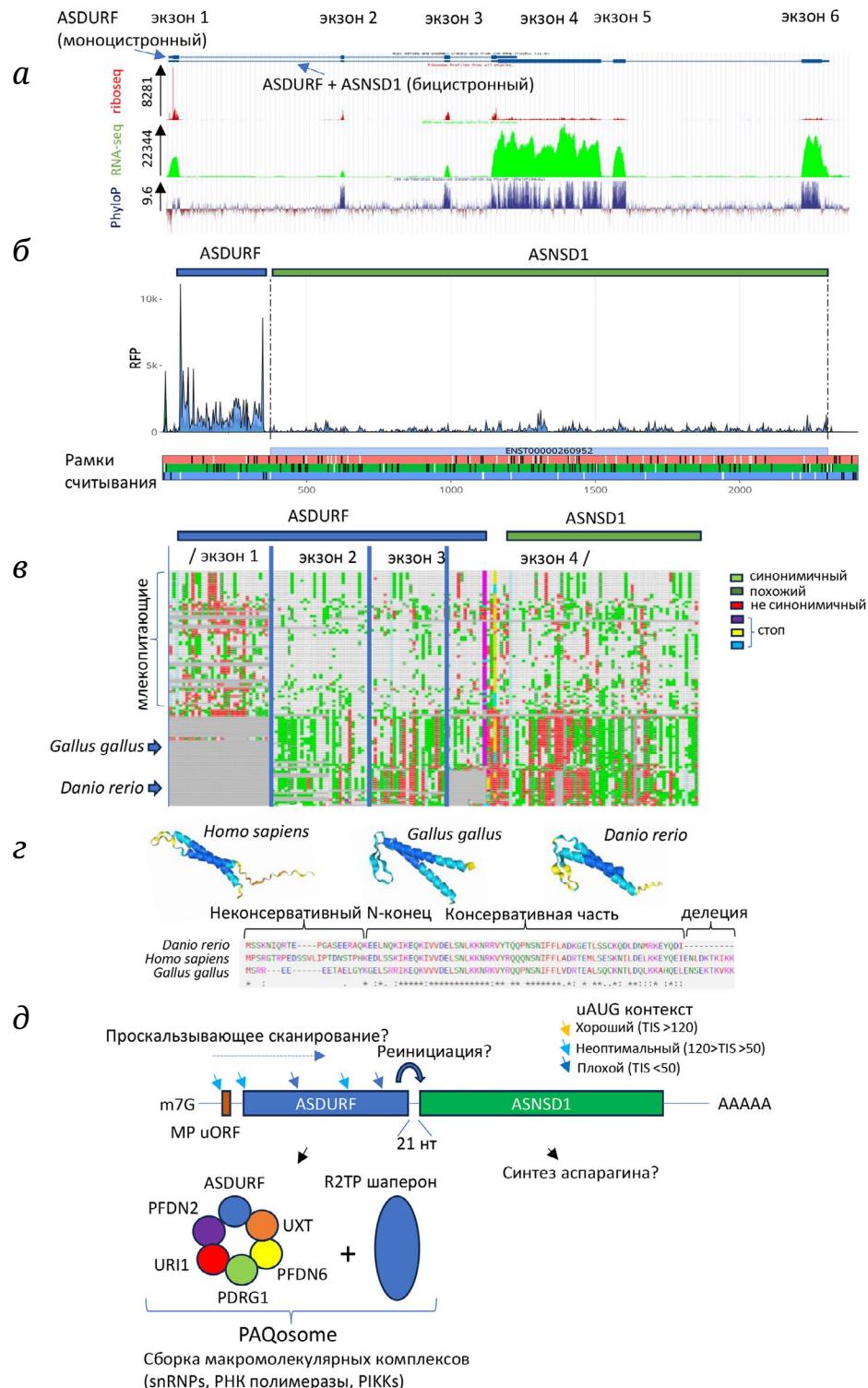
Генетический локус *ASNSD1* кодирует слабо охарактеризованный белок, который предположительно имеет глутамин-гидролизирующую активность. Кроме того, в этом локусе закодирован короткий белок-кодирующий ген *ASDURF* (ENSG00000286053), который может экспрессироваться или как отдельная открытая рамка считывания за счёт использования альтернативного сайта полиаденилирования, расположенного в экзоне 4 (внутри кодирующей последовательности *ASNSD1*), или как вышеупомянутая открытая рамка считывания. По данным CAGE (cap analysis gene expression), полученным в ходе выполнения проекта FANTOM5 [22] (анализ проводился в геномном браузере Zenbu [23]), эти два гена имеют общий единственный промотор. Таким образом, *ASNSD1* может транслироваться только с бицистронной мРНК, которая также содержит вышеупомянутый *ASDURF* (рис. 1, а, рис. 1П Приложения, а).

Белок ASDURF, также известный как ASNSD1-SEP, изначально был идентифицирован Slavoff et al. [28] при использовании пептидомного подхода, оптимизированного для идентификации коротких полипептидов. С использованием масс-спектрометрии разведения изотопов (isotope dilution mass spectrometry [29]) было показано, что внутриклеточная концентрация ASDURF в клетках K562 составляет 386 молекул на клетку [28]. Функция ASDURF оставалась неизвестной до 2020 года, когда Cloutier et al. показали, что он является субъединицей префолдин-подобного модуля (PFDL), входящего в состав комплекса PAQosome [30].

PAQosome, или Rvb1–Rvb2–Tah1–Pih1/prefoldin-like (R2TP/PFDL)-комплекс, является специфическим шапероном, отвечающим за сборку и созревание многих ключевых мультисубъединичных белковых комплексов в клетках млекопитающих [31]. У млекопитающих этот комплекс состоит из двух модулей, R2TP и PFDL. Cloutier et al. сначала применили метод биотинилирования от сближения (proximity-dependent biotinylation, BioID), чтобы идентифицировать белки, взаимодействующие с двумя субъединицами PAQosome, PIH1D1 и UXT. Оказалось, что эндогенный ASDURF был обогащён в обоих экспериментах. Затем авторы применили аффинную очистку с помощью FLAG-тэга для двух других субъединиц, RPAP3 и URI1, и провели детекцию белковых партнёров с помощью масс-спектрометрии. В этом случае ASDURF также был обнаружен среди обогащённых белковых партнёров. Более того, очистка с помощью ASDURF-FLAG позволила идентифицировать другие субъединицы PAQosome, что подтверждает тот факт, что ASDURF является интегральным компонентом PFDL-модуля. Сборка *in vitro* комплекса PFDL из очищенных компонентов показала, что ASDURF является шестой субъединицей гетерогексамерного комплекса PFDL, который также содержит субъединицы UXT1, PFDN6, PDRG1, URI1 и PFDN2. Взаимодействие ASDURF с другими субъединицами PFDN было независимо подтверждено Hofman et al. [32].

PAQosome вовлечена в регуляцию активности многих мультисубъединичных и рибонуклеопротеиновых комплексов, таких как рибонуклеопротеины семейства L7Ae (snoRNP (малые ядрышковые рибонуклеопротеины) box C/D и H/ACA, snRNP (малые ядерные рибонуклеопротеины) U4, теломеразная и сelenобелковая мРНП), snRNP U5, киназные комплексы Phosphatidylinositol 3-kinase-related (PIKKs) (ATM, ATR, DNA-PKcs, mTOR, SMG-1 и TRRAP) и РНК-полимеразы I, II и III [33–38]. Если ASDURF необходим для функционирования PAQosome, то его отсутствие может повлиять на жизнеспособность клетки. Недавно, используя скринирование с помощью CRISPR–Cas9, Hofman et al. [32] показали, что инактивация *ASDURF* снижает жизнеспособность клеток MYC-направляемой медуллобластомы. Важно отметить, что возобновление экспрессии *ASDURF* возвращало жизнеспособность клеток. *In vivo* нокаут *ASDURF* увеличивал общую выживаемость мышей с ксенографтами D425 MYC-направляемых клеток медуллобластомы. Интересно отметить, что нокаут *ASDURF in vitro* снижал включение бромоуридина в S-фазе клеточного цикла, что говорит о возможной активности ASDURF/PFDL в контроле клеточного цикла.

Значительно меньше известно про ASNSD1, который закодирован во втором цистроне.



**Рис. 1.** ASDURF-ASNSD1. *а* – Данные Riboseq и RNAseq для гена ASNSD1, полученные с помощью геномного браузера GWIPS-Viz [24]. Эволюционная консервативность нуклеотидов у 100 позвоночных показана как сигнал PhyloP (phyloP100way) [25]. *б* – Данные Riboseq из транскриптомного браузера Ribocrypt (ribocrypt.org, подготавливается к публикации), рибосомные футпринты окрашены в цвета, соответствующие трем открытым рамкам считывания, показаны внизу диаграммы. *в* – Множественное выравнивание последовательности, проведённое с помощью инструмента CodAlignView («CodAlignView: a tool for exploring signatures of protein-coding evolution in an alignment», I. Jungreis, M. Lin, M. Kellis, in preparation), использован набор выравниваний hg30\_100. *г* – Структурные модели получены с помощью AlphaFold3 [26]. Выравнивание последовательностей проводилось с помощью ClustalW [27]. *д* – Схематическое представление бицистронной мРНК ASDURF-ASNSD1. AUG-кодоны, расположенные перед вторым цистроном, отмечены цветными стрелками. Функциональная роль соответствующих белковых продуктов показана на схеме внизу

ASNSD1 имеет *N*-концевой домен class-II glutamine amidotransferase и *C*-концевой домен asparagine synthase B, принадлежащий к суперсемейству adenine nucleotide alpha hydrolase (AANH). Этот белок, скорее всего, вовлечён в синтез аспарагина.

Анализ данных рибосомного профилирования человеческих клеточных линий показывает наличие трёх транслируемых участков: короткой uORF, кодирующую двухаминокислотный MP-пептид (расположена на расстоянии 46 нуклеотидов от первого цистрона), *ASDURF* (первый цистрон) и *ASNSD1* (второй цистрон) (рис. 1, б). Триплетная периодичность сигнала рибосомного профилирования соответствует трансляции этих трёх открытых рамок считывания. *ASDURF* транслируется на порядок более эффективно по сравнению с *ASNSD1*, что, по всей видимости, говорит о том, что первый цистрон подавляет трансляцию второго цистрона (рис. 1, б). Однако интересно отметить, что в экспериментах с репортерными конструкциями мутация стартового кодона *ASDURF* активировала трансляцию люциферазы, слитой со стартовым кодоном второго цистрона, всего в 2 раза [39], что меньше ожидаемого эффекта. По всей видимости, в случае, когда стартовый AUG-кодон *ASDURF* мутирован, рибосомы начинают инициировать на тех AUG-кодонах внутри открытой рамки считывания *ASDURF*, которые в норме не узнаются.

Филогенетический анализ показал, что последовательность *ASDURF*, которая соответствует первому экзону, консервативна у млекопитающих, в то же время последовательности 2 и 3 экзонов содержат множественные синонимичные замены также в геномах позвоночных (рис. 1, в). Анализ *ASNSD1*-генов *Gallus gallus* и *Danio rerio* показал, что эти животные имеют альтернативные первые экзоны, содержащие AUG-кодон в рамке считывания *ASDURF*. Из-за этого *N*-концевая часть *ASDURF* является наиболее вариабельной. Однако, в соответствии с моделированием с помощью AlphaFold 3, эти белки тем не менее могут иметь похожую структурную организацию, соответствующую структуре b-префолдина (рис. 1, г).

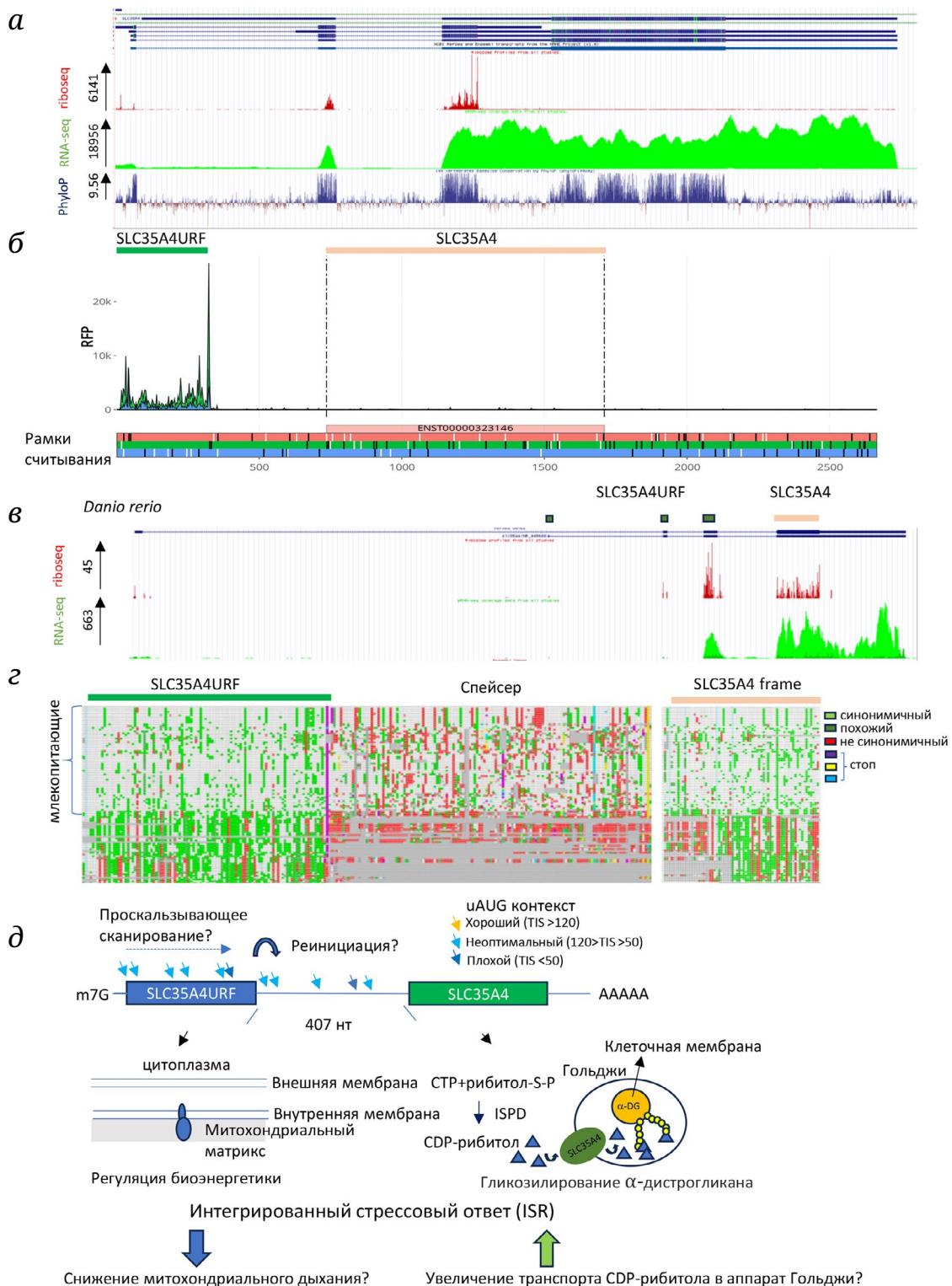
Каким образом может регулироваться трансляция бицистронной мРНК *ASDURF–ASNSD1*? Чтобы исследовать эффективность инициации на AUG-кодонах, мы исследовали данные о количественном анализе трансляционной эффективности AUG-кодонов со всеми возможными комбинациями нуклеотидного контекста в положении от -6 до +5 [40]. Эффективность контекстов стартовых кодонов находится в диапазоне от 12 (самые неэффективные) до 150 (самые эффективные). Интересно отметить, что все AUG-кодоны, расположенные перед *ASNSD1*, включая стартовый кодон *ASDURF*, имеют средние или слабые кон-

тексты (рис. 1, д). Основываясь на этих данных, мы предполагаем, что трансляция *ASNSD1* может регулироваться или в условиях изменения эффективности узнавания стартовых кодонов, или при регуляции скорости элонгации трансляции. Усиление инициации на неоптимальных AUG-кодонах или снижение скорости рибосом, транслирующих первый цистрон *ASDURF*, должно, в свою очередь, значительно снижать трансляцию второго цистрона *ASNSD1*.

#### SLC35A4URF–SLC35A4

Генетический локус *SLC35A4* кодирует белок, для которого изначально была предсказана активность в трансмембранным транспорте пиримидиновых нуклеотидов, связанных с сахарами. Кроме того, в этом локусе находится короткий белок-кодирующий ген ENSG00000293600, который расположен перед *SLC35A4*. По аналогии с описанным ранее случаем мы предлагаем называть этот ген *SLC35A4URF*. *SLC35A4URF* может транслироваться либо как отдельная открытая рамка считывания, если используется альтернативный сайт полиденилирования между *SLC35A4* и *SLC35A4URF*, или в составе бицистронной мРНК. На основании анализа данных CAGE, полученных в ходе выполнения проекта FANTOM5 [22] (анализ проводился в геномном браузере Zenbu [23]), можно заключить, что *SLC35A4* может транслироваться только с бицистронной мРНК (рис. 2, а, рис. П1, б).

В 2015 г. мы предсказали, что вышерасположенная короткая открытая рамка считывания в гене *SLC35A4* может кодировать функциональный белок [41]. Функциональная роль *SLC35A4URF*, или *SLC35A4*-MP, изучалась в двух недавних работах, где было показано, что этот белок связан с митохондриями [42, 43]. Yang et al. [43] показали, что белок *SLC35A4URF* локализован в митохондриях. Используя ко-иммунопреципитацию и последующую масс-спектрометрию, а также анализ с помощью Вестерн-блоттинга, авторы показали, что изучаемый белок взаимодействует с белками внешней мембраны митохондрий, в частности, с VDAC1 и VDAC3. Кроме того, эксперименты по совместному окрашиванию показали, что *SLC35A4URF* колокализуется с маркером внешней митохондриальной мембраны TOMM20. Rocha et al. [42] создали кроличьи поликлональные антитела против *SLC35A4URF* и также показали, что этот белок локализован в митохондриях. Однако на основании экспериментов с протеиназой K был сделан вывод о том, что *SLC35A4URF* является белком не внешней, а внутренней мембраны митохондрий. Эти результаты согласуются с наличием однопроходного трансмембранныго домена,



**Рис. 2.** *SLC35A4URF-SLC35A4*. а – Данные Riboseq и RNAseq для гена *SLC35A4*, полученные с помощью геномного браузера GWIPS-Viz [24]. Эволюционная консервативность нуклеотидов у 100 позвоночных показана как сигнал PhyloP (phyloP100way) [25]. б – Данные Riboseq из транскриптомного браузера Ribocrypt (ribocrypt.org, подготовливается к публикации), рибосомные футпринты окрашены в цвета, соответствующие трем открытым рамкам считывания, показаны внизу диаграммы. в – Данные Riboseq и RNAseq для гена *SLC35A4* *Danio rerio*, полученные с помощью геномного браузера GWIPS-Viz [24]. г – Множественное выравнивание последовательности, проведённое с помощью CodAlignView («CodAlignView: a tool for exploring signatures of protein-coding evolution in an alignment», I. Jungreis, M. Lin, M. Kellis, in preparation), использован набор выравниваний hg30\_100 E. д – Схематическое представление бицистронной мРНК *SLC35A4URF-SLC35A4*. AUG-кодоны, расположенные перед вторым цистроном, отмечены цветными стрелками. Функциональная роль соответствующих белковых продуктов показана на схеме внизу

расположенного между аминокислотами 62 и 84 в SLC35A4URF [42].

Было показано, что функциональная роль SLC35A4URF связана с дыхательной цепью митохондрий. Используя редактирование генома, Rocha et al. создали соответствующую нокаутную линию HEK293T и показали, что потеря SLC35A4URF приводит к значительному подавлению базального и максимального дыхания, а также дыхания при утечке протонов. Интересно отметить, что трёхкратное повышение экспрессии SLC35A4URF в клетках MCF7 нарушает клеточный рост, что сопровождается потерей мембранныго потенциала митохондрий. Кроме того, происходит активация транскрипции генов, вовлечённых в путь, связанные с активностью митохондрий, такие как ответ на гипоксию и негативная регуляция мембранныго потенциала митохондрий. Эти результаты говорят о том факте, что количество SLC35A4URF должно строго регулироваться для поддержания оптимального клеточного роста.

Функциональная роль продукта второго цистрона, SLC35A4, связана с регуляцией гликозилирования в аппарате Гольджи. SLC35A4 и его паралог SLC35A1 могут быть вовлечены в транспорт CDP-рибитола (CDP-ribitol) из цитоплазмы в аппарат Гольджи [44]. CDP-рибитол, который синтезируется в цитоплазме с помощью фермента ISPD, используется для сборки сложного гликана на гликобелке α-дистрогликане ( $\alpha$ -dystroglycan) при помощи ферментов аппарата Гольджи FKTN и FKRP [45]. Эта модификация с помощью остатков рибитола необходима для правильного взаимодействия  $\alpha$ -дистрогликана с белками внеклеточного матрикса, такими как ламинин. Локализация экзогенного белка SLC35A4 в аппарате Гольджи была показана Rocha et al. [42].

Данные Riboseq для бицистронной мРНК SLC35A4URF-SLC35A4 показывают, что первый цистрон транслируется эффективно, при этом трансляция второго цистрона практически не детектируется (рис. 2, а и б). После открытой рамки считывания первого цистрона, имеющей длину 312 нт, следует спейсер длиной 407 нт, который содержит несколько AUG-кодонов (всего перед вторым цистроном находятся 11 AUG). Филогенетический анализ показал, что спейсерный регион является наименее консервативным в геномах позвоночных (рис. 2, г). Интересно отметить, что данные рибосомного профилирования для *Danio rerio*, у которой межцистронный спейсерный участок гораздо короче по сравнению с человеком, показывают трансляцию обоих цистронов (рис. 2, в).

Регуляция трансляции бицистронной мРНК SLC35A4URF-SLC35A4 при интегрированном стрессовом ответе (ISR) была обнаружена в двух неза-

висимых исследованиях [41, 46]. При развитии ISR трансляция SLC35A4 значительно увеличивается, что сопровождается подавлением трансляции первого цистрона. Andreev et al. [41] использовали репортерные конструкции, в которых второй цистрон был заменён геном люциферазы светлячка. В нормальных условиях трансляция копированной бицистронной мРНК давала очень низкие, но детектируемые значения люциферазной активности. Эти значения были на два порядка ниже значений для репортерной мРНК с коротким 5'-лидером. После обработки арсенитом, который вызывает фосфорилирование фактора инициации eIF2, трансляция второго цистрона увеличивалась, в то время как трансляция контрольной репортерной мРНК подавлялась примерно в 10 раз. Таким образом, последовательность мРНК перед вторым цистроном SLC35A4 достаточна для приятия устойчивости к стрессу. Анализ последовательности показывает, что все 11 AUG-кодонов, расположенных перед вторым цистроном, имеют неоптимальные нуклеотидные контексты (рис. 2, д). Вероятно, трансляция второго цистрона возможна благодаря проскальзывающему сканированию.

Подводя итог, можно предположить, что трансляционный контроль SLC35A4URF-SLC35A4 может связывать митохондриальное дыхание и межклеточный матрикс. При ISR трансляция первого цистрона снижается, что должно приводить к снижению активности дыхательной цепи митохондрий. В то же время стресс-зависимая активация трансляции второго цистрона, SLC35A4, может стимулировать созревание  $\alpha$ -дистрогликана. Стоит отметить, что трансляция SLC35A1, который также вовлечён в транспорт CDP-рибитола, значительно подавляется при стрессе, вызванном обработкой арсенитом [41]. Интересно, что при оверэкспрессии SLC35A4 в клетках, в которых отсутствует SLC35A1, гликозилирование  $\alpha$ -дистрогликана восстанавливается, однако молекулярный вес его гликозилированной формы значительно снижается [44]. По всей видимости, SLC35A4 способен менять паттерн гликозилирования своего субстрата. Можно предположить, что в условиях стресса паттерн гликозилирования  $\alpha$ -дистрогликана может меняться из-за изменения соотношения белков SLC35A4 и SLC35A1.

## MIURF–MIEF1

На основании филогенетического анализа вышеупомянутой открытой рамки считывания было выдвинуто предположение, что генетический локус MIEF1 может кодировать бицистронную мРНК [41]. Продукт трансляции второго

цистрона, MIEF1, играет роль в регуляции деления и слияния митохондрий. Кроме того, в первом цистроне (ENSG00000285025) закодирован небольшой белок MIURF. Этот белок локализован в митохондриях и, возможно, также способен регулировать активность MIEF1. На основании анализа данных CAGE, полученных в ходе выполнения проекта FANTOM5 [22] (анализ проводился в геномном браузере Zenbu [23]), было выяснено, что *MIURF* и *MIEF1* имеют общий промотор (рис. 1П, в).

*MIEF1* (также известен как MID51) и *MIEF2* (также известен как MID49) являются двумя схожими белками, открытыми в 2011 году. Эти белки вовлечены в регуляцию динамики митохондрий, поскольку при их подавлении или оверэкспрессии меняется морфология митохондрий – происходит их деление или слияние [47]. Белки семейства *MIEF* являются белками внешней митохондриальной мембранны. Эти белки содержат однопроходный трансмембранный домен на своём *N*-конце, при этом большая часть белка ориентирована в цитозоль. Белки семейства *MIEF* являются рецепторами, связывающими как белки, активирующие слияние митохондрий (*MFN1* и *MFN2*), так и белок *DRP1*, активирующий деление митохондрий [48]. Было показано, что белки семейства *MIEF* могут образовывать олигомеры, а также взаимодействовать со своими цитоплазматическими доменами, что может приводить к сближению и последующему слиянию соседних митохондрий [48].

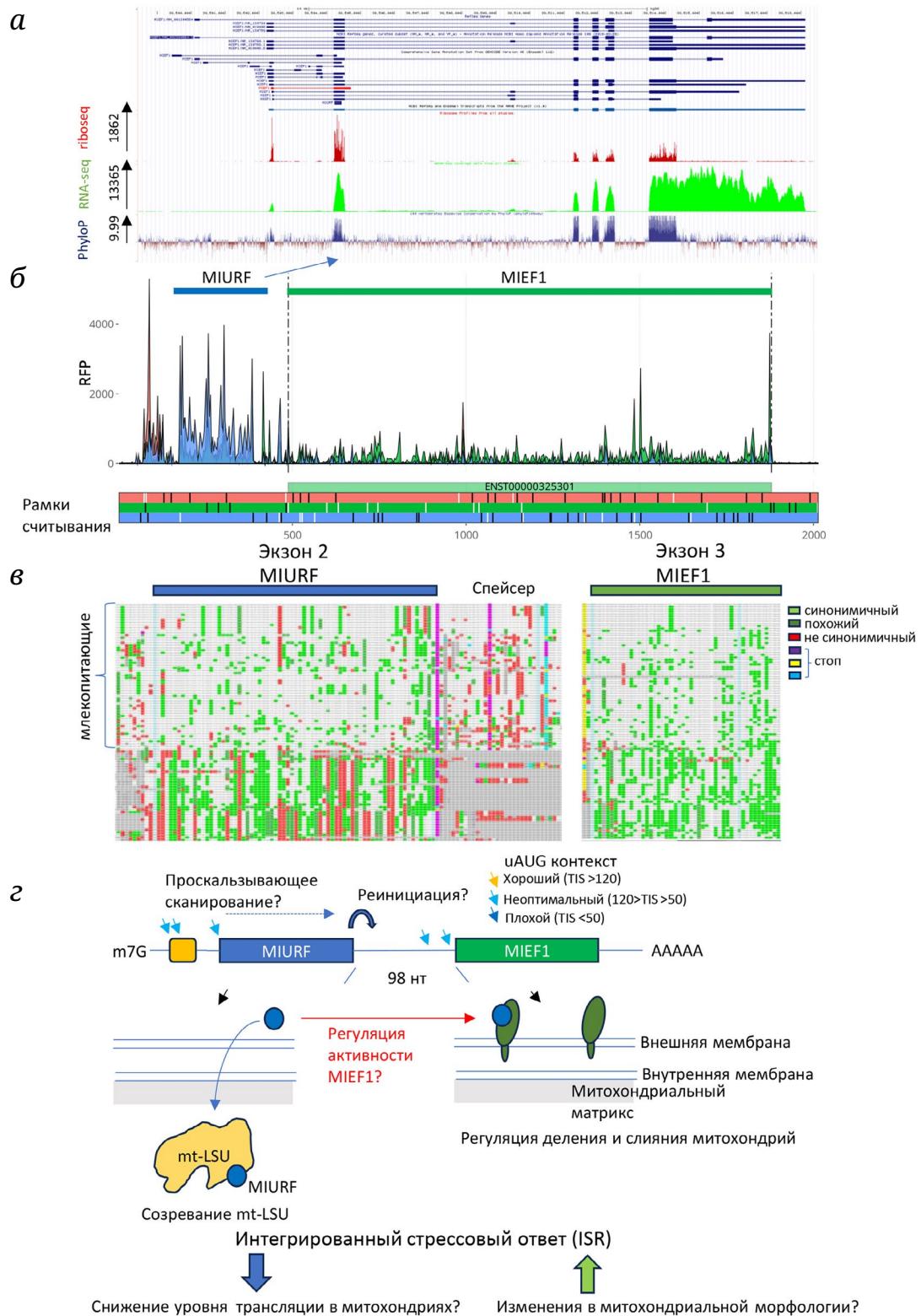
Белок *MIURF*, закодированный в первом цистроне, имеет две различные активности: он регулирует трансляцию в митохондриальном матриксе, а также регулирует активность *MIEF1*, который локализован на цитоплазматической стороне внешней мембранны митохондрий. *MIURF* был впервые обнаружен в составе интермедиата сборки большой рибосомной субчастицы митохондрий. Незрелые рибосомные субъединицы митохондрий были выделены из клеточной линии, полученной на основе HEK293S, и проанализированы с помощью криоэлектронной микроскопии. Авторы обнаружили дополнительную электронную плотность рядом с белком *uL14m*. Используя алгоритмы предсказания пространственной структуры на основе электронной плотности, а также проведя анализ белков методом масс-спектрометрии, исследователи идентифицировали три белка: *MALSU*, *mt-ACP* и *MIURF* (на момент публикации этот белок назывался *L0R8F8*). Было предположено, что этот белковый модуль предотвращает преждевременную ассоциацию рибосомных субчастиц [49]. Rathore et al. [50] получили дополнительное подтверждение того, что *MIURF* вовлечен в регуляцию митохондриальной трансляции. Используя разные подходы, авторы показали, что *MIURF* взаимодействует с митохон-

дриальной рибосомой, и что *MIURF* стимулирует митохондриальную трансляцию. Важно отметить: в этих двух работах было показано, что митохондриальные рибосомы взаимодействуют с эндогенным белком *MIURF*, что является серьёзным аргументом, подтверждающим вовлечённость этого белка в процесс трансляции в митохондриях. До конца не ясно, является ли *MIURF* только фактором биогенеза рибосом, или он также способен напрямую участвовать в процессе трансляции.

Другая активность *MIURF* была обнаружена в 2020 году. Chen et al. [51] применили полногеномный скрининг CRISPR, чтобы идентифицировать неканонические открытые рамки считывания, которые влияют на клеточный рост, и в результате *MIURF* попал в список наиболее значимых обнаружений. Далее, авторы показали, что экзогенный *MIURF*, слитый с *Teg*, способен физически взаимодействовать с продуктом второго цистрона *MIEF1*. Важно отметить, что и *Teg*-модифицированный *MIEF1* позволил выделить *MIURF*. Интересно отметить, что оверэкспрессия *MIURF* приводит к делению митохондрий, а нокаут *MIURF* приводит к повышенному слиянию митохондрий. Данный эффект может быть устранён при экзогенной экспрессии *MIURF*. Эти результаты показывают, что *MIURF* может влиять на активность *MIEF1* за счёт регуляции взаимодействий с белками, регулирующими деление и слияние митохондрий.

Для того чтобы понять, как может регулироваться трансляция бицистронной мРНК *MIURF-MIEF1*, мы проанализировали данные рибосомного профилирования (рис. 3, а и б) и провели филогенетический анализ (рис. 3, в). Данные Riboseq говорят о трансляции обоих цистронов в бицистронной мРНК. У человека перед вторым цистроном находятся 5 AUG-кодоны. С третьего AUG-кодона в неоптимальном нуклеотидном контексте начинается трансляция *MIURF*. Анализ геномов позвоночных говорит о том, что открытая рамка считывания *MIURF* консервативна у позвоночных, в то же время спейсер между двумя цистронами менее консервативен. Поскольку все пять AUG-кодонов имеют неоптимальные нуклеотидные контексты, можно предположить, что трансляция второго цистрона может регулироваться за счёт проскальзывающего сканирования (рис. 3, г).

Интересно отметить, что трансляция *MIURF* и *MIEF1* дифференциально регулируется в процессе развития ISR, индуцированного обработкой клеток арсенитом [41]. В условиях стресса значительно снижается соотношение трансляции первого цистрона *MIURF* и второго цистрона *MIEF1*. Этот результат говорит о возможности того, что трансляционный контроль *MIURF* и *MIEF1*



**Рис. 3.** MIURF–MIEF1. *а* – Данные Riboseq и RNAseq для гена *MIEF1*, полученные с помощью геномного браузера GWIPS-Viz [24]. Эволюционная консервативность нуклеотидов у 100 позвоночных показана как сигнал PhyloP (phyloP100way) [25]. *б* – Данные Riboseq из транскриптомного браузера Riboscrypt (riboscrypt.org, подготавливается к публикации), рибосомные футпринты окрашены в цвета, соответствующие трём открытым рамкам считывания, показаны внизу диаграммы. *в* – Множественное выравнивание последовательности, проведённое с помощью CodAlignView («CodAlignView: a tool for exploring signatures of protein-coding evolution in an alignment», I. Jungreis, M. Lin, M. Kellis, *in preparation*), использован набор выравниваний hg30\_100. *г* – Схематическое представление бицистронной мРНК *MIURF–MIEF1*. AUG-кодоны, расположенные перед вторым цистроном, отмечены цветными стрелками. Функциональная роль соответствующих белковых продуктов показана на схеме внизу

может оказывать влияние на различные митохондриальные процессы. При нормальных условиях *MIURF* продуцируется больше, чем *MIEF1*. Протеомный анализ, проведённый в работе Delcourt et al. [52], показал, что отношение белков *MIURF/MIEF* при нормальных условиях роста для клеток HEK293, HeLa и клеток кишечника человека составляет 2,71, 5,73 и 2,62 соответственно. Поскольку *MIURF* синтезируется в цитоплазме, он способен в первую очередь связаться с *MIEF1*, который локализован на поверхности внешней мембраны митохондрий. Избыток молекул *MIURF*, по-видимому, затем транспортируется в митохондриальный матрикс для участия в созревании митохондриальных рибосом. При стрессе отношение количества *MIURF* и *MIEF1* снижается. Если все имеющиеся молекулы *MIURF* окажутся связаны в комплексе с *MIEF1*, биогенез рибосом в митохондриях будет заблокирован. Эта гипотеза требует экспериментального подтверждения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведен анализ данных о трансляционной регуляции и функциональной роли трёх бицистронных мРНК, которые эволюционно консервативны у позвоночных. Во всех трёх случаях два цистрона играют различные функциональные роли. В связи с этим возникает вопрос о том, каким образом данные бицистронные мРНК могли возникнуть в ходе эволюции. Стоит отметить, что все три гена имеют паралоги, соответствующие их вторым цистронам (*ASNS*; *SLC35A1*, *A2*, *A3*, *A5* и *MIEF2*), при этом у таких паралогов нет соответствующих вышерасположенных открытых рамок считывания. На основании этого можно предположить, что *ASNSD1*, *SLC35A4* и *MIEF1* могли образоваться в процессе дупликации генов, при котором произошло объединение с первыми цистронами, которые до этого функционировали индивидуально. Такие слияния привели к образованию регуляторных систем, которые контролируются на трансляционном уровне, что по какой-то причине оказалось положительное влияние на жизнеспособность организма и сохранилось в процессе эволюции. Интересно отметить, что межцистронные последовательности, которые должны оказывать значительное влияние на регуляцию трансляции, в целом менее консервативны по сравнению с цистронами. Вероятно, эти последовательности эволюционировали по-разному у разных животных, чтобы обеспечивать точный трансляционный контроль. В качестве примера можно привести ген *SLC35A4*, в котором межцистронный спейсер у человека имеет значительно большую длину и

больше AUG-кодонов (5 и 1 AUG) по сравнению с *Danio rerio*.

Необычная бицистронная организация мРНК предполагает наличие специфических механизмов трансляционного контроля. Изменения в активности компонентов трансляционного аппарата способны привести к быстрому изменению трансляции белков, закодированных в первых и вторых цистронах. Действительно, для двух из трёх описанных бицистронных мРНК было показано, что их трансляция дифференциально регулируется в условиях ISR, когда концентрация тройного комплекса eIF2–Met-tRNAi–GTP (tRNAi – инициаторная тРНК) становится лимитирующей. Вероятно, что регуляция трансляции этих мРНК не ограничивается ISR. Мы обнаружили, что во всех трёх случаях AUG-кодоны, расположенные перед вторым цистроном, имеют неоптимальные нуклеотидные контексты. Исходя из этого, можно предположить, что регуляция трансляции может осуществляться в условиях, при которых меняется эффективность выбора стартовых кодонов. Ключевые факторы инициации, влияющие на эффективность выбора стартовых кодонов – это eIF1 и eIF5 [53–59]. Повышенный уровень eIF1 снижает инициацию на неоптимальных стартовых кодонах, eIF5 имеет противоположный эффект. Мы предполагаем, что эти факторы инициации способны регулировать трансляцию бицистронных мРНК, обсуждаемых в рамках данной работы. eIF4G2, также известный как DAP5 – ещё один белок, способный регулировать трансляцию бицистронных мРНК. В нескольких недавних работах показано, что eIF4G2 может регулировать трансляцию мРНК, имеющих короткие открытые рамки считывания в своих 5'-лидерах. Эта регуляция осуществляется либо за счёт проскальзывающего сканирования, либо за счёт реинициации [60–65]. В частности, было показано, что eIF4G2 регулирует трансляцию мРНК *POLG*, которая кодирует два различных белка, *POLG* и *POLGARF* [66]. Очень интересно выяснить, какие факторы отвечают за дифференциальную трансляцию двух цистронов в случае *ASNSD1*, *SLC35A4* и *MIEF1*.

Количество аннотированных бицистронных мРНК продолжает увеличиваться. Недавно 25 коротких открытых рамок считывания в 5'-лидерах были аннотированы как новые белок-кодирующие гены [67]. Изучение функциональной роли этих новых белок-кодирующих генов позволит понять принципы эволюционирования геномов и установить новые случаи связанных различными клеточными процессов за счёт трансляционного контроля новых бицистронных мРНК. Для изучения этих случаев будут полезны приведённые в данной работе примеры: *ASNSD1*, *SLC35A4* и *MIEF1*.

**Вклад авторов.** Д.Е. Андреев – концепция исследования, анализ данных, написание рукописи; Д.Е. Андреев, И.Н. Шатский – редактирование рукописи.

**Финансирование.** Эта работа поддержана Российским научным фондом (грант 20-14-00121).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozak, M. (1980) Evaluation of the “scanning model” for initiation of protein synthesis in eucaryotes, *Cell*, **22**, 7-8, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90148-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90148-8).
2. Hinnebusch, A. G. (2011) Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **75**, 434-467, first page of table of contents, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-11>.
3. Hinnebusch, A. G. (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 779-812, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>.
4. Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., and Sonenberg, N. (2016) Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs, *Science*, **352**, 1413-1416, <https://doi.org/10.1126/science.aad9868>.
5. Shirokikh, N. E., and Preiss, T. (2018) Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **9**, e1473, <https://doi.org/10.1002/wrna.1473>.
6. Rogozin, I. B., Kochetov, A. V., Kondrashov, F. A., Koonin, E. V., and Milanesi, L. (2001) Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a ‘weak’ context of the start codon, *Bioinformatics*, **17**, 890-900, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.10.890>.
7. Suzuki, Y., Ishihara, D., Sasaki, M., Nakagawa, H., Hata, H., Tsunoda, T., Watanabe, M., Komatsu, T., Ota, T., Isogai, T., Suyama, A., and Sugano, S. (2000) Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using “Oligo-Capped” cDNA libraries, *Genomics*, **64**, 286-297, <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6076>.
8. Pesole, G., Gissi, C., Grillo, G., Licciulli, F., Liuni, S., and Saccone, C. (2000) Analysis of oligonucleotide AUG start codon context in eukaryotic mRNAs, *Gene*, **261**, 85-91, [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00471-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00471-6).
9. Davuluri, R. V., Suzuki, Y., Sugano, S., and Zhang, M. Q. (2000) CART classification of human 5' UTR sequences, *Genome Res.*, **10**, 1807-1816, <https://doi.org/10.1101/gr.gr-1460r>.
10. Andreev, D. E., Loughran, G., Fedorova, A. D., Mikhaylova, M. S., Shatsky, I. N., and Baranov, P. V. (2022) Non-AUG translation initiation in mammals, *Genome Biol.*, **23**, 111, <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02674-2>.
11. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R., and Weissman, J. S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling, *Science*, **324**, 218-223, <https://doi.org/10.1126/science.1168978>.
12. Dever, T. E., Ivanov, I. P., and Hinnebusch, A. G. (2023) Translational regulation by uORFs and start codon stringency, *Genes Dev.*, **37**, 474-489, <https://doi.org/10.1101/gad.350752.123>.
13. Tidu, A., and Martin, F. (2024) The interplay between cis- and trans-acting factors drives selective mRNA translation initiation in eukaryotes, *Biochimie*, **217**, 20-30, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2023.09.017>.
14. Renz, P. F., Valdivia-Francia, F., and Sendoel, A. (2020) Some like it translated: small ORFs in the 5'UTR, *Exp. Cell Res.*, **396**, 112229, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112229>.
15. Silva, J., Fernandes, R., and Romao, L. (2019) Translational regulation by upstream open reading frames and human diseases, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1157**, 99-116, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-19966-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-19966-1_5).
16. Chen, H. H., and Tarn, W. Y. (2019) uORF-mediated translational control: recently elucidated mechanisms and implications in cancer, *RNA Biol.*, **16**, 1327-1338, <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1632634>.
17. Zhang, H., Wang, Y., and Lu, J. (2019) Function and evolution of upstream ORFs in eukaryotes, *Trends Biochem. Sci.*, **44**, 782-794, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.03.002>.
18. Cabrera-Quio, L. E., Herberg, S., and Pauli, A. (2016) Decoding sORF translation - from small proteins to gene regulation, *RNA biology*, **13**, 1051-1059, <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1218589>.
19. Young, S. K., and Wek, R. C. (2016) Upstream open reading frames differentially regulate gene-specific translation in the integrated stress response, *J. Biol. Chem.*, **291**, 16927-16935, <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.733899>.
20. Wethmar, K. (2014) The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **5**, 765-778, <https://doi.org/10.1002/wrna.1245>.
21. Somers, J., Poyry, T., and Willis, A. E. (2013) A perspective on mammalian upstream open reading frame function, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 1690-1700, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.020>.
22. Lizio, M., Harshbarger, J., Shimoji, H., Severin, J., Kasukawa, T., Sahin, S., Abugessaisa, I., Fukuda, S., Hori, F., Ishikawa-Kato, S., Mungall, C. J., Arner, E., Baillie, J. K., Bertin, N., Bono, H., de Hoon, M., Diehl, A. D., Dimont, E.,

- Freeman, T. C., Fujieda, K., et al. (2015) Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas, *Genome Biol.*, **16**, 22, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0560-6>.
23. Severin, J., Lizio, M., Harshbarger, J., Kawaji, H., Daub, C. O., Hayashizaki, Y., Consortium, F., Bertin, N., and Forrest, A. R. (2014) Interactive visualization and analysis of large-scale sequencing datasets using ZENBU, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 217-219, <https://doi.org/10.1038/nbt.2840>.
24. Slavoff, S. A., Mitchell, A. J., Schwaid, A. G., Cabili, M. N., Ma, J., Levin, J. Z., Karger, A. D., Budnik, B. A., Rinn, J. L., and Saghatelian, A. (2013) Peptidomic discovery of short open reading frame-encoded peptides in human cells, *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 59-64, <https://doi.org/10.1038/ncchembio.1120>.
25. Keshishian, H., Addona, T., Burgess, M., Kuhn, E., and Carr, S. A. (2007) Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution, *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 2212-2229, <https://doi.org/10.1074/mcp.M700354-MCP200>.
26. Cloutier, P., Poitras, C., Faubert, D., Bouchard, A., Blanchette, M., Gauthier, M. S., and Coulombe, B. (2020) Upstream ORF-encoded ASDURF is a novel prefoldin-like subunit of the PAQosome, *J. Proteome Res.*, **19**, 18-27, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00599>.
27. Houry, W. A., Bertrand, E., and Coulombe, B. (2018) The PAQosome, an R2TP-based chaperone for quaternary structure formation, *Trends Biochem. Sci.*, **43**, 4-9, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.001>.
28. Hofman, D. A., Ruiz-Orera, J., Yannuzzi, I., Murugesan, R., Brown, A., Clauser, K. R., Condurat, A. L., van Dinter, J. T., Engels, S. A. G., Goodale, A., van der Lugt, J., Abid, T., Wang, L., Zhou, K. N., Vogelzang, J., Ligon, K. L., Phoenix, T. N., Roth, J. A., Root, D. E., Hubner, N., et al. (2024) Translation of non-canonical open reading frames as a cancer cell survival mechanism in childhood medulloblastoma, *Mol. Cell*, **84**, 261-276, e218, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.12.003>.
29. Michel, A. M., Fox, G., Kiran, A. M., De Bo, C., O'Connor, P. B., Heaphy, S. M., Mullan, J. P., Donohue, C. A., Higgins, D. G., and Baranov, P. V. (2014) GWIPS-viz: development of a ribo-seq genome browser, *Nucleic Acids Res.*, **42**, D859-864, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1035>.
30. Pollard, K. S., Hubisz, M. J., Rosenbloom, K. R., and Siepel, A. (2010) Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies, *Genome Res.*, **20**, 110-121, <https://doi.org/10.1101/gr.097857.109>.
31. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C. C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Zemgulyte, A., Arvaniti, E., Beattie, C., et al. (2024) Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3, *Nature*, **630**, 493-500, <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
32. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680, <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
33. Boulon, S., Marmier-Gourrier, N., Pradet-Balade, B., Wurth, L., Verheggen, C., Jady, B. E., Rothe, B., Pescia, C., Robert, M. C., Kiss, T., Bardoni, B., Krol, A., Branlant, C., Allmang, C., Bertrand, E., and Charpentier, B. (2008) The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery, *J. Cell Biol.*, **180**, 579-595, <https://doi.org/10.1083/jcb.200708110>.
34. Cloutier, P., Poitras, C., Durand, M., Hekmat, O., Fiola-Masson, E., Bouchard, A., Faubert, D., Chabot, B., and Coulombe, B. (2017) R2TP/Prefoldin-like component RUVBL1/RUVBL2 directly interacts with ZNHIT2 to regulate assembly of U5 small nuclear ribonucleoprotein, *Nat. Commun.*, **8**, 15615, <https://doi.org/10.1038/ncomms15615>.
35. Malinova, A., Cvackova, Z., Mateju, D., Horejsi, Z., Abeza, C., Vandermoere, F., Bertrand, E., Stanek, D., and Verheggen, C. (2017) Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones, *J. Cell Biol.*, **216**, 1579-1596, <https://doi.org/10.1083/jcb.201701165>.
36. Horejsi, Z., Takai, H., Adelman, C. A., Collis, S. J., Flynn, H., Maslen, S., Skehel, J. M., de Lange, T., and Boulton, S. J. (2010) CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability, *Mol. Cell*, **39**, 839-850, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.037>.
37. Kim, S. G., Hoffman, G. R., Poulogiannis, G., Buel, G. R., Jang, Y. J., Lee, K. W., Kim, B. Y., Erikson, R. L., Cantley, L. C., Choo, A. Y., and Blenis, J. (2013) Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex, *Mol. Cell*, **49**, 172-185, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.003>.
38. Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., Azzag, K., Robert, M. C., Ahmad, Y., Neel, H., Lamond, A. I., and Bertrand, E. (2010) HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II, *Mol. Cell*, **39**, 912-924, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.023>.
39. Nelde, A., Flotto, L., Jurgens, L., Szymik, L., Hubert, E., Bauer, J., Schliemann, C., Kessler, T., Lenz, G., Rammensee, H. G., Walz, J. S., and Wethmar, K. (2022) Upstream open reading frames regulate translation of cancer-associated transcripts and encode HLA-presented immunogenic tumor antigens, *Cell. Mol. Life Sci.*, **79**, 171, <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04145-0>.

40. Noderer, W. L., Flockhart, R. J., Bhaduri, A., Diaz de Arce, A. J., Zhang, J., Khavari, P. A., and Wang, C. L. (2014) Quantitative analysis of mammalian translation initiation sites by FACS-seq, *Mol. Systems Biol.*, **10**, 748, <https://doi.org/10.15252/msb.20145136>.
41. Andreev, D. E., O'Connor, P. B., Fahey, C., Kenny, E. M., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Cormican, P., Morris, D. W., Shatsky, I. N., and Baranov, P. V. (2015) Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression, *eLife*, **4**, e03971, <https://doi.org/10.7554/eLife.03971>.
42. Rocha, A. L., Pai, V., Perkins, G., Chang, T., Ma, J., De Souza, E. V., Chu, Q., Vaughan, J. M., Diedrich, J. K., Ellisman, M. H., and Saghatelian, A. (2024) An inner mitochondrial membrane microprotein from the SLC35A4 upstream ORF regulates cellular metabolism, *J. Mol. Biol.*, **436**, 168559, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168559>.
43. Yang, H., Li, Q., Stroup, E. K., Wang, S., and Ji, Z. (2024) Widespread stable noncanonical peptides identified by integrated analyses of ribosome profiling and ORF features, *Nat. Commun.*, **15**, 1932, <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46240-9>.
44. Ury, B., Potelle, S., Caligiore, F., Whorton, M. R., and Bommer, G. T. (2021) The promiscuous binding pocket of SLC35A1 ensures redundant transport of CDP-ribitol to the Golgi, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100789, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100789>.
45. Gerin, I., Ury, B., Breloy, I., Bouchet-Seraphin, C., Bolsee, J., Halbout, M., Graff, J., Vertommen, D., Muccioli, G. G., Seta, N., Cuisset, J. M., Dabaj, I., Quijano-Roy, S., Grahn, A., Van Schaftingen, E., and Bommer, G. T. (2016) ISPD produces CDP-ribitol used by FKTN and FKRP to transfer ribitol phosphate onto alpha-dystroglycan, *Nat. Commun.*, **7**, 11534, <https://doi.org/10.1038/ncomms11534>.
46. Sidrauski, C., McGeachy, A. M., Ingolia, N. T., and Walter, P. (2015) The small molecule ISRib reverses the effects of eIF2alpha phosphorylation on translation and stress granule assembly, *eLife*, **4**, <https://doi.org/10.7554/eLife.05033>.
47. Palmer, C. S., Osellame, L. D., Laine, D., Koutsopoulos, O. S., Frazier, A. E., and Ryan, M. T. (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery, *EMBO Rep.*, **12**, 565-573, <https://doi.org/10.1038/embor.2011.54>.
48. Yu, R., Liu, T., Jin, S. B., Ankarcrona, M., Lendahl, U., Nister, M., and Zhao, J. (2021) MIEF1/2 orchestrate mitochondrial dynamics through direct engagement with both the fission and fusion machineries, *BMC Biol.*, **19**, 229, <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01161-7>.
49. Brown, A., Rathore, S., Kimanius, D., Aibara, S., Bai, X. C., Rorbach, J., Amunts, A., and Ramakrishnan, V. (2017) Structures of the human mitochondrial ribosome in native states of assembly, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 866-869, <https://doi.org/10.1038/nsmb.3464>.
50. Rathore, A., Chu, Q., Tan, D., Martinez, T. F., Donaldson, C. J., Diedrich, J. K., Yates, J. R., 3rd, and Saghatelian, A. (2018) MIEF1 microprotein regulates mitochondrial translation, *Biochemistry*, **57**, 5564-5575, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00726>.
51. Chen, J., Brunner, A. D., Cogan, J. Z., Nunez, J. K., Fields, A. P., Adamson, B., Itzhak, D. N., Li, J. Y., Mann, M., Leonetti, M. D., and Weissman, J. S. (2020) Pervasive functional translation of noncanonical human open reading frames, *Science*, **367**, 1140-1146, <https://doi.org/10.1126/science.aay0262>.
52. Delcourt, V., Brunelle, M., Roy, A. V., Jacques, J. F., Salzet, M., Fournier, I., and Roucou, X. (2018) The protein coded by a short open reading frame, not by the annotated coding sequence, is the main gene product of the dual-coding gene MIEF1, *Mol. Cell. Proteomics*, **17**, 2402-2411, <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000593>.
53. Grossley, R., Alvarado, C., Ivanov, I. P., Nicholson, O. B., Puglisi, J. D., Dever, T. E., and Lapointe, C. P. (2024) eIF1 and eIF5 dynamically control translation start site fidelity, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2024.07.10.602410>.
54. Ly, J., Xiang, K., Su, K. C., Sissoko, G. B., Bartel, D. P., and Cheeseman, I. M. (2024) Nuclear release of eIF1 globally increases stringency of start-codon selection to preserve mitotic arrest physiology, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2024.04.06.588385>.
55. Loughran, G., Sachs, M. S., Atkins, J. F., and Ivanov, I. P. (2012) Stringency of start codon selection modulates autoregulation of translation initiation factor eIF5, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 2898-2906, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1192>.
56. Ivanov, I. P., Loughran, G., Sachs, M. S., and Atkins, J. F. (2010) Initiation context modulates autoregulation of eukaryotic translation initiation factor 1 (eIF1), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 18056-18060, <https://doi.org/10.1073/pnas.1009269107>.
57. Llacer, J. L., Hussain, T., Saini, A. K., Nanda, J. S., Kaur, S., Gordiyenko, Y., Kumar, R., Hinnebusch, A. G., Lorsch, J. R., and Ramakrishnan, V. (2018) Translational initiation factor eIF5 replaces eIF1 on the 40S ribosomal subunit to promote start-codon recognition, *eLife*, **7**, <https://doi.org/10.7554/eLife.39273>.
58. Martin-Marcos, P., Cheung, Y. N., and Hinnebusch, A. G. (2011) Functional elements in initiation factors 1, 1A, and 2beta discriminate against poor AUG context and non-AUG start codons, *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 4814-4831, <https://doi.org/10.1128/MCB.05819-11>.

59. Nanda, J. S., Cheung, Y. N., Takacs, J. E., Martin-Marcos, P., Saini, A. K., Hinnebusch, A. G., and Lorsch, J. R. (2009) eIF1 controls multiple steps in start codon recognition during eukaryotic translation initiation, *J. Mol. Biol.*, **394**, 268-285, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.017>.
60. Hacisuleyman, E., Hale, C. R., Noble, N., Luo, J. D., Fak, J. J., Saito, M., Chen, J., Weissman, J. S., and Darnell, R. B. (2024) Neuronal activity rapidly reprograms dendritic translation via eIF4G2:uORF binding, *Nat. Neurosci.*, **27**, 822-835, <https://doi.org/10.1038/s41593-024-01615-5>.
61. Shestakova, E. D., Tumbinsky, R. S., Andreev, D. E., Rozov, F. N., Shatsky, I. N., and Terenin, I. M. (2023) The roles of eIF4G2 in leaky scanning and reinitiation on the human dual-coding POLG mRNA, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 17149, <https://doi.org/10.3390/ijms242417149>.
62. She, R., Luo, J., and Weissman, J. S. (2023) Translational fidelity screens in mammalian cells reveal eIF3 and eIF4G2 as regulators of start codon selectivity, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 6355-6369, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad329>.
63. Weber, R., Kleemann, L., Hirschberg, I., Chung, M. Y., Valkov, E., and Igredja, C. (2022) DAP5 enables main ORF translation on mRNAs with structured and uORF-containing 5' leaders, *Nat. Commun.*, **13**, 7510, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35019-5>.
64. David, M., Olender, T., Mizrahi, O., Weingarten-Gabbay, S., Friedlander, G., Meril, S., Goldberg, N., Savidor, A., Levin, Y., Salomon, V., Stern-Ginossar, N., Bialik, S., and Kimchi, A. (2022) DAP5 drives translation of specific mRNA targets with upstream ORFs in human embryonic stem cells, *RNA*, **28**, 1325-1336, <https://doi.org/10.1261/rna.079194.122>.
65. Smirnova, V. V., Shestakova, E. D., Nogina, D. S., Mishchenko, P. A., Prikazchikova, T. A., Zatsepina, T. S., Kulakovskiy, I. V., Shatsky, I. N., and Terenin, I. M. (2022) Ribosomal leaky scanning through a translated uORF requires eIF4G2, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 1111-1127, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1286>.
66. Loughran, G., Zhdanov, A. V., Mikhaylova, M. S., Rozov, F. N., Datskevich, P. N., Kovalchuk, S. I., Serebryakova, M. V., Kiniry, S. J., Michel, A. M., O'Connor, P. B. F., Papkovsky, D. B., Atkins, J. F., Baranov, P. V., Shatsky, I. N., and Andreev, D. E. (2020) Unusually efficient CUG initiation of an overlapping reading frame in POLG mRNA yields novel protein POLGARF, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 24936-24946, <https://doi.org/10.1073/pnas.2001433117>.
67. Mudge, J. M., Ruiz-Orera, J., Prensner, J. R., Brunet, M. A., Calvet, F., Jungreis, I., Gonzalez, J. M., Magrane, M., Martinez, T. F., Schulz, J. F., Yang, Y. T., Alba, M. M., Aspden, J. L., Baranov, P. V., Bazzini, A. A., Bruford, E., Martin, M. J., Calviello, L., Carvunis, A. R., Chen, J., et al. (2022) Standardized annotation of translated open reading frames, *Nat. Biotechnol.*, **40**, 994-999, <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01369-0>.

## A PORTRAIT OF THREE MAMMALIAN BICISTRONIC mRNA TRANSCRIPTS, DERIVED FROM THE GENES *ASNSD1*, *SLC35A4*, and *MIEF1*

### Mini-Review

**D. E. Andreev<sup>1,2\*</sup> and I. N. Shatsky<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
117997 Moscow, Russia; e-mail: cycloheximide@yandex.ru*

<sup>2</sup>*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119992 Moscow, Russia*

Recent advances in functional genomics have allowed identification of thousands of translated short open reading frames (sORFs) in the 5' leaders of mammalian mRNA transcripts. While most sORFs are unlikely to encode functional proteins, a small number have been shown to have evolved as protein-coding genes. As a result, dozens of these sORFs have already been annotated as protein-coding ORFs. mRNAs that contain both a protein-coding sORF and an annotated coding sequence (CDS) are referred to as bicistronic transcripts. In this study, we focus on three genes – *ASNSD1*, *SLC35A4*, and *MIEF1* – which give rise to bicistronic mRNAs. We discuss recent findings regarding functional investigation of the corresponding polypeptide products, as well as how their translation is regulated, and how this unusual genetic arrangement may have evolved.

**Keywords:** translation initiation, reinitiation, leaky scanning, dual coding, bicistronic mRNA

## ЭНЕРГОЗАВИСИМОЕ НЕФОТОХИМИЧЕСКОЕ ТУШЕНИЕ: PsbS, LhcSR И ДРУГИЕ ИГРОКИ

### Обзор

© 2025 В.В. Птушенко<sup>1,2\*</sup>, А.П. Разживин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
119992 Москва, Россия; электронная почта: ptush@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.10.2024

После доработки 15.11.2024

Принята к публикации 15.11.2024

Для растений, обладающих высокочувствительным к свету фотосинтетическим аппаратом, приспособленным к улавливанию энергии света даже при слабых световых потоках, чрезвычайно опасны быстрые и значительные возрастания этого потока. Для решения проблем, вызываемых избыточной энергией падающего света, растения выработали целый ряд защитных механизмов, среди которых чрезвычайно важную роль играет нефотохимическое тушение возбуждённых состояний хлорофилла. Под нефотохимическим тушением, как правило, понимают совокупность различных механизмов, приводящих к сокращению времени жизни возбуждённых состояний хлорофилла в фотосинтетической антенне и тем самым к снижению эффективного воздействия света на весь фотосинтетический аппарат. Наиболее быстродействующий механизм нефотохимического тушения – так называемое энергозависимое тушение, которое активируется образованием трансмембранных протонного потенциала на тилакоидной мембране. Основные молекулярные игроки в этом механизме – кислородсодержащие каротиноиды ксантофиллы и белки тилакоидной мембранны: компонент антенны, LhcSR, у водорослей и мхов и компонент фотосистемы 2, PsbS, у высших растений и эволюционно наиболее близких к ним групп водорослей. Данный обзор посвящён молекулярным механизмам энергозависимого нефотохимического тушения, причём основной акцент сделан на PsbS-зависимом тушении. Установление того факта, что PsbS не связывает пигменты, породило представление о косвенной PsbS-зависимой активации тушения, т.е. о генерации центров тушения в других компонентах фотосинтетической антенны. В качестве механизмов такой активации в настоящее время рассматриваются: влияние PsbS на константы кислотной диссоциации аминокислотных остатков взаимодействующих с ним белков главной и малых антенн фотосистемы 2; влияние на конформацию каротиноидов в антенных белках; наконец, обсуждается роль PsbS как «мембранный смазки», увеличивающей подвижность главных антенн, LHCII, и обеспечивающей им возможность миграции в тилакоидной мембране и агрегации с последующим переходом в затущенное состояние.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** энергозависимое тушение, прямое и косвенное тушение, PsbS, LhcSR, LHCII.

**DOI:** 10.31857/S0320972525010048 **EDN:** CPYRWS

### ВВЕДЕНИЕ

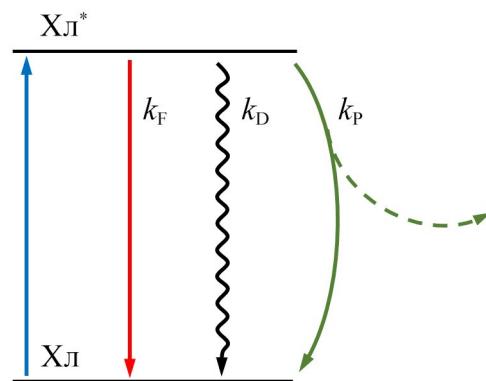
Нефотохимическое тушение (НФТ) возбуждённых состояний хлорофилла (Хл), рассматриваемое в этом обзоре, – это непременный и на первый взгляд неожиданный спутник оксигенного фотосинтеза. С точки зрения первичных процессов

фотосинтеза НФТ является конкурентом фотосинтеза за энергию света. Однако наличие такого конкурента необходимо для безопасной организации всей молекулярной системы фотосинтетического аппарата (ФСА), что связано с тремя обстоятельствами: (а) высокая фотохимическая активность Хл в кислородной атмосфере; (б) существенные и быстрые перепады интенсивности света на поверхности земли даже на открытом

\* Адресат для корреспонденции.

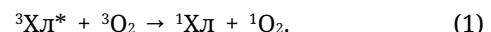
пространстве, а в ещё большей степени – под пологом растительного сообщества; (в) необходимость осуществлять фотосинтез даже при низкой интенсивности света, доходящего в этих условиях до растения. А именно, зная коэффициент молярной экстинкции ( $\varepsilon$ ) Хл (порядка  $10^5$  літр·моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$  [1] в зависимости от растворителя, типа Хл и выбора синего или красного пика), нетрудно показать, что при умеренной интенсивности света (100 мкмоль фотонов·м $^{-2}$ ·с $^{-1}$ ) средняя частота поглощения квантов света одной молекулой Хл будет составлять порядка 1 с $^{-1}$ , что на 2 порядка ниже скорости переноса электрона по электрон-транспортной цепи. Учитывая, что такая интенсивность примерно соответствует естественной освещённости на открытом пространстве в пасмурный день, а под пологом леса или в толще воды на глубине всего нескольких метров может быть ещё в 10–100 раз ниже [2, 3], можно оценить, что как минимум 99,0–99,9% времени ФСА будет простоять в ожидании очередного кванта света, если поглощение света и фотохимическую реакцию обеспечивает одна и та же молекула Хл. Таким образом, фотосинтез в этих условиях лимитируется доступностью света, и естественный способ повышения его интенсивности – увеличение светосбора за счёт создания большой (содержащей как минимум  $10^2$  молекул Хл и/или других эффективных пигментов) светособирающей антенны вокруг каждого реакционного центра (РЦ). И действительно, практически все фотосинтезирующие организмы (если не считать архебактерий, использующие бактериородопсин в качестве светозависимого генератора мембранныго потенциала) имеют фотосинтетические антенны – пигмент-белковые комплексы приблизительно с таким количеством пигментных молекул.

Однако оборотной стороной наличия фотосинтетической антенны и высокой эффективности светосбора оказывается уязвимость ФСА перед воздействием интенсивного света. Как уже было сказано, для интенсивности света в природных условиях характерны существенные и быстрые флуктуации – более чем на порядок величины на открытых пространствах в силу изменения одной лишь облачности; под пологом леса смена условий затенения и солнечных бликов может давать  $10^2$ – $10^3$ -кратные флуктуации освещённости с характерными временами порядка минут [2, 4]. Если



**Рис. 1.** Схема, иллюстрирующая пути дезактивации возбуждённого состояния Хл антенны. Показаны пути дезактивации и их эффективные константы для всего пула молекул Хл антенны: через фотохимическую реакцию ( $k_p$ , дугообразная зелёная стрелка), безызлучательную тепловую диссипацию ( $k_D$ , чёрная волнистая стрелка) и флуоресценцию ( $k_F$ , вертикальная красная стрелка). Синей вертикальной стрелкой, направленной вверх, показан переход Хл в возбуждённое состояние при поглощении кванта света

при некоторой интенсивности света его поглощение антенной и последующие реакции переноса электрона по цепи были сбалансированы, то при её многократном возрастании антenna насытит поток электронов, скорость которого теперь уже станет лимитирующей, и возрастёт время жизни возбуждённых состояний Хл антенны ( $\text{Хл}^*$ ), которые окажутся более невостребованными для обеспечения энергией фотохимической реакции разделения зарядов в РЦ (рис. 1). В результате возрастёт и вероятность синглет-триплетного перехода  ${}^3\text{Хл}^* \rightarrow {}^1\text{Хл}$  [5], а вместе с ним и вероятность образования синглетного кислорода в реакции (1) с триплетным Хл антенны [6–12]:



В подобных условиях избыточной энергии света необходим механизм, который позволит снизить время жизни  $\text{Хл}^*$  и тем самым генерацию синглетного кислорода. Иными словами – необходим иной «потребитель» запасённой в антенне энергии. Такой потребитель всегда доступен и готов поглотить любое количество энергии – это тепловой резервуар. И необходимо только открыть канал для тепловой диссипации энергии

Принятые сокращения: Вио – виолаксантин; Зеа – зеаксантин; Кар – каротиноиды; Кс – ксантофиллы; НФТ – нефотохимическое тушение; ПБК – пигмент-белковый комплекс; РЦ – реакционный центр; ФС1 и ФС2 – фотосистемы 1 и 2; ФСА – фотосинтетический аппарат; Хл – хлорофилл;  $\text{Хл}^*$  – возбуждённое состояние Хл антенны; DGDG – дигалактозил-диацилглицерол; LHCII (LHCII) – главный светособирающий комплекс фотосистемы 1 (2); LhcSR – фотопротекторный белок водорослей; ОСР – оранжевый каротиноидный белок; PsbS – фотопротекторная субъединица S фотосистемы 2; qE – энергозависимый компонент нефотохимического тушения.

возбуждённых состояний молекул Хл. Механизм, открывающий такой канал, получил название «нефотохимическое тушение». Слово «тушение» здесь происходит из оптического способа его наблюдения: с сокращением времени жизни Хл\* снижается (тушится) и интенсивность его флуоресценции. Эпитет «нефотохимическое» означает несвязанность этого канала с фотохимической реакцией, запускающей цепь реакций переноса электронов. Этот канал дезактивации Хл\*, как было отмечено в начале статьи, конкурирует с энергозапасающими фотосинтетическими процессами, однако он необходим для защиты ФСА от синглетного кислорода в условиях избытка света. Ключевым требованием к нему в таком случае оказывается его регулируемость – возможность (частичного) открытия/закрытия при изменении условий освещения и/или других условий, которые приводят к нарушению баланса между поглощённой и использованной в реакциях фотосинтеза энергией света. В самом тушении и его регуляции участвуют каротиноидные пигменты ксантофиллы (Кс) и белки, среди которых, по крайней мере у высших растений, центральную роль играет субъединица S фотосистемы 2 (ФС2), обозначаемая PsbS, а у большинства групп водорослей – очень близкий к антенным комплексам белок LhcSR (у мохообразных в НФТ участвуют оба белка).

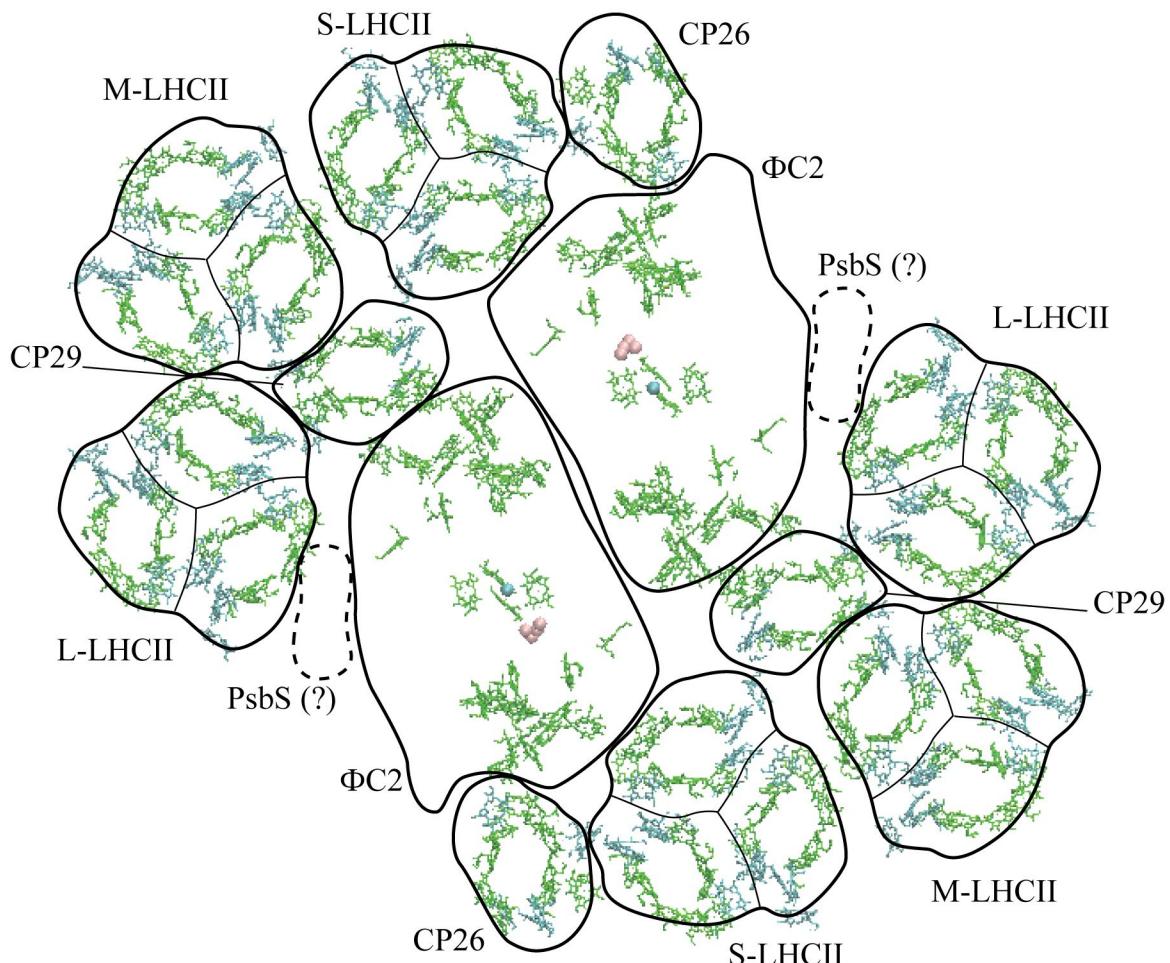
В то время как роль LhcSR в НФТ как центра тушения в достаточной мере ясна, несмотря на почти четверть века изучения PsbS-зависимого НФТ, механизм этого процесса остаётся не вполне ясным. Появляющиеся новые данные об индукции НФТ в некоторых мутантах или модельных системах претендуют на опровержение сложившихся представлений о центрах тушения в ФСА. В последние годы появился большой объём новой информации как о макромолекулярных структурах суперкомплексов реакционных центров и светособирающих антенах, так и о взаимодействиях отдельных аминокислотных остатков, лежащих в основе процессов индукции НФТ. Данный обзор посвящён в первую очередь роли PsbS в НФТ. Тем не менее для цельности изложения мы также приводим здесь данные и о функциях ксантофиллов в этом процессе.

Изложение существующих на сегодня представлений о механизмах НФТ мы предварим описанием тех пигмент-белковых комплексов (ПБК) тилакоидной мембранны, в которых реализуется тушение – антенных комплексов ФС2 и фотосистемы 1 (ФС1). Поскольку их строение различается у разных фотосинтетических организмов, мы сделаем акцент в первую очередь на организации ПБК в «зелёной ветви» эукариотических фотосинтетиков (Viridiplantae).

## ХЛОРОФИЛЛ-СОДЕРЖАЩИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

В тилакоидной мембране хлоропласта Хл и каротиноиды (Кар) локализованы как в самих фотосинтетических реакционных центрах ФС1 и ФС2, так и в антенных комплексах. В ФС2 молекулы Хл содержатся в белках D1 и D2 (продукты генов *psbA* и *psbD*), образующих реакционный центр (по 6 молекул Хл *a*), и в белках CP47 и CP43 (продукты генов *psbB* и *psbC*; содержат 16 и 13 Хл *a*, а также 5 и 3–4 молекулы Кар соответственно [13, 14]), образующих внутреннюю антенну ФС2. Внешние антенные комплексы, ассоциированные преимущественно с ФС2, образованы продуктами большого семейства генов *lhcB*. Главный антенный комплекс LHCII представляет собой гомо- или гетеротример, состоящий из трёх очень похожих друг на друга белков *LhcB1*, -2 и -3 (гомотример *LhcB1* или гетеротример *LhcB1* с *LhcB2* и *LhcB3*), каждый из которых содержит 8 Хл *a*, 6 Хл *b* и 4 Кс: 2 лютеина, неоксантин и виолаксантин (Вио), который может заменяться на зеаксантин (Зеа) [15]. (У зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* несколько больший набор гомологичных белков: *LhcB1*–*LhcB9* [16].) Непосредственно на периферии реакционных центров ФС2, между ними и комплексами главных антенн, располагаются малые мономерные антенны CP29, CP26 и CP24 (CP24 отсутствует у зелёных водорослей) – продукты генов *lhcB4*, *lhcB5* и *lhcB6*, содержащие по 14 (11 Хл *a* + 3 Хл *b*), 13 (10 + 3) и 11 (7 + 4) молекул Хл и по 3 Кар соответственно [15]. В наземных растениях перечисленные ПБК существуют в виде суперкомплексов: двух комплексов ФС2 (обозначаемых С), двух прочно связанных (S) и двух умеренно связанных (M) главных антенных комплексов; такие суперкомплексы обозначают *C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>*. При высокой освещённости часть антенн может диссоциировать, оставляя «редуцированные» суперкомpleксы *C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>* и *C<sub>2</sub>S* [17]. В хлоропластах шпината [18], а также водорослей *C. reinhardtii* [19] и *Chlorella sorokiniana* [20] были обнаружены более крупные комплексы *C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>*, включающие дополнительно два слабо связанных антенных комплекса (L). Таким образом, на один суперкомплекс ФС2 приходится до 200 молекул Хл (рис. 2).

Где-то на границе ФС2 располагается субъединица S (PsbS), ответственная за индукцию НФТ, имеющаяся у всех групп «зелёной ветви» фотосинтезирующих организмов (Viridiplantae). Её точная локализация представляет пока неразрешённую проблему: её не удается увидеть с помощью криоэлектронной микроскопии, что говорит о том, что она либо очень слабо связана с ФС2,

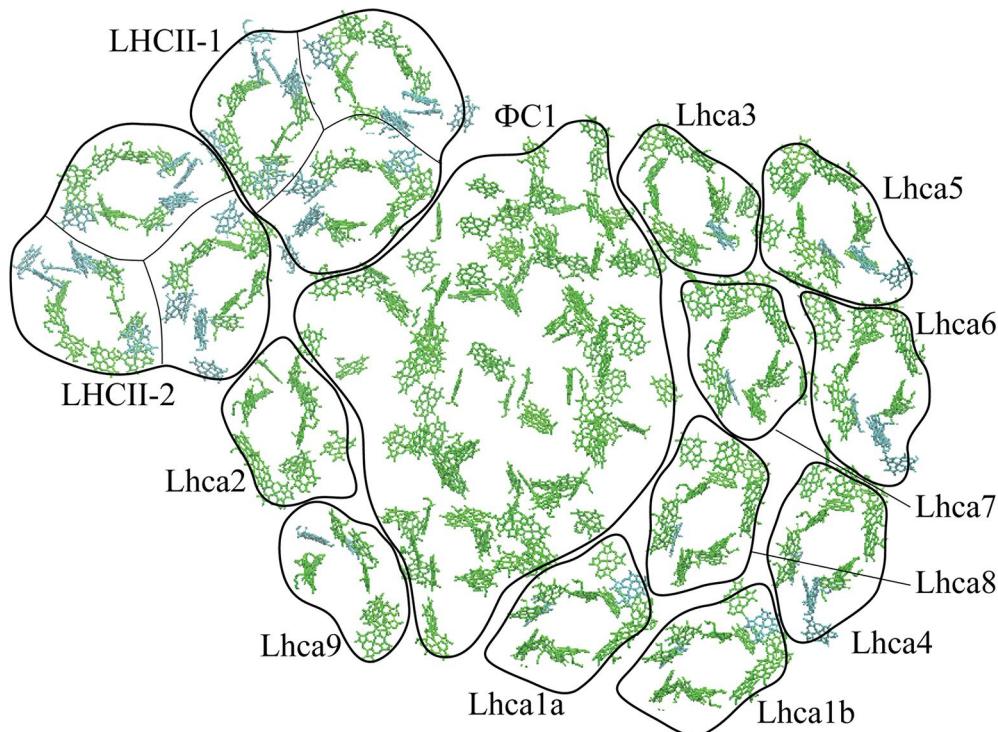


**Рис. 2.** Схематичное изображение суперкомплекса ФС2,  $C_2S_2M_2L_2$ , включающего димер комплексов ФС2 (обозначаемых С) и по паре прочно (S), умеренно (M) и слабо связанных (L) главных антенных комплексов LHCII. Суперкомплекс стабилизируется малыми антеннами CP29, CP26, CP24 (последняя имеется у высших растений, но отсутствует у зелёных водорослей); вид в плоскости мембранны (со стороны стромы). Приблизительные контуры белковых субъединиц показаны сплошной линией, расположение молекул Хл (без фитольных «хвостов») – зелёным (Хл а) или бирюзовым цветом (Хл б). Бирюзовой и розовыми точками показано расположение атомов железа и марганца в ФС2 соответственно. Пересекающиеся в проекции на плоскость мембранны фрагменты белков (в частности, длинное плечо белка CP29, контактирующее с ФС2 со стороны стромы) не показаны. За основу схемы взяты данные криоэлектронной микроскопии о структуре суперкомплекса из *C. reinhardtii* (код pdb: 6KAD [16]). Предполагаемое место расположения субъединицы PsbS соответствует гипотезе Su et al. [17] для высших растений

либо может связываться с ней в различных позициях [21]. Эта ситуация сохраняется вплоть до самого последнего времени [22]. У всех групп водорослей и у мхов в тилакоидной мемbrane присутствует также другой белок, вызывающий НФТ, LhcSR (Light-Harvesting Complex Stress-Related protein). Показано, что у мха *Physcomitrella patens* LhcSR связан с комплексами LHCII и локализуется преимущественно в тилакоидах стромы и немногого – на краях гран [23].

Вторым основным местом локализации Хл в ФСА являются РЦ и антенны ФС1. Как и в случае ФС2, они образуют суперкомплексы, причём весьма различные у разных групп фотосинтетических организмов. Для цианобактерий характерны три-

меры и в некоторых случаях тетрамеры ФС1, для которых роль светособирающих антенн выполняют водорастворимые фикобилины, но в некоторых условиях (при дефиците железа) это могут быть и хлорофилл-содержащие белки IsiA, обладающие некоторым сходством с белком внутренней антенны ФС2, CP43, и образующие кольцо вокруг тримера ФС1 [24]. Для эукариотических фотосинтетиков характерны хлорофилл-содержащие мембранные антенны Lhcr в линии красных водорослей или гомологичные им Lhca – в линии зелёных водорослей и высших растений. Количество таких антенн на один РЦ ФС1 у высших растений – 4, а у зелёных водорослей – 10 (возможно, что это количество может меняться при акклиматации



**Рис. 3.** Схематичное изображение суперкомплекса ФС1 (в литературе обозначаемого как PSI-LHCl-LHCII), включающего комплекс ФС1, несколько антенных комплексов LHCII (продукты генов *lhca1-lhca9*) и два главных антенных комплекса ФС2, LHCII; вид в плоскости мембраны. В зависимости от вида и условий освещения суперкомплексы ФС1 могут содержать меньшее число антенн. За основу схемы взяты данные криоэлектронной микроскопии о структуре суперкомплекса из *C. reinhardtii* (код pdb: 7D0J [28])

к изменению интенсивности света), причём антенны в пределах каждого суперкомплекса представляют собой различные, хотя и близкие белки (*Lhcr1*, *Lhcr2* и *Lhcr3* – у красных водорослей, *Lhca1–Lhca9* – у зелёных, *Lhca1–Lhca6* – у наземных растений). Кроме того, главный антенный комплекс ФС2, LHCII, также может пристыковываться к антенным комплексам ФС1 (рис. 3). По-видимому, именно эти антенны, окружающие РЦ ФС1, препятствуют их три- или тетрамеризации, в связи с чем у эукариотов суперкомплексы ФС1 с антенной содержат только один комплекс ФС1 [24]. Содержание Хл и Кар в одном антенном белке *Lhca* составляет, в зависимости от вида и белка, от 12 до 19 молекул Хл (9–19 Хл а и 1–5 Хл б) и от 2 до 5 молекул Кар (лютеин, бета-каротин, а также Вио или Зеа) [25–27]. В целом же можно оценить, что с учётом 96 молекул Хл а в РЦ ФС1 такие суперкомплексы содержат до 250 молекул Хл у зелёных водорослей и 150 Хл – у наземных растений (или приблизительно до 330 и 190 соответственно – при наличии в суперкомплексе LHCII).

Комpleксы ФС1 располагаются в стромальных участках тилакоидов. Как упоминалось выше, у организмов, обладающих белком НФТ *LhcSR* (по крайней мере у *P. patens*), он также присутствует в тилакоидах стромы и, следовательно, может тушить возбуждённые состояния Хл в суперком-

плексах ФС1 за счёт взаимодействия с антеннами LHCII, связанными с ФС1 [29]. Однако заметное снижение роли LHCII в светосборе для ФС1, произошедшее при переходе от водорослей к высшим растениям, вероятно, сделало *LhcSR*-зависимое НФТ ненужным и привело к исчезновению этого белка у сосудистых растений [30]. Кроме того, экспериментальные данные и результаты модельных расчётов показывают, что при наиболее обычных условиях (при умеренно высоких интенсивностях света, характерных для естественного освещения) интенсивность флуоресценции ФС1 относительно невелика – от ~5 до 14% (см. подробное обсуждение в статье Schreiber и Klughammer [31]; флуоресценция ФС1 может достигать 25–30%, по крайней мере у цианобактерий и эукариотических водорослей, однако это происходит лишь при интенсивностях порядка 5000–8000 мкмоль фотонов  $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  [32], т.е. примерно в 2,5–4 раза выше, чем максимально возможная интенсивность света на поверхности Земли в субтропической зоне [33]). Это указывает на относительно низкую стационарную концентрацию возбуждённых состояний Хл в ФС1 в естественных условиях освещения, не требующую привлечения дополнительных эффективных механизмов тушения. Поэтому рассматриваемые ниже механизмы тушения в основном относятся к Хл антенн, связанных с ФС2.

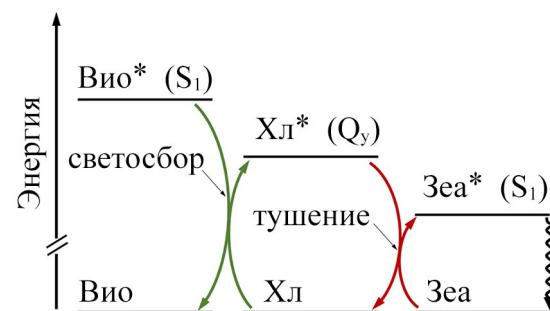
## ОСНОВНЫЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ НЕФОТОХИМИЧЕСКОГО ТУШЕНИЯ

Формально открытие канала тепловой дезактивации Хл\* описывается возрастанием константы тепловой диссипации  $k_{\text{D}}$  (рис. 1) и связано с переносом возбуждения на пигмент (или группу пигментов) с короткоживущим возбуждённым состоянием. Оказавшись на этом пигменте-ловушке, энергия возбуждения быстро перераспределяется по тепловым (колебательным) степеням свободы молекулы и её окружения, не представляющим опасности с точки зрения химической активности. Такие пигменты или группы пигментов называют центрами тушения; фактически они действительно играют роль стоков для возбуждения, мигрирующего по антенне. Неоднократно было показано, что в безызлучательной тепловой диссипации избыточной энергии, поглощённой фотосинтетической антенной, активно участвуют каротиноиды [34, 35], что связано с коротким временем жизни их возбуждённого состояния (порядка 10 пс [36], что много меньше, чем у Хл – порядка 1 нс в зависимости от состояния ФСА [37]). Однако роль конкретного каротиноида в индукции НФТ может быть различной: он может сам становиться центром тушения (в этом случае говорят о прямом тушении (direct quenching)) либо способствовать формированию других центров тушения, т.е. косвенно активировать НФТ (indirect activation of quenching).

Не останавливаясь здесь подробно на механизмах прямого тушения, отметим только, что одной из ключевых гипотез здесь была модель молекулярного переключения передач (molecular gear shift model), рассматривающая каротиноид Зеа как основной тушитель [38]. Оценки энергий «тёмного» (спектрально запрещённого, но активно участвующего в переносе энергии) возбуждённого состояния S1 Зеа и Вио, сделанные Frank et al. [38], говорили о том, что для Зеа (с энергией S1 более низкой, чем энергия первого электронно-возбуждённого состояния Хл) предпочтителен перенос энергии с Хл на Зеа с последующим тушением; в то же время для Вио (с более высокой энергией S1) предпочтителен перенос в направлении Вио → Хл, что делало его более эффективным светосборщиком (рис. 4). Эта фотофизическая модель прекрасно увязывалась с представлениями о фотозащитной роли Кар виолаксантинового цикла, которая незадолго до того была показана Demmig-Adams [39] после трёх десятилетий неясности этой функции со времён открытия виолаксантинового цикла Сапожниковым и др. [40]. Позже эта модель подвергалась критике: появлялись данные о том, что энергии S1 Зеа и Вио *in situ* (в LHCII) значительно меньше различаются, чем *in vitro*

(в растворителях) [41]; что перенос энергии, скорее всего, происходит не на Зеа, а на лютеин, по крайней мере в LHCII [42]; наконец, что величина (и даже знак) разности энергий Кар и Хл практически не влияют на возникновение Кар-зависимого тушения [43]. В качестве альтернативы модели молекулярного переключения передач с переносом энергии возбуждения на Зеа в литературе также фигурировала модель НФТ по механизму с переносом заряда (charge transfer, CT) [44]. Фактически это тоже Зеа-зависимое тушение, но за счёт переноса не энергии нейтрального возбуждения, а электрона от Зеа на Хл, в результате которого образуется быстро рекомбинирующая пара Хл<sup>-</sup>–Зеа<sup>+</sup>. В этом механизме также предполагается особенная роль Зеа в НФТ за счёт его низкого потенциала ионизации (наиболее низкого из всех каротиноидов виолаксантинового цикла). В настоящее время, по-видимому, СТ-механизм перестал рассматриваться как существенный механизм НФТ в LHCII [45], однако его участие в тушении в малых антенных ФС2, СР24, СР26, СР29 [46], и в LhcSR [47] не вызывает сомнений.

Представление о возможности косвенной Зеа-зависимой активации НФТ в антенные возникло вскоре после первой модели прямого тушения в силу иных (не согласующихся с моделью молекулярного переключения передач) результатов расчёта энергий состояния S1 Вио и Зеа [41, 48]. Предполагалось, что Зеа может облегчать конформационный переход LHCII в потушенную форму [41] либо повышать чувствительность LHCII к закислению люмена, стимулирующему НФТ [49].



**Рис. 4.** Схема взаимодействия пигментов виолаксантинового цикла с Хл антенны в соответствии с моделью молекулярного переключения передач Frank et al. [38]. Дугобразные стрелки показывают перенос нейтрального возбуждения между молекулами пигментов, при котором возбуждённая молекула-донор переходит в основное состояние, а невозбуждённая молекула-акцептор – в возбуждённое. В соответствии с моделью перенос энергии между рассматриваемыми пигментами (Хл, Вио и Зеа) происходит преимущественно в направлении Вио → Хл → Зеа. Волнистой стрелкой показан безызлучательный и не сопровождающийся переносом энергии переход Зеа\* в основное состояние (тепловая диссипация энергии возбуждения)

Выше мы упоминали, что в регуляции НФТ, наряду с Кс, центральную роль играет белок PsbS. С момента обнаружения этой роли [50] представления о механизме его участия в НФТ эволюционировали от прямого тушения до косвенного. В силу значения этого белка для НФТ мы посвятим ему (а также его древнему аналогу LhcSR) отдельный раздел.

### ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ БЕЛКОВ PsbS И LhcSR В НЕФОТОХИМИЧЕСКОМ ТУШЕНИИ

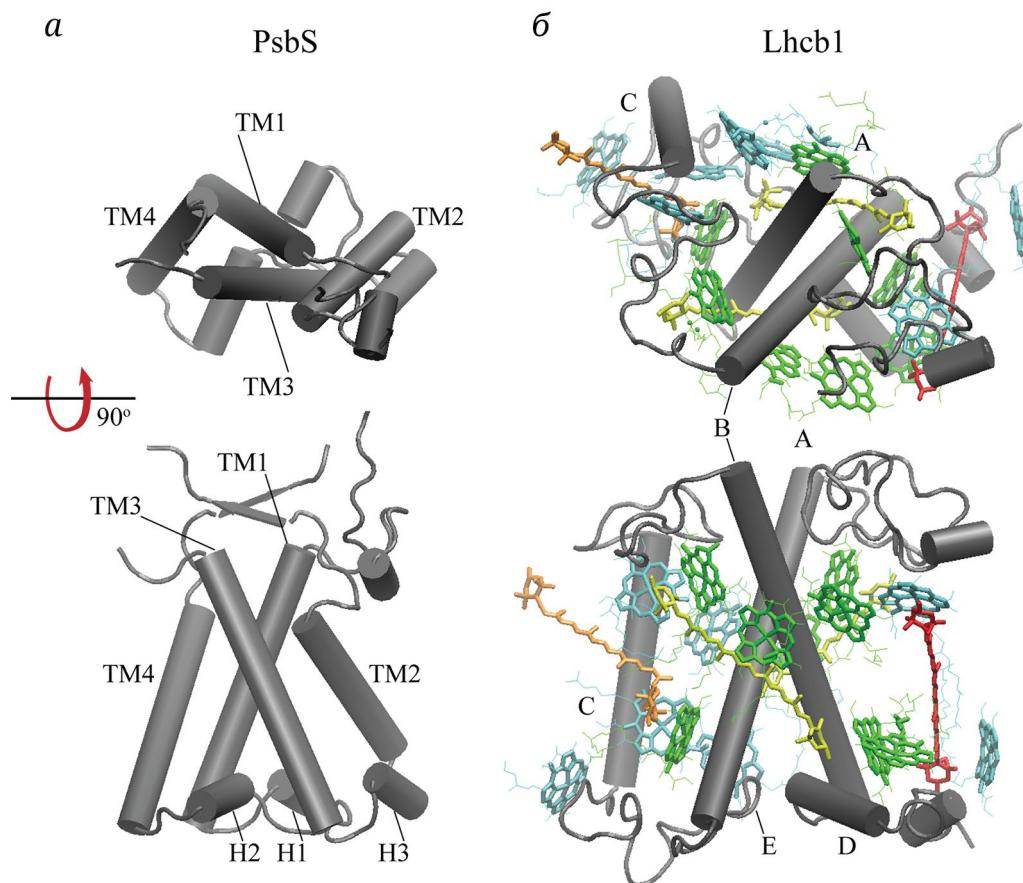
Белок PsbS был впервые выделен из тилакоидов шпината в 1986 г. как субъединица ФС2 [51], выполняющая неизвестную функцию, и первоначально упоминался в литературе как 22-kDa polypeptide или PSII-S. Вскоре была установлена его аминокислотная последовательность, показавшая его сходство с антенными белками, но, в отличие от них, вероятное наличие в его составе четырёх трансмембранных спиралей [52, 53]. В 1995 г. появились сведения – как стало впоследствии ясно, ошибочные – что этот белок связывает 5 молекул Хл *a* и *b* и несколько типов каротиноидов; в связи с этим было высказано предположение, что его функция связана с дополнительным и/или альтернативным светосбором [54]. Эта ошибка в дальнейшем имела большое влияние на представления о механизме его работы. Спустя 5 лет в ходе исследований мутантов *Arabidopsis thaliana*, полученных путём ненаправленного мутагенеза (облучение быстрыми нейтронами), удалось установить, что этот белок является ключевым для НФТ [50]. Позже было показано, что, в дополнение к подавлению НФТ и повышенной чувствительности ФСА к фотоиндуцированным повреждениям при отсутствии PsbS, при его сверхэкспрессии НФТ и защита от повреждений ФСА избыточным светом выражены сильнее, чем в диком типе [55, 56]. Как было известно уже к концу 2000-х гг., многие организмы, принадлежащие к зелёной линии (*Viridiplantae*), имеют в своём геноме предполагаемые ортологи PsbS высших растений. Несмотря на это, первоначально белок PsbS не был обнаружен ни в классической модельной зелёной водоросли *C. reinhardtii*, ни в одном из других исследованных видов микроскопических зелёных водорослей (современные представления о распространении этого белка среди фотосинтезирующих организмов см. в разделе «Распространение механизмов нефотохимического тушения в различных систематических (эволюционных) группах» настоящего обзора). Как ни странно, при этом он был обнаружен в многоклеточной зелёной водоросли *Ulva laetevirens*, а в харовой водоросли *Chara corallina*

его присутствие было чрезвычайно незначительным [57]. Тот факт, что тем не менее некоторые одноклеточные виды демонстрировали высокую активность НФТ, заставил предположить, что в них работает некий независимый от PsbS механизм. И действительно, вскоре у *C. reinhardtii* был обнаружен белок LhcSR (Light-Harvesting Complex Stress-Related protein, ранее описанный как LI818 [58]), ответственный за НФТ и распространённый (если говорить об ортологах его гена) у всех эукариотических водорослей, кроме красных водорослей (*Rhodophyta*), а также у мхов [59].

Оба белка, LhcSR и PsbS, относятся к большому суперсемейству LHC – антенных белков, связывающих Хл и Кс [30]. Белок LhcSR имеет пространственную структуру, схожую со структурой малой антенны ФС2 (CP29) или мономеров комплекса LHCII (т.е. структуру, включающую три трансмембранных альфа-спиральных столба; рис. 5), и, подобно им, также связывает молекулы Хл и Кс: 8 молекул Хл (8 Хл *a* в изоформе LhcSR1, 7 Хл *a* и 1 Хл *b* в LhcSR3) и 3 или 4 молекулы Кс, включая лютеин и Вио [47, 60]. Существуют различные представления о том, каким образом LhcSR (и близкие к нему белки LHCX) вызывает тушение электронного возбуждения Хл в антенне: за счёт переноса возбуждения с Хл на Кс с последующей быстрой конверсией Кс\* в Кс; за счёт переноса электрона с Кс на Хл или за счёт образования экситонного сопряжения между молекулами Хл и Кс (выше мы обсуждали различные предполагаемые механизмы прямого Кар-зависимого тушения), однако в любом из этих случаев предполагается, что именно LhcSR является центром тушения [47, 61].

Какое-то время аналогичный механизм прямого тушения предполагался и для PsbS [50, 64]. Однако появившиеся в 2000-х гг. данные о биохимических свойствах PsbS [65], а также данные по мутагенезу PsbS [57], а затем и данные о трёхмерной структуре этого белка [62] показали, что, вопреки первым сообщениям [50, 54], он не содержит молекул пигментов. В отличие от LhcSR и антенных белков, PsbS имеет дополнительную (четвёртую) трансмембранный спираль (рис. 5) и более компактную структуру, которая не оставляет достаточного пространства для связывания Хл и Кс [62]. Интересно отметить, что при достаточно высокой вариабельности аминокислотной последовательности PsbS (так, белки шпината и зелёной водоросли *Lobosphaera incisa* имеют лишь около трети общих остатков [66]), трёхмерная структура PsbS весьма консервативна.

В связи с этим высказывались различные гипотезы о возможном косвенном механизме участия PsbS в тушении возбуждения в антенне,



**Рис. 5.** Структура субъединицы S ФС2, PsbS (*a*), по данным рентгеноструктурного анализа (код pdb: 4R12 [62]), и мономера комплекса главной антенны LHCII, Lhcbl (*b*), по данным криоэлектронной микроскопии (код pdb: 8IX0 [63]); последовательность белков, составляющих LHCII, близка к последовательности LhcSR, для которого на сегодняшний день пока не получена экспериментальная трёхмерная структура. Спиральные участки (*a* и  $3_{10}$ ) показаны цилиндрами и подписаны для обоих белков (TM1–TM4 – трансмембранные спирали, H1–H3 – амфи菲尔ные спирали PsbS; у Lhcbl их общепринятые обозначения А–С и Е–Д соответственно). Молекулы Хл, связанные с Lhcbl, выделены зелёным (Хл *a*) или бирюзовым цветом (Хл *b*; фитольные «хвосты» показаны тонкой линией), каротиноиды – жёлтым (лютеин), оранжевым (неоксантина) и красным (виолаксантин)

реализующемся через его взаимодействие (непосредственное или с участием молекул Кс) с белками внешней и внутренней антенн и переключение самих этих антенн в «тушащее» состояние.

Отметим, однако, что независимо от молекулярных механизмов, которыми обеспечивается LhcSR- и PsbS-зависимое тушение, полагают, что каждый из этих белков служит детектором pH в тилакоидном люмене и, следовательно, обеспечивает энергозависимый компонент НФТ (qE; в настоящем обзоре мы используем это общепринятое обозначение не для физической величины – меры затущенной флуоресценции с помощью механизма энергозависимого тушения, а для самого этого механизма) [30]. Закисление люмена приводит к протонированию экспонированных в люмене аминокислотных остатков и образованию центра тушения в самом белке или в контактирующих с ним антенных комплексах.

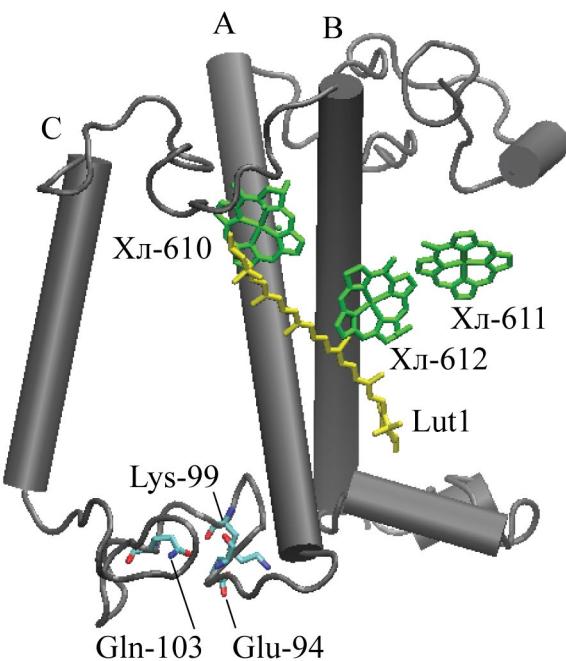
## ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ЦЕНТР PsbS-ЗАВИСИМОГО НЕФОТОХИМИЧЕСКОГО ТУШЕНИЯ

Отсутствие пигментов в составе PsbS означает, что он не может служить центром тушения, а может лишь стимулировать формирование центров тушения в соседних ПБК. Имеются экспериментальные доказательства того, что по крайней мере у высших растений центр тушения формируется в пределах тримера главной антенны LHCII [67–69]. Хотя незатущенная (светособирающая) конформация LHCII является термодинамически несколько более выгодной при комнатной температуре, чем затущенная, свободная энергия перехода между ними очень невелика: всего лишь около  $2,5 kT$  ( $k$  – постоянная Больцмана;  $T$  – абсолютная температура), т.е. близка к характерной энергии теплового движения [70]. Видимо, поэтому переключение LHCII в затущенное состояние

(т.е. формирование в нём центра тушения) может происходить под действием разнообразных относительно «слабых» стимулов [71]. Среди этих стимулов: изменение жёсткости тилакоидной мембраны [72, 73]; истончение тилакоидной мембраны [74]; возникновение трансмембранный асимметрии – накопление дигалактозил-диацилглицерола (DGDG) на стороне люмена [74]; агрегация LHCII [75, 76]; присутствие Зеа [77] или PsbS [78–81]. Однако не вполне ясно, какие из этих причин первичны. В физиологических условиях главной причиной развития тушения в антенне является тилакоидная трансмембранный ДрН, как необходимое и достаточное условие для qE, тогда как Зеа и PsbS с аддитивными эффектами [80] могут регулировать чувствительность qE к ДрН. При этом в LHCII можно получить полноценное qE за счёт увеличения ДрН до нефизиологически высоких значений (более 3 единиц) даже при отсутствии Зеа или PsbS [68, 80] и при отсутствии малых антенн [68].

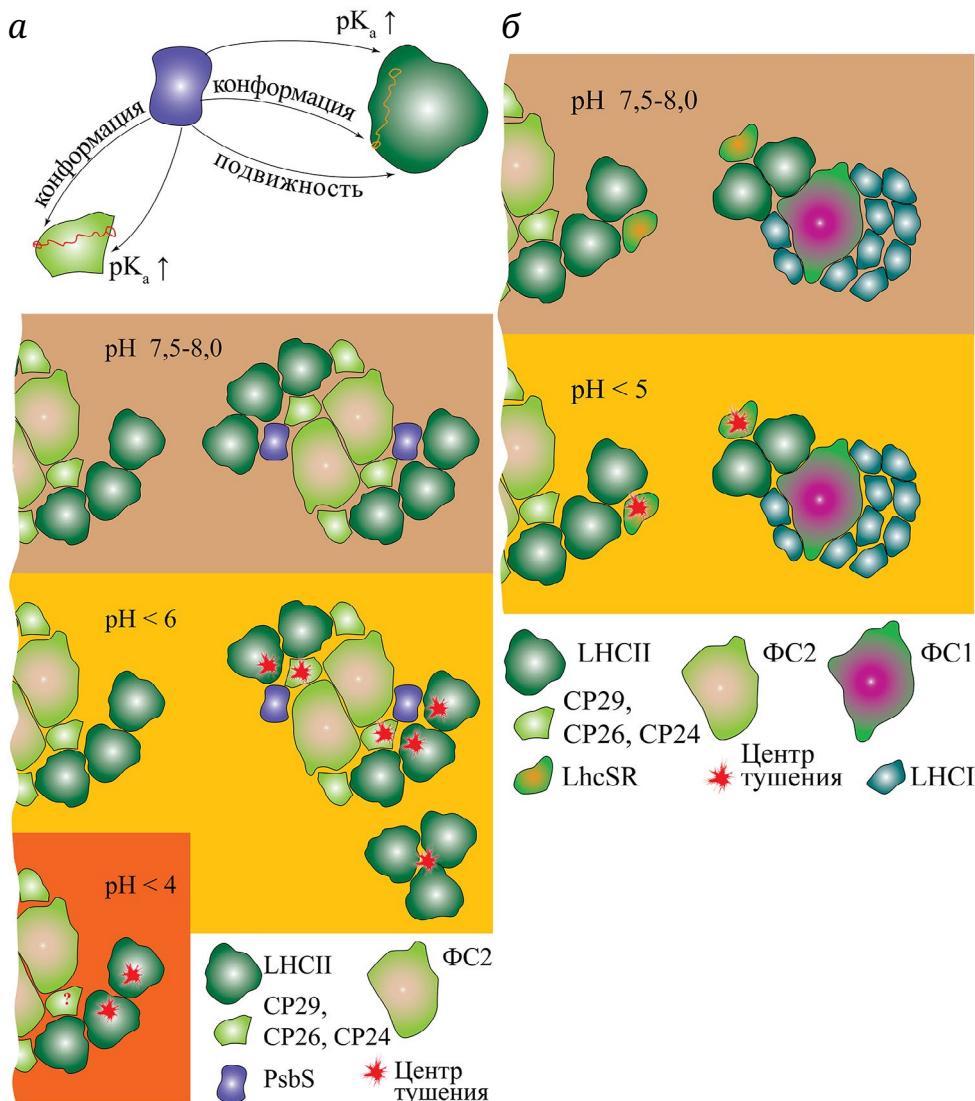
Считается, что непосредственный механизм индукции тушения связан со сближением связанных в LHCII пигментов, Хл a 612 и лютеина-620 (сайт его связывания в белке также обозначается Lut1; рис. 6), что усиливает их экситонное взаимодействие [82–84]. Действительно, по данным молекулярного моделирования, при закислении меняется экситонное сопряжение между Хл a 612 и лютеином-620 с 5–9 см<sup>-1</sup> (максимум распределения) до 12–15 см<sup>-1</sup> [71]. Их сближение, в свою очередь, может быть вызвано нейтрализацией (за счёт протонирования) амфи菲尔ной (amphiphilic) спиралей D, параллельной мемbrane, что позволяет ей расположиться ближе к гидрофобному ядру LHCII [85]. Другой предполагаемый вариант конформационных перестроек, ответственных за переход LHCII в затущенное состояние – изменение угла между трансмембранными спиралью A и B [83, 84]. Наконец, возможно также, что из-за закисления люмена и протонирования Glu-94 меняется его партнёр по водородной связи – с Lys-99 на Gln-103 (рис. 6) [84], что ведёт к уменьшению среднего расстояния в LHCII между спиралью E и D.

В этих конформационных изменениях играют роль белок-липидные взаимодействия и локальный липидный состав мембраны вблизи LHCII. Так, было показано, что при нейтральном pH тример LHCII окружён большим количеством мембранныго галактолипида моногалактозил-диацилглицерола (MGDG) [86], имеющего коническую форму и не характерного для плоских бислойных мембран. При низком значении pH люмена в тилакоидной мембране, в её люменальном листке вблизи LHCII, может накапливаться липид цилиндрической формы DGDG. Молекуляр-



**Рис. 6.** Структура Lhcbl, по данным криоэлектронной микроскопии (код pdb: 8IX0 [63]); показан только кластер хлорофиллов Хл a 610, -611, -612 и лютеин (в сайте связывания Lut1), предположительно, образующие центр тушения. Цветом показаны боковые цепи Glu-94, Lys-99 и Gln-103, предположительно, связанные с переходом LHCII в затущенное состояние. Остальные пояснения см. в подписи к рис. 5

ное моделирование показывает, что это связано с компактизацией LHCII на люменальной стороне и с тем, что DGDG имеет в этом случае лучшее стерическое соответствие и заполняет образовавшиеся полости [74]. Однако он снижает подвижность LHCII, тем самым препятствуя его комплексообразованию, необходимому для индукции НФТ [69]. Предполагается, что PsbS, связываясь с LHCII и вытесняя DGDG, восстанавливает подвижность LHCII в мембране. При этом и сам PsbS при закислении люмена изменяет свою конформацию для связывания с LHCII [87, 88]. Иными словами, PsbS может играть роль «мембранный смазки» [74, 89, 90]. Об этом говорят также экспериментальные данные: отсутствие PsbS (в мутанте *prq4*) способствует образованию упорядоченных (кристаллических) фаз, в которых белки иммобилизованы [81]. В этой функции PsbS возможно участие Зеа, который обеспечивает эффективное связывание между LHCII и PsbS в фотозащитном состоянии [87, 90, 91]. В то же время несвязанный Зеа может вызывать изменение жёсткости тилакоидной мембраны, что изменяет латеральное давление в мембране; в результате меняются белок-липидные взаимодействия и также индуцируются конформационные изменения в LHCII, переводящие его в диссипативное состояние [72, 73].



**Рис. 7.** Схематичное изображение основных представлений о механизме PsbS- (а) и LhcSR-зависимого тушения (б). Схематично показаны изображения суперкомплексов ФС2 и ФС1 (в проекции на плоскость мембранных), образуемые комплексами одного из реакционных центров (ФС2 или ФС1) и окружающими его антенными комплексами главных светособирающих антенн, LHCII и/или LHCI, и малых антенн (CP29, CP26, CP24). Изображения на разном цветовом фоне соответствуют разным характерным значениям pH. Подчёркивается, что в слабокислых условиях (pH < 6) PsbS активирует НФТ в антенных комплексах за счёт непосредственного взаимодействия с ними, либо стимулируя их отделение от суперкомплексов ФС2 и последующую агрегацию. В то же время значительное закисление среды (pH < 4) вызывает образование центров тушения в главных антенных комплексах LHCII даже при отсутствии PsbS. На панели (б) отражены представления о том, что LhcSR сам образует центр тушения (стока энергии) для возбуждения в главной антенне LHCII независимо от того, связана она с ФС2 или ФС1. Схема вверху панели (а) иллюстрирует предполагаемые механизмы косвенной PsbS-зависимой активации НФТ в LHCII и малых антенах. В изображении суперкомплексов реакционных центров и антенн не отражено различие между их строением у водорослей и наземных растений, конкретное расположение PsbS и LhcSR показано условно, обозначение центра тушения не указывает на его локализацию внутри отдельного антенного ПБК или их агрегатов

При отсутствии Zea активация qE требует снижения значения pH в люмене до 4,7–5,0 [49].

Кроме влияния на агрегацию LHCII, предполагается, что PsbS также может регулировать значения  $pK_a$  остатков LHCII, экспонированных в люмене, а также и других антенных белков (например, минорной антенны CP29, взаимодействуя с которой, PsbS может увеличить значение  $pK_a$

остатка Glu-128 с 4,46 до 5,24 [92]). Не исключено, что подобную функцию может выполнять и Zea, наиболее гидрофобный ксантофилл, располагаясь как внутри, так и на периферии LHCII; тем самым он может повышать pH-чувствительность LHCII, обеспечивая его протонирование и индукцию qE при умеренных ДрН [49]. Наконец, высказываются предположения, что PsbS вызывает тушение,

изменяя конформации каротиноидов в LHCII, поскольку было показано, что эти изменения могут быть ответственны за переключение между режимами светосбора и фотозащиты [93].

Однако каков бы ни был механизм PsbS-зависимой активации НФТ, он должен включаться при понижении pH в тилакоидном люмене. После того как было обнаружено, что PsbS может существовать в тилакоидной мемbrane как в форме мономера, так и димера (причём равновесие между мономерной и димерной формами обратимо изменяется светоиндуцированным образом, сдвигаясь в сторону мономерной формы при снижении pH), в качестве одной из основных рассматривается гипотеза, что pH-зависимая активация PsbS обусловлена его превращением из димера в мономер [94]. Предполагалось, что эта мономеризация сопровождается изменением расположения PsbS внутри суперкомплекса ФС2, а именно ассоциацией мономеров со светособирающими антеннами, в то время как димеры имеют тенденцию ассоциироваться с ядром ФС2. Недавно было высказано предположение, что переходы димер  $\leftrightarrow$  мономер, в свою очередь, связаны с изменениями в двух коротких амфи菲尔ных спиралях H2 и H3 на люменальной стороне белка. Так, данные ЯМР- и ИК-спектроскопии выявили перемещение спиралей H2 в белке PsbS мха *P. patens* из водной фазы в мембранный и переход H3 из сегмента петли в спираль, вызванный протонированием ключевых остатков глутамата [95]. В то же время в ходе рентгеноструктурного исследования PsbS было показано, что активная форма PsbS также является димером [62].

Схема, обобщающая основные представления о PsbS- и LhcSR-зависимом тушении, приведена на рис. 7.

### НЕФОТОХИМИЧЕСКОЕ ТУШЕНИЕ КАК РЕГУЛЯЦИЯ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ФЛУКТУАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Пока сложно сказать, все ли описанные механизмы НФТ и в какой мере реализуются *in vivo*, но многообразие и сложность молекулярных механизмов регуляции НФТ несомненны. На причины такого многообразия и происхождение НФТ, возможно, проливают свет исследования флюктуации флуоресценции (fluorescence intermittency или blinking). Это универсальное явление было открыто в середине 1990-х гг. для широкого класса флуоресцирующих систем: от органических пигментов до квантовых точек [96, 97].

Внедрение в спектральные исследования метода спектроскопии одиночных молекул позволило обнаружить явление, маскируемое усредне-

нием по ансамблю: стохастическое переключение молекулярной флуоресцирующей системы между «яркими» и «тусклыми» состояниями (bright and dim states), т.е. состояниями с различным квантовым выходом флуоресценции. Предполагается, что переходы между этими состояниями связаны с флуктуирующим микроокружением флуорофора. Это мерцание было обнаружено и в фотосинтетических белковых комплексах – в главных фотосинтетических антеннах ФС2 растений LHCII [98], в антеннах пурпурных бактерий LH-2 [99], в аллофикациицинах цианобактерий [100], в В-фокоэррине красных водорослей [101]. Исследования главного антенного комплекса высших растений LHCII показали, что, в отличие от простых систем, в подобных комплексах с плотной упаковкой большого числа пигментов (8 Хл а, 6 Хл б и 4 Кар) возникает целый ряд состояний с различными уровнями «светимости» [98]. Переходы между этими состояниями происходят спонтанно, и время жизни LHCII в каждом из них составляет от десятков миллисекунд до десятков секунд (хотя большая часть времён лежит в секундном и субсекундном диапазонах). При этом как частота переходов, так и время жизни в каждом из состояний зависят от условий среды: величины pH и интенсивности возбуждающего света [98]. Таким образом, как светособирающее, так и «затущенное» состояние антенны изначально присущи этому и многим другим ПБК и не требуют каких-либо специальных модификаций белка (за счёт связывания дополнительных пигментов или протонирования аминокислотных остатков); последние необходимы лишь для стабилизации одного из этих состояний. Иными словами, можно сказать, что растение не «конструирует» новый канал тушения возбуждения в антенне, а использует внутренне присущие ей состояния с разными уровнями тушения и лишь создаёт условия для сдвига динамического равновесия в сторону того из них, которое необходимо в данных физиологических условиях. Универсальность явления флюктуаций флуоресценции, далеко не ограничивающегося фотосинтетическими антеннами, но лежащего в основе регуляции процессов сбора света в фотосинтезе, создаёт основы для понимания эволюции этих адаптивных процессов.

### РАСПРОСТРАНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ НЕФОТОХИМИЧЕСКОГО ТУШЕНИЯ В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ (ЭВОЛЮЦИОННЫХ) ГРУППАХ

Наличие множественных регуляторных и, в частности, фотозащитных механизмов характерно для всех оксигеновых фототрофных организмов,

причём многие из них универсальны (т.е. характерны для всех или почти всех фототрофов). В то же время при сравнении между собой крупных эволюционных групп можно видеть, что есть и определённая специфичность в выборе механизмов представителями разных групп организмов. Выше мы говорили об антенно-подобных белках LhcSR и PsbS, ответственных за тушение: прямое НФТ в случае LhcSR и косвенное – в случае PsbS. Однако распространение этих белков и, следовательно, LhcSR- и PsbS-зависимого тушения существенно различно. LhcSR распространён среди водорослей (у большинства организмов, принадлежащих к линии красных водорослей, гомологичные LhcSR белки обозначают LHCX), а также встречается у мхов, но утерян у высших растений. Наоборот, PsbS является характерным белком наземных (высших) растений и наиболее близких к ним харовых водорослей, но отсутствует у большинства других групп водорослей [30, 102, 103]. Ещё недавно считалось, что хотя ген этого белка и присутствует в модельной зелёной водоросли (*Chlorophyta*) *C. reinhardtii*, но сам белок в ней не экспрессируется или, по крайней мере, не накапливается [102]. Лишь в 2016 г. одновременно две группы обнаружили у *C. reinhardtii* и стресс-индуцированную дифференциальную экспрессию PsbS-кодирующих генов *psbs1* и *psbs2* [104], и сам белок [104, 105]. Позже временное образование этого белка и индукцию его экспрессии обнаружили в ходе суточных изменений интенсивности освещения культуры *C. reinhardtii* [106]. Однако во всех случаях, в отличие от LhcSR, появление PsbS и его транскриптов было относительно кратковременным (часы), что заставило исследователей сделать вывод лишь о вспомогательной функции и не слишком существенной роли PsbS в тушении у этого организма [104, 105]. Незначительные суточные колебания экспрессии LhcSR- и PsbS-кодирующих генов, соответствующие суточным колебаниям температуры и освещённости, также были обнаружены у *Ulva prolifera* [107].

Наконец, недавно нами была обнаружена долговременная (сохраняющаяся в течение нескольких суток) стресс-индуцированная дифференциальная экспрессия PsbS-кодирующего гена у зелёной микроводоросли *L. incisa* [108]. Столь длительное и значительное по величине (на 3–4 порядка) возрастание количества транскриптов этого белка может свидетельствовать о его существенной и самостоятельной роли в индукции НФТ по крайней мере у некоторых представителей *Chlorophyta*. Все эти последние данные существенно расширяют распространение PsbS среди оксигенных фототрофов и удревняют историю его фотозащитной функции в растительном мире.

Необходимо также отметить, что недавно было сообщение об обнаружении дифференциальной экспрессии PsbS у красной водоросли *Kappaphycus alvarezii* [109]. Кодирующая последовательность гена, любезно предоставленная нам авторами, обнаруживает заметное сходство с последовательностями *psbs* зелёных водорослей. Однако в других красных водорослях обнаружить гомологичный ген нам пока не удалось. В соответствии с существующими сегодня представлениями, PsbS присутствует только в «зелёной линии» растений (*Viridiplantae*) [103], в то время как у красных водорослей, антенны которых содержат фикобилин, а не Хл [110], функция PsbS как индуктора НФТ лишена смысла. Если в будущем присутствие гомологов *psbs* в различных представителях красных водорослей (*Rhodophyta*) подтвердится, то это будет поворотным моментом в развитии наших представлений об эволюции функции этого белка.

Несмотря на различные механизмы, которыми LhcSR и PsbS индуцируют тушение флуоресценции, в обоих случаях сигналом для индукции НФТ служит продукт световых реакций – закисление тилакоидного люмена. В цианобактериях (в значительной их части, хотя не во всех), для которых характерна другая система светосбора с использованием развёрнутых тетрапиррольных пигментов, локализованных в крупных растворимых белковых комплексах – фикобилисомах – используется и иная молекулярная система НФТ. Сигналом для её запуска служит непосредственно высокая освещённость, а главным участником – оранжевый каротиноидный белок (ОСР) и связанный с ним кетокаротиноид (эхиненон, гидроксиэхиненон или кантааксантин) [111]. При этом уровень чувствительности триггерного механизма к интенсивности света определяется в этом случае очень низким квантовым выходом фотоконверсии ОСР в фотоактивную форму; в результате фотоконверсия происходит только при высокой интенсивности излучения [112]. ОСР-зависимый механизм НФТ характерен даже для наиболее примитивной из ныне существующих группы цианобактерий, *Gloeobacteria*, сохранившей многие предковые характеристики [111]. Удивительно, что у красных водорослей, также обладающих фикобилисомами, этот механизм не сохранился (оср-подобных генов в них не обнаружено) [113], и действуют рН-зависимые механизмы НФТ [114, 115].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

НФТ – один из основных механизмов защиты ФСА от опасной избыточной световой энергии. Мы рассмотрели здесь только одну из его составляющих – так называемое энергозависимое

тушение ( $qE$ ), и только один из его аспектов – роль фотозащитной субъединицы ФС2, белка PsbS. Несмотря на интенсивные исследования в этой области в течение всех 25 лет с момента открытия НФТ-индуцирующего эффекта PsbS [50] и обилие новых данных, кажется, пока ещё трудно интегрировать их в общую непротиворечивую картину. Так, механизм непрямой PsbS-зависимой активации НФТ – через влияние на  $pK_a$  люменальных протонируемых остатков в LHCII и/или малых антенных [92], через изменение конформации связанных с ними пигментов [93] или через изменение подвижности LHCII [74] – остаётся гипотетическим и требующим способа согласовать его с недавно сформулированной моделью тушения, регулируемого изменениями полярности окружения [45]. Несмотря на, казалось бы, давно и надёжно показанную роль мономерных малых антенн в НФТ как центров тушения [46, 116], взаимодействующих с PsbS [117], недавние данные о НФТ в штаммах *A. thaliana*, дефицитных по этим антенным, оказываются основанием делать вывод о том, что они не играют никакой роли в  $qE$  [68]. Возможно, что наличие подобных взаимоисключающих данных о механизмах НФТ говорит о том, что все они в той или иной мере могут реализовываться *in vivo*; система же в целом обладает достаточно высокой «буферной ёмкостью» своих защитных механизмов, чтобы отключение одного из них в модельной системе не влияло бы существенно на общий уровень НФТ.

Наконец, требует осмыслиения тот парадоксальный факт, что основным участником НФТ оказался PsbS – именно тот представитель суперсемейства антенных (т.е. хлорофилл-связывающих) белков, который лишён каких бы то ни было пигментов, а вместе с ними – и возможности непосредственно осуществлять тушение. Можно предположить, что это ещё один кандидат в копилку примеров несовершенства эволюционных решений, которые основываются на использовании «подручного» материала и связаны со сменой функций.

За пределами подробного рассмотрения остались фотофизические механизмы тушения, связанные с взаимодействием пигментов (Хл и Кар) в пикосекундных масштабах времени. Несмотря на длительную историю исследования этих механизмов, консенсус в их понимании тоже ещё не достигнут. Мы оставили в стороне и другие фотозащитные механизмы, также сокращающие время жизни возбуждённого состояния Хл

в фотосинтетической антенне и потому полно-правно относимые к НФТ. Это в первую очередь механизм, модулирующий интенсивность  $qE$  за счёт синтеза дополнительного количества Зеа и обозначаемый  $qZ$  [118]. Ключевыми для этого механизма являются ферменты виолаксантин-дэпоксидаза и зеаксантин-эпоксидаза, осуществляющие виолаксантиновый цикл и отвечающие за квазистационарную концентрацию Зеа [119]. Это также механизм, до сих пор не получивший удовлетворительного названия в русскоязычной литературе и известный как «переход состояний» (state transition,  $qT$ ). Триггером для этого механизма служит не трансмембранный Арг, а перевосстановление пула пластохинонов на акцепторной стороне ФС2 [120], которое активирует киназу, фосфорилирующую комплексы LHCII. В результате они теряют сродство к ФС2 и мигрируют в менее гидрофобную область, богатую комплексами ФС1 [121], в контакте с которой находят эффективный сток поглощённой энергии света. Можно предположить, что многообразие этих защитных механизмов, так же как и разнообразие возможных путей реализации одного только энергозависимого тушения, говорит о важности этой функции и стремлении фотосинтетического организма использовать любой механизм защиты ФСА, оказавшийся достаточно эффективным.

**Вклад авторов.** Анализ литературы – А.Р. и В.П.; концепция обзора, написание текста – В.П.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00195).

**Благодарности.** Мы благодарны профессору Jianguo Liu и доктору Qianqian Li за предоставленную кодирующую последовательность гена красной водоросли *Karraphycus alvarezii*, гомологичного *psbs* зелёных водорослей. Авторы благодарны ЦКП «Фенотипирование фототрофных организмов» МГУ имени М.В. Ломоносова, на оборудовании которого были получены собственные экспериментальные результаты авторов, обсуждаемые в данном обзоре.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, in *Methods in Enzymology*, Elsevier, p. 350-382, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).

2. Dengel, S., Grace, J., and MacArthur, A. (2015) Transmissivity of solar radiation within a *Picea sitchensis* stand under various sky conditions, *Biogeosciences*, **12**, 4195-4207, <https://doi.org/10.5194/bg-12-4195-2015>.
3. Краснова Е. Д., Лобышев В. И., Лабунская Е. А., Воронов Д. А., Соколовская Ю. Г., Жильцова А. А., Пацаева С. В. (2024) Спектральный состав света в хемоклине стратифицированных водоемов, находящихся на разных стадиях изоляции от Белого моря, *Оптика Атмосферы Океана*, **37**, 307-315, <https://doi.org/10.15372/AOO20240407>.
4. Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Muller, O., and Adams, W. W. (2012) Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons, *Photosynth. Res.*, **113**, 75-88, <https://doi.org/10.1007/s11120-012-9761-6>.
5. Santabarbara, S., Agostini, A., Petrova, A. A., Bortolus, M., Casazza, A. P., and Carbonera, D. (2024) Chlorophyll triplet states in thylakoid membranes of *Acaryochloris marina*. Evidence for a triplet state sitting on the photosystem I primary donor populated by intersystem crossing, *Photosynth. Res.*, **159**, 133-152, <https://doi.org/10.1007/s11120-023-01023-z>.
6. Dogra, V., and Kim, C. (2020) Singlet oxygen metabolism: from genesis to signaling, *Front. Plant Sci.*, **10**, 500205, <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01640>.
7. Dmitrieva, V. A., Tyutereva, E. V., and Voitsekhovskaja, O. V. (2020) Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3237, <https://doi.org/10.3390/ijms21093237>.
8. Bornhütter, T., Pohl, J., Fischer, C., Saltsman, I., Mahammed, A., Gross, Z., and Röder, B. (2016) Development of singlet oxygen luminescence kinetics during the photodynamic inactivation of green algae, *Molecules*, **21**, 485, <https://doi.org/10.3390/molecules21040485>.
9. Telfer, A. (2014) Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of β-carotene, *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1216-1223, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu040>.
10. Krieger-Liszakay, A., Fufezan, C., and Trebst, A. (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism, *Photosynth. Res.*, **98**, 551-564, <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9349-3>.
11. Ledford, H. K., and Niyogi, K. K. (2005) Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae, *Plant Cell Environ.*, **28**, 1037-1045, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01374.x>.
12. Krieger-Liszakay, A. (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis, *J. Exp. Botany*, **56**, 337-346, <https://doi.org/10.1093/jxb/erh237>.
13. Lokstein, H., and Grimm, B. (2007) Chlorophyll-binding proteins, *eLS*, <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020085>.
14. Caffarri, S., Tibiletti, T., C Jennings, R., and Santabarbara, S. (2014) A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning, *Curr. Protein Peptide Sci.*, **15**, 296-331, <https://doi.org/10.2174/1389203715666140327102218>.
15. Wang, W., and Shen, J.-R. (2021) Structure, organization and function of light-harvesting complexes associated with photosystem II, in *Photosynthesis: Molecular Approaches to Solar Energy Conversion*, Springer, pp. 163-194, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-67407-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-67407-6_6).
16. Sheng, X., Watanabe, A., Li, A., Kim, E., Song, C., Murata, K., Song, D., Minagawa, J., and Liu, Z. (2019) Structural insight into light harvesting for photosystem II in green algae, *Nat. Plants*, **5**, 1320-1330, <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0543-4>.
17. Su, X., Ma, J., Wei, X., Cao, P., Zhu, D., Chang, W., Liu, Z., Zhang, X., and Li, M. (2017) Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex, *Science*, **357**, 815-820, <https://doi.org/10.1126/science.aan0327>.
18. Boekema, E. J., van Roon, H., Calkoen, F., Bassi, R., and Dekker, J. P. (1999) Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes, *Biochemistry*, **38**, 2233-2239, <https://doi.org/10.1021/bi9827161>.
19. Tokutsu, R., Kato, N., Bui, K. H., Ishikawa, T., and Minagawa, J. (2012) Revisiting the supramolecular organization of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 31574-31581, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331991>.
20. Watanabe, A., and Minagawa, J. (2020) Structural characterization of the photosystems in the green alga *Chlorella sorokiniana*, *Planta*, **252**, 79, <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03487-y>.
21. Van Bezouwen, L. S., Caffarri, S., Kale, R. S., Kouřil, R., Thunnissen, A.-M. W., Oostergetel, G. T., and Boekema, E. J. (2017) Subunit and chlorophyll organization of the plant photosystem II supercomplex, *Nat. Plants*, **3**, 17080, <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.80>.
22. Valencia, W. M., and Pandit, A. (2024) Photosystem II subunit S (PsbS): a nano regulator of plant photosynthesis, *J. Mol. Biol.*, **436**, 168407, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168407>.
23. Pinnola, A., Cazzaniga, S., Alboresi, A., Nevo, R., Levin-Zaidman, S., Reich, Z., and Bassi, R. (2015) Light-harvesting complex stress-related proteins catalyze excess energy dissipation in both photosystems of *Physcomitrella patens*, *Plant Cell*, **27**, 3213-3227, <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00443>.

24. Suga, M., and Shen, J.-R. (2020) Structural variations of photosystem I-antenna supercomplex in response to adaptations to different light environments, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **63**, 10-17, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.02.005>.
25. Caspy, I., Borovikova-Sheinker, A., Klaiman, D., Shkolnisky, Y., and Nelson, N. (2020) The structure of a triple complex of plant photosystem I with ferredoxin and plastocyanin, *Nat. Plants*, **6**, 1300-1305, <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00779-9>.
26. Shen, L., Tang, K., Wang, W., Wang, C., Wu, H., Mao, Z., An, S., Chang, S., Kuang, T., and Shen, J.-R. (2022) Architecture of the chloroplast PSI-NDH supercomplex in *Hordeum vulgare*, *Nature*, **601**, 649-654, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04277-6>.
27. Fadeeva, M., Klaiman, D., and Nelson, N. (2023) Cryo-EM structure of the Photosystem I – LHCI supercomplex from *Coelastrella* sp., in press.
28. Huang, Z., Shen, L., Wang, W., Mao, Z., Yi, X., Kuang, T., Shen, J.-R., Zhang, X., and Han, G. (2021) Structure of photosystem I-LHCI-LHCII from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in State 2, *Nat. Commun.*, **12**, 1100, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21362-6>.
29. Girolomoni, L., Cazzaniga, S., Pinnola, A., Perozeni, F., Ballottari, M., and Bassi, R. (2019) LHCIII is a nonphotochemical quencher of both photosystems in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 4212-4217, <https://doi.org/10.1073/pnas.1809812116>.
30. Pinnola, A. (2019) The rise and fall of Light-Harvesting Complex Stress-Related proteins as photoprotection agents during evolution, *J. Exp. Botany*, **70**, 5527-5535, <https://doi.org/10.1093/jxb/erz317>.
31. Schreiber, U., and Klughammer, C. (2021) Evidence for variable chlorophyll fluorescence of photosystem I *in vivo*, *Photosynth. Res.*, **149**, 213-231, <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00814-y>.
32. Schreiber, U. (2023) Light-induced changes of far-red excited chlorophyll fluorescence: further evidence for variable fluorescence of photosystem I *in vivo*, *Photosynth. Res.*, **155**, 247-270, <https://doi.org/10.1007/s11120-022-00994-9>.
33. Ritchie, R. (2010) Modelling photosynthetic photon flux density and maximum potential gross photosynthesis, *Photosynthetica*, **48**, 596-609, <https://doi.org/10.1007/s11099-010-0077-5>.
34. Niyogi, K. K., Björkman, O., and Grossman, A. R. (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14162-14167, <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14162>.
35. Niyogi, K. K., Shih, C., Soon Chow, W., Pogson, B. J., DellaPenna, D., and Björkman, O. (2001) Photoprotection in a zeaxanthin-and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*, *Photosynth. Res.*, **67**, 139-145, <https://doi.org/10.1023/A:1010661102365>.
36. Niedzwiedzki, D. M., Sullivan, J. O., Polívka, T., Birge, R. R., and Frank, H. A. (2006) Femtosecond time-resolved transient absorption spectroscopy of xanthophylls, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 22872-22885, <https://doi.org/10.1021/jp0622738>.
37. Lee, T.-Y., Lam, L., Patel-Tupper, D., Roy, P. P., Ma, S. A., Lucas-DeMott, A., Karavolias, N. G., Niyogi, K. K., and Fleming, G. R. (2023) Chlorophyll to zeaxanthin energy transfer in non-photochemical quenching: an exciton annihilation-free transient absorption study, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.10.11.561813>.
38. Frank, H. A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D., and Wasielewski, M. R. (1994) Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis, *Photosynth. Res.*, **41**, 389-395, <https://doi.org/10.1007/BF02183041>.
39. Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 1-24, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90088-L](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90088-L).
40. Сапожников Д., Красовская Т., Маевская А. (1957) Изменение соотношения основных каротиноидов пластид зеленых листьев при действии света, *Докл. АН СССР*, **113**, 465.
41. Polívka, T., Zigmantas, D., Sundström, V., Formaggio, E., Cinque, G., and Bassi, R. (2002) Carotenoid S1 state in a recombinant light-harvesting complex of photosystem II, *Biochemistry*, **41**, 439-450, <https://doi.org/10.1021/bi011589x>.
42. Son, M., Pinnola, A., and Schlau-Cohen, G. S. (2020) Zeaxanthin independence of photophysics in light-harvesting complex II in a membrane environment, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 148115, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148115>.
43. Balevičius, V., and Duffy, C. D. (2020) Excitation quenching in chlorophyll-carotenoid antenna systems: ‘coherent’ or ‘incoherent’, *Photosynth. Res.*, **144**, 301-315, <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00737-8>.
44. Holt, N. E., Zigmantas, D., Valkunas, L., Li, X.-P., Niyogi, K. K., and Fleming, G. R. (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting, *Science*, **307**, 433-436, <https://doi.org/10.1126/science.1105833>.
45. Ostroumov, E. E., Götze, J. P., Reus, M., Lambrev, P. H., and Holzwarth, A. R. (2020) Characterization of fluorescent chlorophyll charge-transfer states as intermediates in the excited state quenching of light-harvesting complex II, *Photosynth. Res.*, **144**, 171-193, <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00745-8>.

46. Ahn, T. K., Avenson, T. J., Ballottari, M., Cheng, Y.-C., Niyogi, K. K., Bassi, R., and Fleming, G. R. (2008) Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein, *Science*, **320**, 794-797, <https://doi.org/10.1126/science.1154800>.
47. Pinnola, A., Staleva-Musto, H., Capaldi, S., Ballottari, M., Bassi, R., and Polívka, T. (2016) Electron transfer between carotenoid and chlorophyll contributes to quenching in the LHCSR1 protein from *Physcomitrella patens*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1870-1878, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.09.001>.
48. Polívka, T., Herek, J. L., Zigmantas, D., Åkerlund, H.-E., and Sundström, V. (1999) Direct observation of the (forbidden) S1 state in carotenoids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4914-4917, <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4914>.
49. Ruban, A. V., Johnson, M. P., and Duffy, C. D. (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 167-181, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.007>.
50. Li, X.-P., BjoÈrkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., and Niyogi, K. K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting, *Nature*, **403**, 391-395, <https://doi.org/10.1038/35000131>.
51. Ljungberg, U., Åkerlund, H. E., and Andersson, B. (1986) Isolation and characterization of the 10-kDa and 22-kDa polypeptides of higher plant photosystem 2, *Eur. J. Biochem.*, **158**, 477-482, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09779.x>.
52. Wedell, N., Klein, R., Ljungberg, U., Andersson, B., and Herrmann, R. (1992) The single-copy gene psbS codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II, *FEBS Lett.*, **314**, 61-66, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81462-U](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81462-U).
53. Kim, S., Sandusky, P., Bowlby, N. R., Aebersold, R., Green, B. R., Vlahaskis, S., Yocum, C. F., and Pichersky, E. (1992) Characterization of a spinach psbS cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II, *FEBS Lett.*, **314**, 67-71, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81463-V](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81463-V).
54. Funk, C., Schroeder, W. P., Napiwotzki, A., Tjus, S. E., Renger, G., and Andersson, B. (1995) The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigment-binding protein, *Biochemistry*, **34**, 11133-11141, <https://doi.org/10.1021/bi00035a019>.
55. Külheim, C., and Jansson, S. (2005). What leads to reduced fitness in non-photochemical quenching mutants? *Phys. Plant.*, **125**, 202-211, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00547.x>.
56. Crouchman, S., Ruban, A., and Horton, P. (2006). PsbS enhances nonphotochemical fluorescence quenching in the absence of zeaxanthin, *FEBS Lett.*, **580**, 2053-2058, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.005>.
57. Bonente, G., Passarini, F., Cazzaniga, S., Mancone, C., Buia, M. C., Tripodi, M., Bassi, R., and Caffarri, S. (2008) The occurrence of the psbS gene product in *Chlamydomonas reinhardtii* and in other photosynthetic organisms and its correlation with energy quenching, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1359-1370, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00456.x>.
58. Gagné, G., and Guertin, M. (1992) The early genetic response to light in the green unicellular alga *Chlamydomonas eugametos* grown under light/dark cycles involves genes that represent direct responses to light and photosynthesis, *Plant Mol. Biol.*, **18**, 429-445, <https://doi.org/10.1007/BF00040659>.
59. Peers, G., Truong, T. B., Ostendorf, E., Busch, A., Elrad, D., Grossman, A. R., Hippler, M., and Niyogi, K. K. (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis, *Nature*, **462**, 518-521, <https://doi.org/10.1038/nature08587>.
60. Liguori, N., Novoderezhkin, V., Roy, L. M., van Grondelle, R., and Croce, R. (2016). Excitation dynamics and structural implication of the stress-related complex LHCSR3 from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1514-1523, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.04.285>.
61. Park, S., Steen, C. J., Lyska, D., Fischer, A. L., Endelman, B., Iwai, M., Niyogi, K. K., and Fleming, G. R. (2019) Chlorophyll-carotenoid excitation energy transfer and charge transfer in *Nannochloropsis oceanica* for the regulation of photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 3385-3390, <https://doi.org/10.1073/pnas.1819011116>.
62. Fan, M., Li, M., Liu, Z., Cao, P., Pan, X., Zhang, H., Zhao, X., Zhang, J., and Chang, W. (2015) Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 729-735, <https://doi.org/10.1038/nsmb.3068>.
63. Ruan, M., Li, H., Zhang, Y., Zhao, R., Zhang, J., Wang, Y., Gao, J., Wang, Z., Wang, Y., and Sun, D. (2023) Cryo-EM structures of LHCII in photo-active and photo-protecting states reveal allosteric regulation of light harvesting and excess energy dissipation, *Nat. Plants*, **9**, 1547-1557, <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01500-2>.
64. Aspinall-O'Dea, M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A., and Horton, P. (2002) *In vitro* reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16331-16335, <https://doi.org/10.1073/pnas.252500999>.

65. Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M., and Bassi, R. (2002) Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant, *J. Biol. Chem.*, **277**, 22750-22758, <https://doi.org/10.1074/jbc.M200604200>.
66. Ptushenko, V. V., Knorre, D. D., and Glagoleva, E. S. (2023) The photoprotective protein PsbS from green microalga *lobosphaera incisa*: the amino acid sequence, 3D structure and probable pH-sensitive residues, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15060, <https://doi.org/10.3390/ijms242015060>.
67. Nicol, L., Nawrocki, W. J., and Croce, R. (2019) Disentangling the sites of non-photochemical quenching in vascular plants, *Nat. Plants*, **5**, 1177-1183, <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0526-5>.
68. Saccon, F., Giovagnetti, V., Shukla, M. K., and Ruban, A. V. (2020) Rapid regulation of photosynthetic light harvesting in the absence of minor antenna and reaction centre complexes, *J. Exp. botany*, **71**, 3626-3637, <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa126>.
69. Ruban, A. V., and Wilson, S. (2021) The mechanism of non-photochemical quenching in plants: localization and driving forces, *Plant Cell Physiol.*, **62**, 1063-1072, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa155>.
70. Santabarbara, S., Horton, P., and Ruban, A. V. (2009) Comparison of the thermodynamic landscapes of unfolding and formation of the energy dissipative state in the isolated light harvesting complex II, *Biophys. J.*, **97**, 1188-1197, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.005>.
71. Navakoudis, E., Stergiannakos, T., and Daskalakis, V. (2023) A perspective on the major light-harvesting complex dynamics under the effect of pH, salts, and the photoprotective PsbS protein, *Photosynth. Res.*, **156**, 163-177, <https://doi.org/10.1007/s11120-022-00935-6>.
72. Tietz, S., Leuenberger, M., Höhner, R., Olson, A. H., Fleming, G. R., and Kirchhoff, H. (2020) A proteoliposome-based system reveals how lipids control photosynthetic light harvesting, *J. Biol. Chem.*, **295**, 1857-1866, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011707>.
73. Azadi-Chegeni, F., Thallmair, S., Ward, M. E., Perin, G., Marrink, S. J., Baldus, M., Morosinotto, T., and Pandit, A. (2022) Protein dynamics and lipid affinity of monomeric, zeaxanthin-binding LHCII in thylakoid membranes, *Biophys. J.*, **121**, 396-409, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.12.039>.
74. Daskalakis, V., Papadatos, S., and Kleinekathöfer, U. (2019) Fine tuning of the photosystem II major antenna mobility within the thylakoid membrane of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 183059, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183059>.
75. Ruban, A., Rees, D., Pascal, A., and Horton, P. (1992) Mechanism of  $\Delta\text{pH}$ -dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. II. The relationship between LHCII aggregation *in vitro* and qE in isolated thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1102**, 39-44, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(92\)90062-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(92)90062-7).
76. Tutkus, M., Chmeliov, J., Trinkunas, G., Akhtar, P., Lambrev, P. H., and Valkunas, L. (2021) Aggregation-related quenching of LHCII fluorescence in liposomes revealed by single-molecule spectroscopy, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **218**, 112174, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112174>.
77. Shukla, M. K., Watanabe, A., Wilson, S., Giovagnetti, V., Moustafa, E. I., Minagawa, J., and Ruban, A. V. (2020) A novel method produces native light-harvesting complex II aggregates from the photosynthetic membrane revealing their role in nonphotochemical quenching, *J. Biol. Chem.*, **295**, 17816-17826, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016181>.
78. Li, X.-P., Müller-Moulé, P., Gilmore, A. M., and Niyogi, K. K. (2002) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15222-15227, <https://doi.org/10.1073/pnas.232447699>.
79. Johnson, M. P., Goral, T. K., Duffy, C. D., Brain, A. P., Mullineaux, C. W., and Ruban, A. V. (2011) Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts, *Plant Cell*, **23**, 1468-1479, <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081646>.
80. Johnson, M. P., and Ruban, A. V. (2011) Restoration of rapidly reversible photoprotective energy dissipation in the absence of PsbS protein by enhanced  $\Delta\text{pH}$ , *J. Biol. Chem.*, **286**, 19973-19981, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237255>.
81. Goral, T. K., Johnson, M. P., Duffy, C. D., Brain, A. P., Ruban, A. V., and Mullineaux, C. W. (2012) Light-harvesting antenna composition controls the macrostructure and dynamics of thylakoid membranes in *Arabidopsis*, *Plant J.*, **69**, 289-301, <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04790.x>.
82. Daskalakis, V., Maity, S., Hart, C. L., Stergiannakos, T., Duffy, C. D., and Kleinekathöfer, U. (2019) Structural basis for allosteric regulation in the major antenna trimer of photosystem II, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 9609-9615, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b09767>.
83. Daskalakis, V., Papadatos, S., and Stergiannakos, T. (2020) The conformational phase space of the photoprotective switch in the major light harvesting complex II, *Chem. Commun.*, **56**, 11215-11218, <https://doi.org/10.1039/D0CC04486E>.

84. Li, H., Wang, Y., Ye, M., Li, S., Li, D., Ren, H., Wang, M., Du, L., Li, H., and Veglia, G. (2020) Dynamical and allosteric regulation of photoprotection in light harvesting complex II, *Sci. China Chem.*, **63**, 1121-1133, <https://doi.org/10.1007/s11426-020-9771-2>.
85. Papadatos, S., Charalambous, A. C., and Daskalakis, V. (2017) A pathway for protective quenching in antenna proteins of Photosystem II, *Sci. Rep.*, **7**, 2523, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02892-w>.
86. Thallmair, S., Vainikka, P. A., and Marrink, S. J. (2019) Lipid fingerprints and cofactor dynamics of light-harvesting complex II in different membranes, *Biophys. J.*, **116**, 1446-1455, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.03.009>.
87. Daskalakis, V., and Papadatos, S. (2017) The photosystem II subunit S under stress, *Biophys. J.*, **113**, 2364-2372, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.034>.
88. Liguori, N., Campos, S. R., Baptista, A. N. M., and Croce, R. (2019) Molecular anatomy of plant photoprotective switches: the sensitivity of PsbS to the environment, residue by residue, *J. Phys. Chem. Lett.*, **10**, 1737-1742, <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.9b00437>.
89. Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., Bressan, M., Paleček, D., Žídek, K., Niyogi, K. K., Fleming, G. R., Zigmantas, D., and Bassi, R. (2017) Two mechanisms for dissipation of excess light in monomeric and trimeric light-harvesting complexes, *Nat. Plants*, **3**, 17033, <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.33>.
90. Sacharz, J., Giovagnetti, V., Ungerer, P., Mastrianni, G., and Ruban, A. V. (2017) The xanthophyll cycle affects reversible interactions between PsbS and light-harvesting complex II to control non-photochemical quenching, *Nat. Plants*, **3**, 16225, <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.225>.
91. Correa-Galvis, V., Poschmann, G., Melzer, M., Stühler, K., and Jahns, P. (2016) PsbS interactions involved in the activation of energy dissipation in *Arabidopsis*, *Nat. Plants*, **2**, 15225, <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.225>.
92. Daskalakis, V. (2018) Protein–protein interactions within photosystem II under photoprotection: the synergy between CP29 minor antenna, subunit S (PsbS) and zeaxanthin at all-atom resolution, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 11843-11855, <https://doi.org/10.1039/C8CP01226A>.
93. Liguori, N., Xu, P., Van Stokkum, I. H., Van Oort, B., Lu, Y., Karcher, D., Bock, R., and Croce, R. (2017) Different carotenoid conformations have distinct functions in light-harvesting regulation in plants, *Nat. Commun.*, **8**, 1994, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02239-z>.
94. Bergantino, E., Segalla, A., Brunetta, A., Teardo, E., Rigoni, F., Giacometti, G. M., and Szabò, I. (2003) Light- and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15265-15270, <https://doi.org/10.1073/pnas.2533072100>.
95. Krishnan-Schmieden, M., Konold, P. E., Kennis, J. T., and Pandit, A. (2021) The molecular pH-response mechanism of the plant light-stress sensor PsbS, *Nat. Commun.*, **12**, 2291, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22530-4>.
96. Ambrose, W. P., Goodwin, P. M., Martin, J. C., and Keller, R. A. (1994) Single molecule detection and photochemistry on a surface using near-field optical excitation, *Phys. Rev. Lett.*, **72**, 160, <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.72.160>.
97. Basché, T., Kummer, S., and Bräuchle, C. (1995) Direct spectroscopic observation of quantum jumps of a single molecule, *Nature*, **373**, 132-134, <https://doi.org/10.1038/373132a0>.
98. Krüger, T. P., Illoiaia, C., Valkunas, L., and van Grondelle, R. (2011) Fluorescence intermittency from the main plant light-harvesting complex: sensitivity to the local environment, *J. Phys. Chem. B*, **115**, 5083-5095, <https://doi.org/10.1021/jp109833x>.
99. Bopp, M. A., Jia, Y., Li, L., Cogdell, R. J., and Hochstrasser, R. M. (1997) Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10630-10635, <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10630>.
100. Ying, L., and Xie, X. S. (1998) Fluorescence spectroscopy, exciton dynamics, and photochemistry of single allophycocyanin trimers, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 10399-10409, <https://doi.org/10.1021/jp983227d>.
101. Hofkens, J., Schroeyers, W., Loos, D., Cotlet, M., Köhn, F., Vosch, T., Maus, M., Herrmann, A., Müllen, K., and Gensch, T. (2001) Triplet states as non-radiative traps in multichromophoric entities: single molecule spectroscopy of an artificial and natural antenna system, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **57**, 2093-2107, [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(01\)00499-1](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(01)00499-1).
102. Gerotto, C., and Morosinotto, T. (2013) Evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization: evidence of PSBS-dependent NPQ in late *Streptophyte* algae, *Physiol. Plant.*, **149**, 583-598, <https://doi.org/10.1111/ppl.12070>.
103. Giovagnetti, V., and Ruban, A. V. (2018) The evolution of the photoprotective antenna proteins in oxygenic photosynthetic eukaryotes, *Biochem. Soc. Transact.*, **46**, 1263-1277, <https://doi.org/10.1042/BST20170304>.
104. Tibiletti, T., Auroy, P., Peltier, G., and Caffarri, S. (2016) *Chlamydomonas reinhardtii* PsbS protein is functional and accumulates rapidly and transiently under high light, *Plant Physiol.*, **171**, 2717-2730, <https://doi.org/10.1104/pp.16.00572>.

105. Correa-Galvis, V., Redekop, P., Guan, K., Griess, A., Truong, T. B., Wakao, S., Niyogi, K. K., and Jahns, P. (2016) Photosystem II subunit PsbS is involved in the induction of LHCSR protein-dependent energy dissipation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.*, **291**, 17478-17487, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.737312>.
106. Strenkert, D., Schmollinger, S., Gallaher, S. D., Salomé, P. A., Purvine, S. O., Nicora, C. D., Mettler-Altmann, T., Soubestrand, E., Weber, A. P., and Lipton, M. S. (2019) Multiomics resolution of molecular events during a day in the life of *Chlamydomonas*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2374-2383, <https://doi.org/10.1073/pnas.1815238116>.
107. Zhao, X., Tang, X., Hu, S., Zhong, Y., Qu, T., and Wang, Y. (2019) Photosynthetic response of floating *Ulva prolifera* to diurnal changes of in-situ environments on the sea surface, *J. Oceanol. Limnol.*, **37**, 589-599, <https://doi.org/10.1007/s00343-019-8081-5>.
108. Ptushenko, V. V., Bondarenko, G. N., Vinogradova, E. N., Glagoleva, E. S., Karpova, O. V., Ptushenko, O. S., Shibusukhova, K. A., Solovchenko, A. E., and Lobakova, E. S. (2022) Chilling upregulates expression of the PsbS and LhcSR genes in the chloroplasts of the green microalga *Lobosphaera incisa* IPPAS C-2047, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1699-1706, <https://doi.org/10.1134/S0006297922120240>.
109. Li, Q., Zhang, L., Pang, T., and Liu, J. (2019) Comparative transcriptome profiling of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) in response to two extreme temperature treatments: an RNA-seq-based resource for photosynthesis research, *Eur. J. Phycol.*, **54**, 162-174, <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1536283>.
110. Larkum, A. W. (2020) Light-harvesting in cyanobacteria and eukaryotic algae: an overview, in *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms*, pp. 207-260, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-33397-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-33397-3_10).
111. Slonimskiy, Y. B., Zupnik, A. O., Varfolomeeva, L. A., Boyko, K. M., Maksimov, E. G., and Sluchanko, N. N. (2022) A primordial orange carotenoid protein: structure, photoswitching activity and evolutionary aspects, *Int. J. Biol. Macromol.*, **222**, 167-180, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.131>.
112. Wilson, A., Punginelli, C., Gall, A., Bonetti, C., Alexandre, M., Routaboul, J.-M., Kerfeld, C. A., Van Grondelle, R., Robert, B., and Kennis, J. T. (2008) A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 12075-12080, <https://doi.org/10.1073/pnas.0804636105>.
113. Kirilovsky, D. (2020) Modulating energy transfer from phycobilisomes to photosystems: state transitions and OCP-related non-photochemical quenching, in *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms*, 367-396, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-33397-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-33397-3_14).
114. Delphin, E., Duval, J.-C., Etienne, A.-L., and Kirilovsky, D. (1996) State transitions or ΔpH-dependent quenching of photosystem II fluorescence in red algae, *Biochemistry*, **35**, 9435-9445, <https://doi.org/10.1021/bi960528+>.
115. Delphin, E., Duval, J.-C., Etienne, A.-L., and Kirilovsky, D. (1998) ΔpH-dependent photosystem II fluorescence quenching induced by saturating, multturnover pulses in red algae, *Plant Physiol.*, **118**, 103-113, <https://doi.org/10.1104/pp.118.1.103>.
116. Cazzaniga, S., Kim, M., Bellamoli, F., Jeong, J., Lee, S., Perozeni, F., Pompa, A., Jin, E., and Ballottari, M. (2020) Photosystem II antenna complexes CP26 and CP29 are essential for nonphotochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Environ.*, **43**, 496-509, <https://doi.org/10.1111/pce.13680>.
117. Teardo, E., de Laureto, P. P., Bergantino, E., Dalla Vecchia, F., Rigoni, F., Szabò, I., and Giacometti, G. M. (2007) Evidences for interaction of PsbS with photosynthetic complexes in maize thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 703-711, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.12.002>.
118. Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R., and Jahns, P. (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 466-475, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.001>.
119. Yamamoto, H. Y. (1979) Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants, in *Carotenoids-5*, Elsevier, pp. 639-648, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-022359-9.50017-5>.
120. Subramanyam, R., and Madireddi, S. K. (2021) Perception of state transition in photosynthetic organisms, in *Photosynthesis: Molecular Approaches to Solar Energy Conversion*, Springer, pp. 303-320, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-67407-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-67407-6_11).
121. Vetoshkina, D., and Borisova-Mubarakshina, M. (2023) Reversible protein phosphorylation in higher plants: focus on state transitions, *Biophys. Rev.*, **15**, 1079-1093, <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01116-y>.

## ENERGY DEPENDENT NON-PHOTOSHEMICAL QUENCHING: PsbS, LhcSR AND OTHER PLAYERS

### Review

V. V. Ptushenko<sup>1,2\*</sup> and A. P. Razjivin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119992 Moscow, Russia; e-mail: ptush@belozersky.msu.ru*

<sup>2</sup> *N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences,  
119334 Moscow, Russia*

The photosynthetic apparatus of plants is capable of capturing even weak fluxes of light energy. Hence, strong and rapid increase in irradiance should be dangerous for plants. To solve the problems caused by fluctuations of incident radiation (up to excessive), plants have developed a number of protective mechanisms, including non-photochemical quenching (NPQ) of excited chlorophyll states. NPQ is a set of mechanisms that shorten the lifetime of excited chlorophyll states in the photosynthetic antenna, thereby reducing dangerous effects of light. The most rapid mechanism of NPQ is energy-dependent quenching (qE) triggered by the proton potential formation on the thylakoid transmembrane. The main molecular players of qE are xanthophylls (oxygen-containing carotenoids) and proteins of the thylakoid membrane: antenna component LhcSR in algae and mosses and photosystem II component PsbS in higher plants and some groups of “green lineage” alga. This review discusses molecular mechanisms of qE, with a special focus on the PsbS-dependent quenching. The discovery that PsbS does not bind pigments has led to the hypothesis of PsbS-dependent indirect activation of quenching, in which PsbS acts as a relay switching on the quenching sites in the major (LHCII) and/or minor photosynthetic antennae. The suggested mechanisms include the effect of PsbS on carotenoid conformation and/or pK<sub>a</sub> values of amino acid residues in PSII antennae. PsbS can also act as a membrane “lubricant” that ensures migration of the major antenna LHCII in the thylakoid membrane and its aggregation followed by transition to the quenched state.

**Keywords:** energy dependent quenching, direct quenching, indirect activation of quenching, PsbS, LhcSR, LHCII

УДК 612.821.6

## КОЛОКАЛИЗАЦИЯ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ В ГИППОКАМПЕ И АФФЕРЕНТНЫХ СИСТЕМАХ: ВОЗМОЖНАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ

### Обзор

© 2025 В.Ф. Кичигина

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: vkitchigina@gmail.com

Поступила в редакцию 30.10.2024

После доработки 05.12.2024

Принята к публикации 08.12.2024

В нейрофизиологии трансмиттерный фенотип считается признаком нейронной идентичности. С конца прошлого века стало известно, что нервная клетка может использовать для связи с другими нейронами несколько разных молекул. Это могут быть «классические» трансмиттеры: глутамат или гамма-аминомасляная кислота (либо ацетилхолин, серотонин, норадреналин), а также вторичные мессенджеры, в основном нейропептиды, выделяющиеся из тех же самых нейронов. Если классические нейромедиаторы совместно высвобождаются из одной и той же нервной клетки, говорят о котрансмиссии или корелизинге (выделении из одних и тех же везикул). В данной обзорной статье используется термин «котрансмиссия» в широком смысле, обозначая нейроны, которые высвобождают более одного классического медиатора. Поскольку трансмиттеры часто являются промежуточными продуктами метаболизма и обнаруживаются во многих клетках, классификация нейронов в настоящее время основана на белках-переносчиках (транспортерах), «упаковывающих» синтезируемые в цитоплазме нейромедиаторы в везикулы. Вопрос о колокализации основных нейротрансмиттеров у млекопитающих ограничивается здесь нейронами гиппокампа и тех структур, которые посылают к нему свои пути. В обзоре рассматриваются проблемы, затрагивающие механизмы мультитрансмиттерного сигналинга, а также вероятной функциональной роли колокализации медиаторов в работе гиппокампа. Предполагается, что коэкспрессия разных медиаторных фенотипов участвует в поддержании баланса возбуждения и торможения в разных регионах гиппокампа; способствует быстрому выбору способов обработки информации, индукции долговременной потенциации, поддержанию пространственного кодирования клетками места, а также обеспечению гибкости обучения и формированию рабочей памяти. Однако функциональная роль колокализации медиаторов, а также механизмов выделения «двойных» трансмиттеров окончательно не выяснены. Решение данных проблем продвинет некоторые направления фундаментальной нейронауки и поможет в терапии тех заболеваний, где обнаруживается нарушение баланса возбуждения и торможения, например эпилепсии, болезни Альцгеймера и многих других.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гиппокамп, зубчатая извилина, афферентные структуры, пирамидные нейроны, гранулярные клетки, интернейроны, трансмиттеры, глутамат, ГАМК, транспортеры, тета-ритм, механизмы, функциональная роль, судорожная патология.

DOI: 10.31857/S0320972525010059 EDN: CPVAUL

### ВВЕДЕНИЕ

Нейромедиаторный фенотип издавна рассматривается как признак нейронной идентичности. Классическая точка зрения, сформулированная как «принцип Дейла» [1], заключалась в том, что каждый нейрон выделяет только один трансмиттер. Однако сейчас стали известны много-

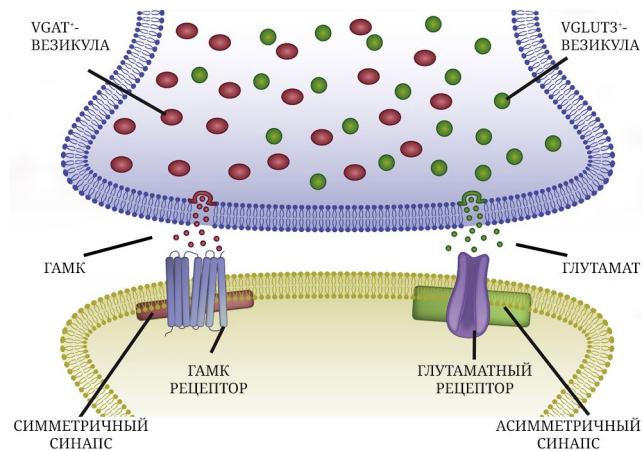
кие классы нейронов, которые синтезируют множественные передатчики. К ним относятся клетки, выделяющие несколько быстродействующих нейротрансмиттеров, передающих сигналы через ионотропные рецепторы (например, глутамат и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) или ГАМК и ацетилхолин), либо один быстродействующий нейротрансмиттер и вторую небольшую моле-

кулу, которая передает сигналы через рецепторы, связанные с G-белком (например, ГАМК и дофамин), либо классический низкомолекулярный передатчик и нейропептид (например, ГАМК и соматостатин) [2–4]. Среди нейропептидов, колокализующихся с классическими медиаторами, известны также энкефалин, холецистокинин (ССК), нейропептид Y, нейротензин и др.

Если два нейротрансмиттера высвобождаются из одного и того же нейрона, говорят о котрансмиссии; при этом имеется в виду, что два передатчика высвобождаются из разных везикул в разных местах и/или в разное время. Дополнительный термин «одновременное высвобождение» (корелизинг) подразумевает одновременный выход двух медиаторов из одних и тех же везикул. Для того чтобы произошло одновременное высвобождение, необходимо, чтобы два «классических» передатчика из нескольких известных (глутамат, ГАМК, дофамин, ацетилхолин, серотонин, норадреналин) хранились внутри одного и того же синаптического пузырька в легко высвобождаемом пуле. При отсутствии одновременного высвобождения из одних и тех же пузырьков совместная передача может включать синхронное высвобождение двух разных наборов везикул, содержащих разные нейротрансмиттеры (см. обзор Trudeau и Mestikawy [5] и рис. 1).

В настоящем обзоре мы будем использовать термин «котрансмиссия» в широком смысле, обозначая нейроны, которые могут высвобождать более одного классического медиатора. Такое высвобождение часто происходит из одних и тех же синаптических окончаний, но может также осуществляться из разных варикозных расширений, образуемых одним нейроном.

Глутамат и ГАМК являются классическими быстродействующими нейротрансмиттерами, используемыми нервной системой на протяжении большей части филогенеза. Известно, что в мозге млекопитающих, воздействуя на различные наборы ионотропных рецепторов, эти трансмиттеры обычно оказывают противоположные эффекты на нейрон-мишень, при этом глутамат возбуждает, а ГАМК ингибирует постсинаптический нейрон. Поскольку классические медиаторы представляют собой небольшие молекулы, они часто являются промежуточными продуктами метаболизма



**Рис. 1.** Схема синаптической архитектуры «двойных» ( $\text{VGLUT3}^+$  и  $\text{VGAT}^+$ ) нейронов, выделяющих глутамат и ГАМК из отдельных синаптических пузырьков в независимых асимметричных или симметричных синапсах. Адаптировано из [79], с разрешения Elsevier (лицензия № 5922371097009 от 05 декабря 2024 г.). ГАМК — гамма-аминомасляная кислота;  $\text{VGLUT3}^+$ -везикулы — положительные везикулярные транспортеры глутамата;  $\text{VGAT}^+$ -везикулы — положительные везикулярные транспортеры ГАМК

и, таким образом, обнаруживаются во многих клетках. Исходя из этого, классификация нейронов основана главным образом на белках-переносчиках (транспортерах), «упаковывающих» синтезируемые в цитоплазме нейротрансмиттеры в везикулы, из которых они позже высвобождаются в синаптическую щель [6]. Транспортеры медиаторов поддерживают их внеклеточную концентрацию вблизи синапса, чтобы контролировать активность соответствующих рецепторов.

Глутаматергические клетки (использующие глутамат в качестве медиатора) являются одним из самых распространенных типов нейронов не только в гиппокампе, но и в мозге в целом. Транспортеры везикулярного глутамата (VGLUT) экспрессируются на мембранах синаптических пузырьков и считаются характерными только для нейронов. Существует три изоформы VGLUT (VGLUT1, VGLUT2 и VGLUT3) без существенных их различий в захвате глутамата при тестировании в экспериментах *in vitro* [7, 8]. В то время как две первые изоформы транспортера обычно не колокализуются с другими основными трансмиттерами, VGLUT3 проявляет совместную локализацию

Принятые сокращения: ВТО — вентральная тегментальная область; ГАМК — гамма-аминомасляная кислота; интернейроны — ГАМКергические нейроны гиппокампа; МСДБ — комплекс медиального септального ядра и ядра диагонального пучка Брука; мЯШ — медианное ядро шва; СУМ — супрамамillaryное ядро (часть гипоталамуса); СУМЛ — нейроны латеральной части СУМ; ССК — холецистокинин; ССК<sup>+</sup>-интернейроны — холецистокинин-положительные ГАМКергические нейроны; ChAT — холинаэтилтрансфераза (фермент, участвующий в синтезе ацетилхолина); GAD — глутаматдекарбоксилаза (фермент, участвующий в синтезе ГАМК); SERT — транспортеры серотонина; VGAT — везикулярные транспортеры ГАМК; VGAT<sup>+</sup>-везикулы — VGAT-положительные везикулы; VGLUT — везикулярные транспортеры глутамата; VGLUT3<sup>+</sup>-везикулы — VGLUT3-положительные везикулы.

с другими медиаторами, такими как ГАМК, серотонин, дофамин или ацетилхолин [9]. Как свидетельствуют недавние данные, нейроны, которые вместе с глутаматом выделяют ГАМК, экспрессируют либо VGLUT2, либо VGLUT3, но не VGLUT1 [10].

Другой «классический» медиатор в гиппокампе представлен тормозной ГАМК. Канонически ГАМК синтезируется из внутриклеточного глутамата с помощью одной из двух разновидностей фермента глутаматдекарбоксилазы (GAD65 или GAD67), что требует накопления двух противоположных классических нейротрансмиттеров в цитоплазме большинства тормозных интернейронов в ЦНС. В ГАМКергических клетках обычно отсутствуют VGLUT; исключением являются холецистокинин-экспрессирующие интернейроны [11]. Транспортерами для ГАМК, а значит, и маркерами ГАМКергических клеток, являются везикулярные ГАМК-транспортеры (VGAT). Они представлены четырьмя основными типами: VGAT1, VGAT2, VGAT3 и VGAT4. Основными транспортерами ГАМК в головном мозге являются VGAT1 и VGAT3; они экспрессируются как нейронами, так и некоторыми астроцитами [12].

В данном обзоре рассматривается вопрос о колокализации у млекопитающих основных медиаторов как в нейронах гиппокампа, так и в нейронах структур, посылающих к нему свои пути и имеющих мишени в виде различных субклеточных компартментов нейронов гиппокампа и зубчатой извилины. Определенное внимание здесь также уделяется вопросам о механизмах выделения и возможной функциональной роли такой колокализации в норме и при патологии.

## КОЛОКАЛИЗАЦИЯ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ В КЛЕТКАХ И АФФЕРЕНТНЫХ ПУТЯХ ГИППОКАМПА КАК ИНСТРУМЕНТ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МОЗГА

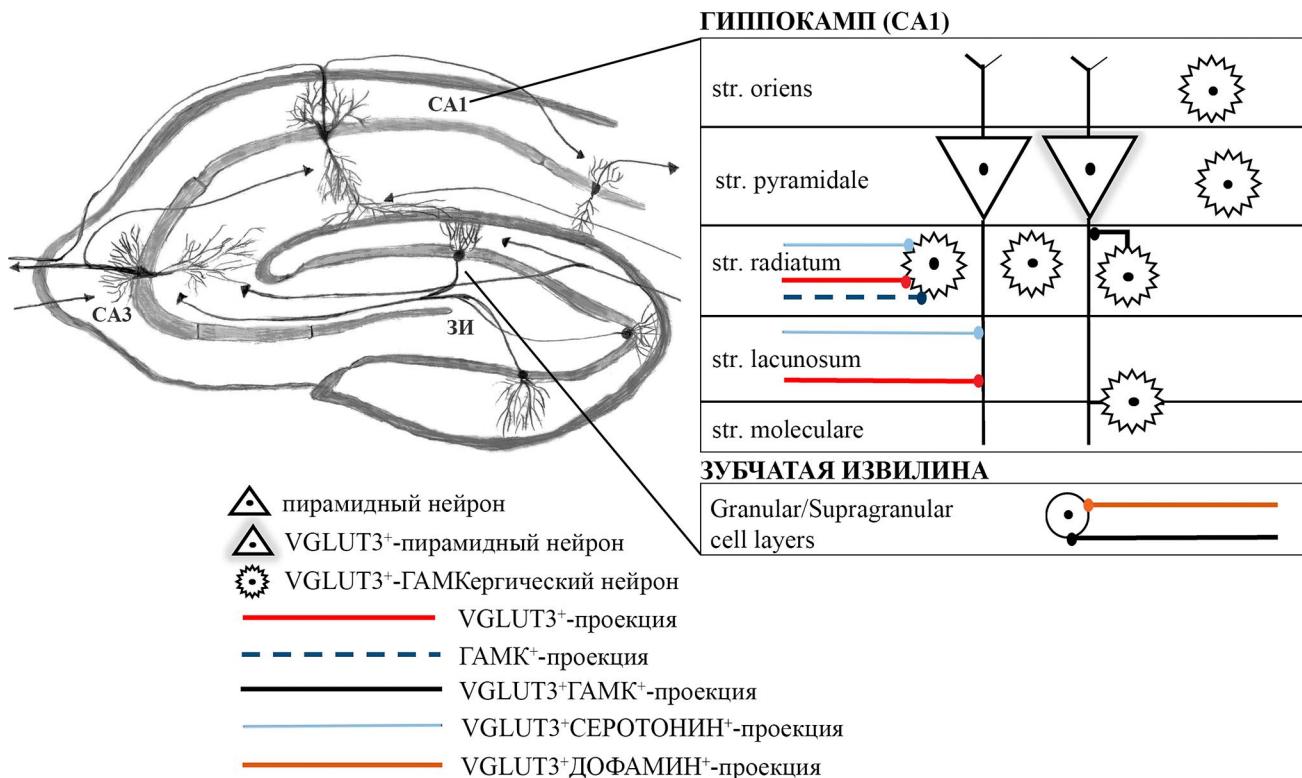
Известно, что гиппокамп богат как локально продуцируемым глутаматом, так и VGLUT3-положительными (VGLUT3<sup>+</sup>) аfferентами [13, 14]. При этом VGLUT3<sup>+</sup>-синапсы, образуемые аfferентными волокнами, образуются как на телах пирамидных клеток, так и на их дендритах [13, 15–17].

**Колокализация глутамата и ГАМК в нейронах гиппокампа.** Известно, что GAD-положительные (т.е. ГАМКергические) нейроны гиппокампа (интернейроны) также экспрессируют VGLUT3; это свидетельствует о том, что они могут высвобождать глутамат [13, 15–18]. В работе Stensrud et al. [13], проведенной на уровне электронной микроскопии при использовании иммуноголд-окрашивания, было обнаружено, что у мышей и крыс в гиппокампе окончания ГАМК-

ергических волокон содержат маркеры как VGAT, так и VGLUT3. Иммуноизоляция синаптических пузырьков подтвердила эти данные и показала везикулярную колокализацию VGLUT3 и VGAT.

В этой, а также в других работах выявлено, что VGLUT3 часто обнаруживается в симметричных (т.е. тормозных) нервных окончаниях [11, 13, 17, 18]; это подтверждает, что тормозные интернейроны, кроме ГАМК, выделяют также глутамат. Так, известный тип интернейронов, корзинчатые клетки, экспрессирующие, кроме ГАМК, нейропептид холецистокинин, содержат VGLUT3 в своих синаптических окончаниях [11, 18]; их обозначают как CCK<sup>+</sup>VGLUT3<sup>+</sup>-клетки [18]. Такие интернейроны обнаружены в полях CA1 и CA3 гиппокампа, а также в зубчатой извилине гиппокампальной формации (см. ниже). Чаще всего тормозные интернейроны, выделяющие глутамат, располагаются в stratum radiatum областей CA1 и CA3, реже они находятся в пирамидном слое и слоях oriens, lacunosum-moleculare и lucidum. В зубчатой извилине такие интернейроны локализуются в субгранулярной зоне, а также в хилусе [11, 13, 19]. По своим мишням VGLUT3-положительные тормозные нейроны гиппокампа довольно гетерогенны [20]; воздействуя главным образом на пирамидные клетки гиппокампа, они также иннервируют некоторые интернейроны и основные клетки зубчатой извилины [11, 13, 20, 21] (рис. 2; табл. 1). Эффекты этих интернейронов преимущественно тормозные; однако в определенных условиях возбуждающее глутаматергическое действие может доминировать над тормозным, при этом оно осуществляется через ионотропные рецепторы [13, 20].

Кроме ГАМК, в гиппокампе присутствует еще один тормозный медиатор, глицин. Хотя глицин является тормозным нейротрансмиттером в ЦНС млекопитающих, он также может играть ключевую роль в возбуждающей нейротрансмиссии в качестве коагониста глутамата при действии на NMDA-рецепторы [22]. В недавней работе на мышах [23] изучалось опосредованное транспортером взаимодействие между глицином и глутаматом и определялось существование в гиппокампальных нервных терминалях транспортеров глицина и глутамата. В качестве экспериментальной модели использовались очищенные нервные терминали (синаптосомы), проанализированные на ультраструктурном уровне. Обнаружено: (1) экзогенный глицин стимулировал высвобождение [<sup>3</sup>H]D-аспартата, частично за счет активации транспортера VGLUT1 и частично через VGLUT2; (2) D-аспартат стимулировал высвобождение [<sup>3</sup>H]-глицина посредством процесса, чувствительного к блокаторам транспортера глутамата (см. работу Cortese et al. [23]).



**Рис. 2.** Схематическое представление нейронов и аксонов в области СА1 гиппокампа и дорзальной зубчатой извилины, выявляющих колокализацию нейротрансмиттеров. Локальные ГАМКергические холецисто-кинин-положительные интернейроны экспрессируют, кроме ГАМК, также VGLUT3; эти нейроны наиболее многочисленны в stratum radiatum и посылают аксоны к пирамидным клеткам. VGLUT3<sup>+</sup>-афференты, выявленные с помощью *in situ* гибридизации и иммуногистохимических экспериментов, в основном локализованы в stratum radiatum и stratum lacunosum и часто, но не исключительно, коэкспрессируют серотонинергические маркеры. От медианного ядра шва (мЯШ) к гиппокампу идут VGLUT3<sup>+</sup>серотонин<sup>+</sup>-афференты, а от вентральной тегментальной области (ВТО) – VGLUT3<sup>+</sup>дофамин<sup>+</sup>-проекции. Обозначения: СА1, СА3 – поля гиппокампа; ЗИ – зубчатая извилина; str. moleculare, str. lacunosum, str. pyramidale, str. oriens – клеточные слои в поле СА1 гиппокампа; granular и supra-granular cell layers – клеточные слои зубчатой извилины. Пояснения в тексте. Рисунок создан на основе анализа работ [11, 13, 21, 48, 62, 70, 76, 78, 79] и использует шаблоны Servier Medical Art (Servier), provided by Creative Commons Attribution 3.0 unported license

**Колокализация нейротрансмиттеров в афферентных системах гиппокампа. Зубчатая извилина (*dentate gyrus*).** Зубчатую извилину часто относят к гиппокампу, однако это особая, тесно связанная с гиппокампом структура, посылающая к нему афферентные волокна и составляющая вместе с ним гиппокампальную формацию. Основными элементами зубчатой извилины являются глутаматергические гранулярные нейроны, проецирующиеся посредством своих аксонов (мшитых волокон) на пирамидные клетки и интернейроны поля СА3. Гранулярные нейроны «рождаются» в течение всей жизни животных и человека, что демонстрирует способность зубчатой извилины к нейрогенезу (см. обзор Кичигиной и др. [24]).

В конце прошлого и начале этого века в зубчатой извилине развивающихся крыс (до конца третьей недели) в гранулярных нейронах и/или в образуемых мшитыми волокнами «гигантских синапсах» была обнаружена колокализация глута-

мата и ГАМК [25–29]. Это же было обнаружено в некоторых работах на материале, взятом из нормальных взрослых животных и людей [30–32]. Обнаружен также высокий уровень экспрессии мРНК везикулярного транспортера ГАМК (VGAT) в гранулярных клетках зубчатой извилины у развивающихся [26, 31, 33] и взрослых крыс [32]. Однако в некоторых работах белок-транспортер в мшитых волокнах не обнаруживался [34, 35]. Этот факт и то, что отдельные нейроны, содержащие ГАМК, не содержат VGAT [34], свидетельствовали о существовании еще не идентифицированного транспортера ГАМК [33]. Было также продемонстрировано, что для полной экспрессии ГАМКергического фенотипа в гранулярных клетках требуется приток кальция, вызванный активацией глутаматного рецептора и нейротрофина, а также синтез белка [33].

Интересные результаты в аспекте колокализации глутамата и ГАМК в гиппокампальной системе были получены Galván и Gutiérrez [36].

**Таблица 1.** Суммарные данные о колокализации нейротрансмиттеров в гиппокампе и афферентных структурах

Трансмиттеры	Гиппокамп	ЗИ	СУМ	ВТО
Глутамат + ГАМК	ГАМКергические интернейроны, кроме VGAT, также экспрессируют VGLUT3 [13, 15–18]	у развивающихся крыс в гранулярных нейронах присутствуют глутамат и ГАМК [25–29]; у взрослых особей это выявляется после судорожных приступов [26, 27, 40–42]	нейроны латеральной части (СУМЛ) демонстрируют маркеры двойного фенотипа: VGLUT2, VGAT и GAD65 [77–79]	около 20% нейронов экспрессируют GAD, VGAT и VGLUT2 [79]
Глутамат + серотонин	МЯШ	серотонин-содержащие клетки выявляют VGLUT3 [63–68]; около 50% таких клеток экспрессируют мРНК VGLUT3 [65, 71, 72]		
Глутамат + дофамин	ВТО	относительно высокое количество дофаминергических нейронов содержит мРНК VGLUT2 [97, 98]		
Глутамат + норадреналин	голубое пятно	часть норадреналин-содержащих нейронов демонстрирует экспрессию VGLUT2 [102, 103]		
ГАМК + ацетилхолин	МСДБ и БМ	мРНК GAD67 и мРНК ChAT выявлены в 24% нейронов МСДБ [51] и в 25% клеток БМ [53–55]		
Ацетилхолин + глутамат	МСДБ	ограниченное число холинергических нейронов МСДБ коэкспрессирует VGLUT3 [13, 57]		

Примечание. Используемые сокращения: БМ – базальное ядро Мейнера; ВТО – центральная тегментальная область; ЗИ – зубчатая извилина; МСДБ – комплекс медиального септального ядра и ядра диагонального пучка Брука; СУМ – супрамамиллярное ядро.

У развивающихся крыс было проанализировано возникновение и пластичность одновременной глутаматергической–ГАМКергической сигнализации в системе мицестные волокна–интернейроны поля CA3 гиппокампа. В этой работе регистрировались моносинаптические ответы, вызванные стимуляцией мицестных волокон, опосредованные глутаматным и ГАМКергическим рецепторами [36]. Многие интернейроны в stratum lucidum и stratum radiatum демонстрировали оба типа ответа, т.е. получали оба сигнала (при этом ГАМКергический сигнал подавлялся активацией метаботропных глутаматных рецепторов); в то же время интернейроны в stratum lacunosum-moleculare обнаруживали исключительно глутаматергический ответ. Примечательно, что, в то время как глутаматергические ответы подвергались долговременной депрессии, одновременно регистрируемые ГАМКергические ответы интернейронов в слое lucidum (но не radiatum) демонстрировали долговременную потенциацию. Таким образом, в данной работе показан особый тип трансмиттерной колокализации, при которой наблюдается «компартментализированное» (сегрегированное или раздельное) выделение глутамата и/или ГАМК из разных окончаний волокон в одном и том же пути и дифференциальная пластичность гранулярных клеток в зависимости от типа интернейронов, на которые они проецируются [36].

В серии экспериментов с двойным иммунофлуоресцентным окрашиванием фиксированных срезов гиппокампа от грызунов было продемонстрировано, что в норме окончания аксонов гранулярных клеток (мицестных волокон) у зрелых крыс одновременно не выявляют маркеры глутаматергических и ГАМКергических синапсов [37, 38]. Аналогично в экспериментах с избирательной стимуляцией идентифицированных одиночных гигантских синапсов, образуемых мицестными волокнами на апикальных дендритах диссоциированных пирамидных нейронов поля CA3, у взрослых крыс возникали реакции, опосредованные только глутаматными рецепторами [29] (см. также обзор Gutiérrez [39]); напротив, при стимуляции мицестных волокон у развивающихся крыс были зарегистрированы синаптические токи, опосредованные одновременно глутаматными и ГАМК-рецепторами.

Ситуация осложняется тем, что у взрослых особей в зубчатой извилине постоянно появляются новые гранулярные клетки [7]; поэтому возможно, что совместный выброс глутамата и ГАМК, обнаруженный у взрослых особей [30–32], происходит из незрелых гранулярных нейронов.

Интересно, что, в отличие от нормального мозга, после судорожных приступов у взрослых особей маркеры глутаматергического и ГАМКергического фенотипов гранулярных клеток/

синапсов мицстых волокон четко совпадали во времени [26, 27, 40–42] (табл. 1). Подчеркивается также, что выделение ГАМК из мицстых волокон значительно усиливается эпилептической активностью [41–43]. В работе Treviño и Gutiérrez [42], где изучалось ГАМКергическое влияние гранулярных клеток зубчатой извилины на нейроны поля СА3 гиппокампа после судорожных приступов, показано, что высвобождаемая из мицстых волокон ГАМК в этих случаях действует на пре- и постсинаптические участки нейронов, воздействуя на активность гиппокампа на сетевом уровне. В другом исследовании [44] обнаружено, что после генерализованных судорог в синапсах, образуемых глутаматергическими мицстыми волокнами, не только возникает ГАМКергический сигнал, но при блокаде ионотропных рецепторов ГАМК и глутамата в пирамидных клетках и интернейронах поля СА3 гиппокампа также выявляется M1-холинергический деполяризующий сигнал, который постсинаптически модулирует глутаматергическую и ГАМКергическую быструю нейротрансмиссию. В отличие от холинергических ответов, обычно вызываемых активацией ассоциативных/комиссулярных волокон в гиппокампе, холинергические ответы на стимуляцию зубчатой извилины наблюдались только после эпилептических приступов и подавлялись активацией глутаматных рецепторов второго типа; в то же время оба вида ответов подавлялись активацией M2-холинергических рецепторов. С помощью иммуногистологических экспериментов было показано, что холинергический путь в гиппокампе проходит параллельно мицстым волокнам. Авторы приходят к заключению, что в гиппокампальной формации существует сложное взаимодействие различных нейротрансмиттеров для поддержания тонкого баланса возбуждения и торможения, обеспечивающего ее оптимальное функционирование. В частности, торможение глутаматергических мицстых волокон оказывает общее ингибирующее действие на поле СА3 гиппокампа, а нарушение этого баланса может привести к возникновению судорожного приступа [44].

**Медиальный септальный комплекс (медиальное септальное ядро и ядро диагонального пучка Брука, МСДБ) (medial septal-diagonal band complex, MSDB).** МСДБ является ядерной структурой, стоящей на входе в гиппокамп со стороны ствола мозга. Она играет важную роль в модуляции активности гиппокампа, являясь пейсмекером генерируемых в нем тета-осцилляций [45–48]. В МСДБ обнаружено три типа клеток: холинергические, ГАМКергические и глутаматергические; аксоны нейронов всех этих типов образуют пути, идущие к гиппокампу [49–52]. Впервые колокализация двух основных нейромедиаторов,

а именно ацетилхолина и ГАМК, была выявлена в проецирующихся к гиппокампу клетках МСДБ в 2003 г. [51]. Авторы обнаружили в этих нейронах мРНК декарбоксилазы 67 глутаминовой кислоты (GAD67), которая иногда локализовалась совместно с мРНК холин-ацетилтрансферазы (ChAT). Нейроны, одновременно выявляющие GAD67 и ChAT, составляли 24% от всего клеточного состава МСДБ. Результаты, демонстрирующие колокализацию ацетилхолина и ГАМК, подтвердили данные более ранних экспериментов, проведенных на диссоциированной клеточной культуре МСДБ и/или базального ядра Мейнерта, где была выявлена колокализация мРНК ChAT и GAD67 у 25% нейронов [53–55] (табл. 1). Примерно у такого же числа нейронов МСДБ обнаружена способность одновременно синтезировать и выделять два других трансмиттера, а именно: ацетилхолин и глутамат. Это было выявлено в клеточной культуре МСДБ при использовании электрофизиологического метода с фармакологической идентификацией высвобождающихся нейротрансмиттеров [56]. Интересно, что способность к одновременному выбросу этих двух трансмиттеров возрастала при использовании нейроростостого фактора (NGF): после его воздействия количество нейронов, выделяющих оба медиатора, ацетилхолин и глутамат, возрастало с 29% до 48%. Колокализация этих двух основных нейромедиаторов в нейронах МСДБ подтверждалась позднее, когда было выявлено, что ограниченное число холинергических нейронов этой структуры коэкспрессирует VGLUT3 [13, 57] (табл. 1). Все эти данные свидетельствуют о том, что нейроны МСДБ, составляющие часть переднебазальной области мозга и проецирующиеся к гиппокампу, обладают молекулярной способностью для совместного выделения нескольких передатчиков.

**Ядра шва.** Ядра шва являются главным источником серотонинергических путей к гиппокампу; медианное ядро шва (мяШ) и дорзальное ядро шва (дяШ) проецируются к полям СА1 и СА3 гиппокампа, а также к зубчатой извилине. Основной афферентный путь от мяШ идет к дорзальной части гиппокампальной формации [58, 59], а дяШ проецируется кентральному гиппокампу и формирует значительно менее существенные проекции [60, 61].

**Медианное ядро шва (median raphe nucleus)** известно своим содержанием серотонина, маркером которого является транспортер серотонина (SERT). Анатомические данные показывают, что проекции мяШ образуют классические синапсы на ГАМКергических интернейронах в гиппокампе [62], потенциально обеспечивая субстрат для быстрой нейромодуляции гиппокампальной сети.

Кроме серотонина в клетках этого ядра может содержаться глутамат [15, 63–69]. Об этом свидетельствуют данные, показавшие, что в нейронах мЯШ (и/или в их аксонах), наряду с SERT, присутствует VGLUT3 [63–68], а также факты, полученные в анатомических и электрофизиологических исследованиях [66, 69]. Интересно, что при этом маркеры SERT<sup>+</sup> и VGLUT3<sup>+</sup> часто коэкспрессируются, но могут встречаться и по отдельности [15, 63–67]. Хотя в первоначальных исследованиях предполагалось, что большинство серотонинергических нейронов дорсального и медианного ядер шва экспрессируют мРНК VGLUT3 [63, 70], последующие работы показали, что только около 50% клеток экспрессируют мРНК VGLUT3 [65, 71, 72] (табл. 1). Исходя из этого, некоторые авторы считают, что многие популяции нейронов в мозге используют глутамат в дополнение к своему «основному» нейротрансмиттеру [5]. В некоторых работах [67, 68] было показано, что большинство варикозных узлов вдоль стволов аксонов, идущих к гиппокампу от нейронов мЯШ, экспрессируют маркеры как SERT, так и VGLUT3, но в других исследованиях [65] были показаны противоположные результаты: в гиппокампе в одном и том же варикозном расширении эти два маркера (SERT и VGLUT3) одновременно практически не экспрессировались. Пока не известно, являются ли эти противоречия результатом различий применяемых методов, или же это представляет собой физиологически важное наблюдение, связанное с функциональным состоянием нейронов.

В нейронах мЯШ, наряду с SERT и глутаматом, была обнаружена также и ГАМК [71, 72]. Что касается возможности колокализации серотонина и ГАМК в проекционных путях от мЯШ к гиппокампу, существуют работы, подтверждающие [21] и опровергающие это предположение [20, 73], т.е. этот вопрос остается открытым.

**Супрамамиллярное ядро (СУМ) (*supramammillary nucleus*).** СУМ представляет собой тонкую структуру, лежащую над мамиллярными телами в гипоталамусе; это ядро посыпает к гиппокамповому формации существенные проекции. СУМ состоит из нескольких популяций клеток, которые различаются по нейрохимическому составу и специфиности связей. Нейроны СУМ посыпают свои аксоны к полю СА2/СА3а дорсального иентрального гиппокампа, а также к зубчатой извилине (см. обзоры Pan и McNaughton [74], Vertes и Kocsis [75]). На клеточном уровне было обнаружено, что нейроны латеральной части СУМ (СУМЛ) являются особенной популяцией. Они интенсивно иннервируют супрагранулярный слой дорсальной зубчатой извилины, повышая активность этой части гранулярных нейронов, и в меньшей степени проецируются к вентральной зубчатой из-

вилине [76]. При этом нейроны СУМЛ демонстрируют маркеры двойного фенотипа: VGLUT2, VGAT и GAD65, т.е. одновременно способны высвобождать глутамат и ГАМК [77–79] (табл. 1). Существуют морфологические подтверждения двойного действия СУМЛ на нейроны зубчатой извилины у крыс и мышей: они устанавливают асимметричные (предположительно, возбуждающие) и симметричные (предположительно, тормозные) контакты на разных нейронах этой структуры [76, 78, 79] (см. рис. 1). В работе Billwiller et al. [76] также было показано, что один аксонный бутон, образуемый нейроном СУМЛ, может формировать асимметричный синапс на одних гранулярных клетках и симметричный синапс – на других. При этом стимуляция окончаний аксонов нейронов СУМЛ, иннервирующих дорсальную зубчатую извилину, индуцирует котрансмиссию ГАМК и глутамата почти на всех гранулярных клетках [76, 80, 81].

Важно, что СУМ контролирует гиппокампальный тета-ритм [75, 82, 83] и участвует в обучении и формировании эмоциональной памяти [74, 84–88]. Недавнее исследование, упомянутое выше [76], показало, что во время быстрого (REM) сна у мышей мощность тета- и гамма-ритмов в зубчатой извилине может увеличиваться под влиянием оптогенетической стимуляции СУМЛ. Кроме того, во время медленноволнового сна активация пути СУМЛ–зубчатая извилина вызывает пробуждение мышей, переключение с дельта- на тета-активность и увеличение мощности гамма-осцилляций. Таким образом, супрамамиллярные нейроны, колокализующие ГАМК и глутамат, могут участвовать в контроле тета- и гамма-осцилляций в зубчатой извилине во время быстрого и медленноволнового сна, способствуя осуществлению таких когнитивных функций, как обучение и память.

**Вентральная тегментальная область (ВТО) (*ventral tegmental area*).** ВТО или А10 является основным источником дофамина в вентральном гиппокампе. Применение иммунохимических методов и флуоресцентной гистохимии показало, что дофаминергические аксоны распределяются в зубчатой извилине и, в меньшей степени, в поле СА1 гиппокампа крыс; незначительное количество волокон обнаружено также в поле СА3 [89]. У обезьян плотность дофаминергических волокон умеренна и диффузна по всему гиппокампу [90]. Многочисленные работы с использованием электрофизиологических и оптогенетических методов показали, что во многих случаях дофамин-продуцирующие нейроны высвобождают также глутамат [91–94] и ацетилхолин [95, 96]. Исследование распределения мРНК VGLUT2 в ВТО выявило относительно высокое количество дофаминерги-

ческих нейронов, содержащих мРНК VGLUT2, в ростро-медиальной области ВТО [97, 98]. В недавней работе было обнаружено, что нейроны ВТО, содержащие VGLUT2 (т.е. выделяющие глутамат), выявляют также ГАМКергические маркеры, GAD и VGAT [79]; при этом было обнаружено, что в ВТО содержится более 20% нейронов, имеющих такой фенотип (табл. 1).

**Голубое пятно (*locus coeruleus*).** Голубое пятно – это небольшое ядро, расположенное глубоко в стволе мозга, которое является основным источником норадреналина для гиппокампа [99–101]. В целом паттерн норадренергической иннервации одинаков на всех септо-темпоральных уровнях гиппокампальной формации; самые плотные сплетения обнаружены в хилусе зубчатой извилины, str. lacunosum CA3, str. moleculare всего гиппокампа и субикулуме [99]. Часть содержащих норадреналин нейронов демонстрируют глутаматергический фенотип и экспрессию VGLUT2 [102, 103] (табл. 1). При этом зависящие от активности голубого пятна концентрации норадреналина локально модулируются в структуре-мишени за счет выделяемого глутамата; осуществляемые при этом в гиппокампе пластические преобразования (потенциация или депрессия) зависят от локальных концентраций норадреналина [103]. Интересно, что нейроны голубого пятна могут выделять также дофамин [104–106]; при этом его высвобождение в гиппокампе зависит от изменения активности транспортера норадреналина, триггерируемого высокими уровнями локального глутамата, а также от активации NMDA-рецепторов на терминалах норадренергических нейронов [107, 108]. Возможность совместного высвобождения дофамина и норадреналина в присутствии высокого уровня локального глутамата в гиппокампе является важным механизмом, и его расшифровка может улучшить наше понимание влияния голубого пятна на пластические процессы в мозге и на разгадку природы внимания и памяти.

**Возможное функциональное значение колокализации медиаторов в гиппокампе.** Умозрительно можно предположить, что клетки с двумя или несколькими передатчиками могут способствовать снижению метаболических затрат и ошибок сигнализации, а также повышают информационные возможности нейронных сетей и обеспечивают точность и гибкость их работы.

При исследовании вопроса о том, каковы функции совместного высвобождения глутамата и ГАМК в гиппокампальной формации, интересно рассмотреть следующие экспериментальные факты: при стимуляции внутренних систем связей от зубчатой извилины к полю САЗ гиппокампа (при слегка надпороговых токах) чаще всего наблю-

далась тормозная реакция и лишь при дальнейшем повышении интенсивности тока возникал нейронный разряд [109]. Учитывая возможность совместного высвобождения глутамата и ГАМК из мицеллярных волокон в зубчатой извилине [32, 110], это явление можно объяснить следующим образом: при слабых сигналах синапс, в который выбрасываются два указанных медиатора, «работает» как чисто ГАМКергический, а при их усиливении – и как глутаматергический. Анализ внеклеточных ответов нейронов гиппокампа и связанных с ним структур показывает, что начальная фаза, часто рассматриваемая как латентный период, в действительности при соотнесении с предшествующей спонтанной активностью включает краткий тормозной «брос» (reset). Этим может достигаться значительное повышение отношения сигнал/шум и синхронизация ответов, улучшающие воздействие слабых сигналов [46, 111]. При отсутствии тормозного «броса» отношение сигнал/шум резко снижается, часто до нуля, и реакции в гиппокампе блокируются [47, 112]. Аналогичные факты были получены при активации волокон перфорантного пути и регистрации ответов в зубчатой извилине и поле СА1 гиппокампа [113]. Кроме гиппокампа значение эффекта тормозного «броса», или «обнуления», показано в соответствующих системах как при обработке сигналов, так и при подготовке к движению [114, 115]. Что касается механизма этих событий, экспериментальные данные и компьютерное моделирование показывают, что торможение в течение нескольких миллисекунд в непосредственной близости от возбуждающихся глутаматных рецепторов эффективно снижает амплитуду постсинаптического кальциевого ответа [116–118]; при этом также может быть повышена пространственная специфичность динамики кальция [118]. Недавно было также обнаружено, что в соматостатин-положительных интернейронах гиппокампа приток кальция через NMDA-рецепторы избирательно усиливает торможение со стороны подмножества тормозных синапсов (см. статью Chiu et al. [117]). Кроме того, VGLUT, экспрессируемый в окончаниях аксонов, может приводить к усиленному поглощению ГАМК в синаптические пузырьки (везикулярная синергия) [32, 119], тем самым увеличивая высвобождение ГАМК. Более того, совместное воздействие на глутаматные и ГАМК-рецепторы в постсинапсе может обеспечивать быструю и более целенаправленную форму короткого торможения [4].

Кроме собственно гиппокампа, еще одной структурой, где можно проследить действие медиаторов противоположной направленности, выделяющихся при одном и том же стимуле и имеющих одну мишень, является зубчатая

извилины, относящаяся к гиппокампальной формации. Действительно, гранулярные клетки и их аксоны (мшитые волокна) регулируемым образом экспрессируют все маркеры обоих фенотипов: глутамат и ГАМК, а также GAD, VGLUT и VGAT; их активация вызывает в постсинаптических клетках-мишенях синаптические ответы, опосредованные как глутаматергическими, так и ГАМКергическими рецепторами. Отмечалось, что динамика экспрессии фенотипа нейротрансмиттера в гранулярных клетках следующая: изначально ГАМКергическая, затем двойная глутаматергическая–ГАМКергическая, затем только глутаматергическая, но после периода повышенной возбудимости она может временно стать глутаматергической–ГАМКергической (см. обзор Gutierrez [27]). Экспрессия этих фенотипов, зависящая от деятельности мозга, в которой задействована зубчатая извилина, по-видимому, участвует в поддержании баланса возбуждения и торможения в контактах между зубчатой извилиной и полем CA3 (см. обзор Gutierrez [39]).

С другой стороны, активность клеток зубчатой извилины модулируется нейронами СУМЛ также посредством высвобождения глутамата и ГАМК [77, 79]. В работе Ajibola et al. [120] на мышах при использовании оптогенетических, электрофизиологических и фармакологических подходов продемонстрировано, что СУМЛ дифференциально регулирует активность разных нейронов зубчатой извилины посредством различных синаптических механизмов. Хотя активация СУМЛ приводит к синаптическому возбуждению и торможению всех постсинаптических клеток, соотношение этих двух воздействий вариабельно и зависит от типа клетки. В частности, те интернейроны в зубчатой извилине, которые получают проекции на дендриты, испытывают преимущественно синаптическое возбуждение, тогда как другие интернейроны, которые получают проекции на soma, а также гранулярные клетки лишь снижают латентный период ответов на возбуждающие импульсы и повышают точность срабатывания. Кроме того, возбуждение СУМЛ усиливает выход глутамата из гранулярных нейронов в ответ на корковые входные сигналы, тем самым способствуя индукции долговременной потенциации в синапсах от неокортика к гранулярным нейронам. В совокупности эти данные свидетельствуют о важном физиологическом значении котрансмиссии глутамата и ГАМК нейронами СУМЛ для функционирования сети зубчатой извилины [120].

Относительно роли котрансмиссии в генерации тета-ритма в гиппокампе (что необходимо для обработки информации, обучения и запоминания [45]), предполагается, что ГАМКергические

клетки МСДБ, физически воздействуя на холинергические нейроны этой структуры посредством ГАМК-рецепторов, вовлекают большую популяцию септальных нейронов в синхронную активность [45]. Учитывая, что к гиппокампу проецируются также глутаматергические нейроны МСДБ [51, 52], а часть холинергических нейронов этой структуры коэкспрессирует VGLUT3 [13, 57], можно полагать, что выделяющийся из септальных нейронов глутамат играет существенную роль в генерации гиппокампального тета-ритма.

Кроме гиппокампа и зубчатой извилины, структурой, где могут работать два нейротрансмиттера противоположного действия, выделяющиеся при одном и том же стимуле и имеющие одну мишень, является МЯШ, где такими медиаторами являются глутамат и серотонин. Глутамат в МЯШ высвобождается из VGLUT3<sup>+</sup>-везикул тех клеток, в которых он является основным нейротрансмиттером; однако этот медиатор обнаруживается и в серотонинергических нейронах, а также – в небольшом проценте – в ГАМКергических клетках [21, 71, 72]. В отличие от медленного модуляторного эффекта, обычно связываемого с восходящими системами, электрическая стимуляция этого ядра или пути от МЯШ вызывает быструю и надежную модуляцию сетевой активности гиппокампа, МСДБ и других нижележащих структур [75, 121, 122]. В гиппокампе это осуществляется классическими синапсами, образуемыми клетками МЯШ на ГАМКергических интернейронах, потенциально обеспечивающих субстрат для быстрой нейромодуляции гиппокампальной сети [16]. Таким образом, демонстрация быстрой синаптической активации интернейронов гиппокампа с помощью МЯШ-афферентов посредством совместной передачи глутамата и серотонина показывает, что представление о подкорковом контроле кортикальной активности как медленной и диффузной модуляции, зависящей от состояния [123, 124], теперь дополняется сведениями о способности субкортикальных афферентов осуществлять синаптические влияния с высоким времененным и пространственным разрешением [125–127]. Это, вероятно, способствует быстрому формированию и выбору определенных локальных представлений или способов обработки информации в гиппокампе [128, 129]. Предполагалось, что это может осуществляться за счет быстрых изменений относительного вклада различных классов интернейронов гиппокампа в ритмическую популяционную активность [130, 131]. Это предположение подтверждается другими, в частности, более поздними работами [20, 21, 132, 133].

Известно, что различные типы тормозных интернейронов гиппокампа специализируются на иннервации определенных классов пирамидных

клеток и, внутри них, различных субклеточных компартментов (в частности, специфических частей дендритов) [132, 133]. Одним из замечательных типов интернейронов в гиппокампе являются «двойные» CCK-VGLUT3-положительные корзинчатые клетки, имеющие возможность посыпать сигналы как с помощью глутамата, так и ГАМК; кроме этого, они содержат пресинаптические каннабиноидные рецепторы типа 1 (CB1R), что указывает на их тесные двунаправленные взаимодействия с постсинаптическими пирамидными клетками. Функции этих нейронов детально исследованы проведенными одновременно работами двух групп авторов [18, 21]. Показано, что у мышей с отсутствием VGLUT3 в CCK<sup>+</sup>-нейронах (линия VGLUT3<sup>-/-</sup>) обнаруживается заметное увеличение ГАМКергической передачи к пирамидным клеткам поля CA1. Это свидетельствует о том, что торможение, осуществляемое ГАМКергическими CCK<sup>+</sup>-нейронами, является VGLUT3-зависимым [21]. В работе Del Pino et al. [18] выявлено, что при отсутствии рецептора тирозинкиназы ErbB4 во время развития животных (мышей) нарушается нормальная интеграция CCK-VGLUT3-положительных корзинчатых клеток в нейронные сети и снижается количество образуемых ими тормозных синапсов. Соответственно, уменьшается ингибирующее воздействие, которое они оказывают на пирамидные нейроны уже у взрослых животных. У таких мышей, а также при отсутствии у мышей VGLUT3 [21] наблюдалась сдвиг синаптической пластичности в системе коллатерали Шеффера-поле CA1 и нарушение тета-осцилляций [18, 21]. Показано также, что снижение количества синаптических контактов, образуемых корзинчатыми CCK-VGLUT3-положительными интернейронами, нарушало пространственное кодирование клетками места гиппокампа. Так, в тестах распознавания расположения объекта и в водном лабиринте Морриса это вызвало избирательные изменения в пространственном обучении и памяти [18]. Эти результаты свидетельствуют о том, что нормальная интеграция VGLUT3<sup>+</sup> ГАМКергических корзинчатых клеток в нейронные сети является ключом к поддержанию регулируемого тета-осцилляциями пространственного кодирования клетками места в гиппокампе.

**Значение котрансмиссии в обучении и памяти.** Некоторые исследования выявили участие колокализующихся нейромедиаторов, включая глутамат, ГАМК, ацетилхолин и серотонин, в формировании контекстуальной памяти на страхе [134–138]. Известно, что субпопуляции нейронов и волокон гиппокампа, миндалины и префронтальной коры, высвобождающие более одного нейромедиатора [5, 119], при выработке реакции, сопровождаемой чувством страха, экспрессируют

атипичный везикулярный транспортер глутамата типа 3, VGLUT3 [21, 139–142]. Несколько исследований показали, что отсутствие данного транспортера в нейронах приводило к блокаде глутаматергических токов, опосредованных мускариновыми глутаматными рецепторами в гиппокампе [21], тогда как другие показали блокаду глутаматергических ионотропных токов [126]. Интересно, что мыши VGLUT3<sup>-/-</sup> демонстрируют стойкую гиперреактивность на стресс [139] и нарушение регуляции гипotalамо-гипофизарной системы [143]. Несколько исследований показали, что мыши с дефицитом VGLUT3 имеют более сильную контекстуальную память на страх и склонны «переносить» выработанный в определенной ситуации страх на другие ситуации (так называемое обобщение) [143] без других серьезных нарушений памяти [144].

В работе Fasekcas et al. [144] проверялась гипотеза о том, что дефицит везикулярного транспортера глутамата 3 (VGLUT3) связан с когнитивными нарушениями. Самцы мышей с генетическим нокаутом VGLUT3 (КО) и мышей дикого типа (ДТ) были подвергнуты серии поведенческих тестов, основанных на спонтанном исследовательском поведении, а также на подкреплении. Для проверки когнитивной гибкости было использовано обратное обучение. КО-мыши продемонстрировали определенную способность к обучению; так, память социального узнавания у таких мышей была нетронутой. Тест в Y-образном лабиринте выявил более слабую рабочую память у КО-мышей, но и здесь серьезных нарушений в обучении не наблюдалось. В парадигме оперантного обусловливания или дискриминации также не было серьезных нарушений в обучении. В тестах на обучение, основанных на избегании (водный лабиринт Морриса и активное избегание), КО-мыши демонстрировали более медленный процесс обучения по сравнению с ДТ-мышами, но не полное нарушение обучаемости. В тестах, основанных на простых ассоциациях (оперантное обусловливание, обучение избеганию), у КО-мышей наблюдалось ослабление когнитивной гибкости. Таким образом, генетический нокаут VGLUT3 приводит к легким нарушениям рабочей памяти и гибкости обучения. Авторы делают вывод, что этот переносчик глутамата не является основным игроком в обучении и формировании памяти в целом. Отмечается, что необходимы дальнейшие изыскания для выявления роли локальных VGLUT3-положительных нейронов и их терминалей в процессах, необходимых для разных типов декларативной памяти [144].

Имеющиеся данные о функциональной роли колокализации нейротрансмиттеров суммированы в табл. 2.

**Таблица 2.** Функциональная роль колокализации медиаторов в гиппокампе и афферентных структурах

Трансмиттеры	Функциональное значение
Глутамат + ГАМК	повышение отношения сигнал/шум и синхронизация ответов, улучшающих воздействие слабых сигналов [46, 109, 111]; обеспечение синаптической пластичности, генерации тета-осцилляций в гиппокампе, улучшение пространственного обучения и памяти [18, 21]; поддержание баланса возбуждения и торможения в системе ЗИ-поле САЗ гиппокампа [39]; индукция долговременной потенциации в пути от неокортекса к гранулярным нейронам ЗИ [120]
Глутамат + серотонин	быстрая и надежная модуляция сетевой активности гиппокампа, МСДБ и других структур переднего мозга [75, 121, 122]; поддержание синаптических влияний с высоким временным и пространственным разрешением в системе МЯШ-гиппокамп [125–127]; улучшение пространственного кодирования клетками места в гиппокампе [18], обработки информации в целом [128, 129]
Глутамат + дофамин	обеспечение обучения на основе вознаграждения (оперантное обусловливание с участием ВТО) [144]; улучшение гибкости обучения и формирования рабочей памяти [144]
Глутамат + норадреналин	регуляция пластических преобразований в гиппокампе (потенциации или депрессии) локальными концентрациями норадреналина [103]
ГАМК + ацетилхолин	обеспечение механизма генерации тета-ритма в гиппокампе, участвующего в обработке информации, обучении и памяти [45]

Примечание. Используемые сокращения: ВТО – вентральная тегментальная область; ЗИ – зубчатая извилина; МСДБ – комплекс медиального септального ядра и ядра диагонального пучка Брука; СУМ – супрамамиллярное ядро.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время известно, что нервная клетка может продуцировать и использовать для связи с другими нейронами несколько разных молекул, в том числе несколько классических медиаторов, которые могут оказывать на мишень противоположное действие. Колокализация нейротрансмиттеров в клетках гиппокампа и его афферентных системах, предположительно, повышает информационные возможности нейронных сетей, а также обеспечивает точность и гибкость их работы. Механизмы выделения колокализующихся трансмиттеров и их функциональная роль в работе гиппокампа пока окончательно не выяснены. Предполагается, что воздействие слабых сигналов, поступающих к гиппокампу, может усиливаться за счет выброса ГАМК и глутамата со строго определенными временными задержками, определяемыми генерируемым тета-ритмом. Как следствие, это может значительно повышать синхронизацию ответов основных нейронов и отношение сигнал/шум в нейронной сети. Предполагается также, что экспрессия разных медиаторных фенотипов в гиппокампе способствует быстрому выбору способов обработки информации, индукции долговременной потенциации и пространственному кодированию клетками места. Кроме этого, получены факты, указывающие, что

колокализация трансмиттеров может обеспечивать гибкость обучения и формирование рабочей памяти.

Важно, что колокализация нейромедиаторов в клетках гиппокампа и афферентных системах участвует в поддержании баланса возбуждения и торможения в отдельных его регионах, что необходимо для нормального функционирования всего мозга.

Некоторые вопросы остаются открытыми и должны быть решены, чтобы полностью понять функциональное значение совместного высвобождения нейротрансмиттеров из одних и тех же нейронов. Во-первых, хотя существуют факты, указывающие, что в мозге могут работать два медиатора противоположного действия, выделяющиеся при одном и том же стимуле и имеющие одну мишень, остается неизвестным, могут ли они одновременно влиять на один и тот же нейронный локус этой мишени. Есть и другие не до конца решенные вопросы. Используются ли оба передатчика для выполнения схожих или разных функций (оптогенетическая стимуляция не позволяет однозначно ответить на этот вопрос, поскольку она обычно вызывает высвобождение обоих передатчиков)? В том случае, если в активной зоне присутствуют отдельные популяции везикул (см. статью Root et al. [79]), направлены ли эти везикулы к различным местам высвобождения?

Содержит ли каждая синаптическая везикула только один или несколько классов транспортеров? Имеет ли место выборочный контроль выброса каждого нейротрансмиттера? Существование еще одного, не идентифицированного, транспортера ГАМК (кроме VGAT) (см. работу Gomez-Lira et al. [33]) также до сих пор не подтверждено, но и не опровергнуто.

Нет пока ответа и на вопрос о том, как система зубчатая извилины–поле CA3 гиппокампа взрослого мозга после судорожного приступа становится подобной таковой в развивающемся мозге. Существует ли изначально колокализация ГАМК и глутамата в гранулярных клетках зубчатой извилины и возможность их одновременного выделения из мицелльных волокон в зрелом мозге, которая явно реализуется лишь в постсудорожном периоде? Если это так, то благодаря какому тормозному контролю, существующему в норме, этот механизм подавляется?

На эти вопросы должны ответить будущие исследования с применением последних достижений

нейронауки (в частности, подходы, использующие оптогенетику в сочетании с микроскопией сверхвысокого разрешения и визуализацией пре- и постсинаптических белков (см., например, сравнительное исследование Dani et al. [145] и работу Chang et al. [146]). Решение данных проблем продвинет некоторые направления фундаментальной науки, а также поможет в терапии тех заболеваний, где обнаруживается нарушение баланса возбуждения и торможения, таких как эпилепсия, болезнь Альцгеймера и многих других.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00224-24-03.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Обзор написан с соблюдением этических норм, принятых РФ и международными организациями.

**Благодарность.** Автор благодарит Любовь Владимировну Шубину (ИТЭБ РАН) за помощь в оформлении статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dale, H. H. (1935) Pharmacology and nerve endings, *Proc. R. Soc. Med.*, **28**, 319-332, <https://doi.org/10.1136/bmj.2.3859.1161>.
- Nusbaum, M. P., Blitz, D. M., Swensen, A. M., Wood, D., and Marder, E. (2001) The roles of co-transmission in neural network modulation, *Trends Neurosci.*, **24**, 146-154, [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01723-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01723-9).
- Vaaga, C. E., Borisovska, M., and Westbrook, G. L. (2014) Dual-transmitter neurons: Functional implications of co-release and co-transmission, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **29**, 25-32, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.04.010>.
- Tritsch, N. X., Granger, A. J., and Sabatini, B. L. (2016) Mechanisms and functions of GABA co-release, *Nat. Rev. Neurosci.*, **17**, 139-45, <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.21>.
- Trudeau, L. E., and El Mestikawy, S. (2018) Glutamate cotransmission in cholinergic, GABAergic and monoamine systems: contrasts and commonalities, *Front. Neural. Circuits*, **12**, 113, <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00113>.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons, *Nature*, **407**, 189-194, <https://doi.org/10.1038/35025070>.
- Weston, M. C., Nehring, R. B., Wojcik, S. M., and Rosenmund, C. (2011) Interplay between VGLUT isoforms and endophilin A1 regulates neurotransmitter release and short-term plasticity, *Neuron*, **69**, 1147-1159, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.002>.
- Preobraschenski, J., Zander, J. F., Suzuki, T., Ahnert-Hilger, G., and Jahn, R. (2014) Vesicular glutamate transporters use flexible anion and cation binding sites for efficient accumulation of neurotransmitter, *Neuron*, **84**, 1287-1301, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.008>.
- Fremeau, R. T. Jr., Troyer, M. D., Pahner, I., Nygaard, G. O., Tran, C. H., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., and Edwards, R. H. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse, *Neuron*, **31**, 247-260, [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00344-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00344-0).
- Xu, J., Jo, A., DeVries, R. P., Deniz, S., Cherian, S., Sunmola, I., Song, X., Marshall, J. J., Gruner, K. A., Daigle, T. L., et al. (2022) Intersectional mapping of multi-transmitter neurons and other cell types in the brain, *Cell Rep.*, **40**, 111036, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111036>.
- Somogyi, J., Baude, A., Omori, Y., Shimizu, H., El Mestikawy, S., Fukaya, M., Shigemoto, R., Watanabe, M., and Somogyi, P. (2004) GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat, *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 552-569, <https://doi.org/10.1111/j.0953-816x.2003.03091.x>.
- Scimemi, A. (2014) Plasticity of GABA transporters: an unconventional route to shape inhibitory synaptic transmission, *Front. Cell Neurosci.*, **8**, 128, <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00128>.

13. Stensrud, M. J., Chaudhry, F. A., Leergaard, T. B., Bjaalie, J. G., and Gunderson, V. (2013) Vesicular glutamate transporter-3 in the rodent brain: vesicular colocalization with vesicular gamma-aminobutyric acid transporter, *J. Comp. Neurol.*, **521**, 3042-3056, <https://doi.org/10.1002/cne.23331>.
14. Szonyi, A., Zicho, K., Barth, A. M., Gonczi, R. T., Schlingloff, D., Torok, B., Sipos, E., Major, A., Bardoczi, Z., Sos, K. E., Gulyás, A. I., Varga, V., Zelena, D., Freund, T. F., and Nyiri, G. (2019) Median raphe controls acquisition of negative experience in the mouse, *Science*, **366**, 6469, <https://doi.org/10.1126/science.aay8746>.
15. Fremeau, R. T. Jr., Burman, J., Qureshi, T., Tran, C. H., Proctor, J., Johnson, J., Zhang, H., Sulzer, D., Copenhagen, D. R., Storm-Mathisen, J., Reimer, R. J., Chaudhry, F. A., and Edwards, R. H. (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14488-14493, <https://doi.org/10.1073/pnas.222546799>.
16. Schafer, M. K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E., and Erickson, J. D. (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons, *J. Biol. Chem.*, **277**, 50734-50748, <https://doi.org/10.1074/jbc.m206738200>.
17. Stensrud, M. J., Sogn, C. J., and Gunderson, V. (2015) Immunogold characteristics of VGLUT3-positive GABAergic nerve terminals suggest corelease of glutamate, *J. Comp. Neurol.*, **523**, 2698-2713, <https://doi.org/10.1002/cne.23811>.
18. Del Pino, I., Brotons-Mas, J. R., Marques-Smith, A., Marighetto, A., Frick, A., Marin, O., and Rico, B. (2017) Abnormal wiring of CCK<sup>+</sup> basket cells disrupts spatial information coding, *Nat. Neurosci.*, **20**, 784-792, <https://doi.org/10.1038/nn.4544>.
19. Klausberger, T., Marton, L. F., O'Neill, J., Huck, J. H. J., Dalezios, Y., Fuentealba, P., Suen, W. Y., Papp, E., Kaneko, T., Watanabe, M., Csicsvari, J., and Somogyi, P. (2005) Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations, *J. Neurosci.*, **25**, 9782-9793, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3269-05.2005>.
20. Pelkey, K. A., Calvignoni, D., Fang, C., Vargish, G., Ekins, T., Auville, K., Wester, J. C., Lai, M., Mackenzie-Gray Scott, C., Yuan, X., Hunt, S., Abebe, D., Xu, Q., Dimidschstein, J., Fishell, G., et al. (2020) Paradoxical network excitation by glutamate release from VGLUT3<sup>+</sup> GABAergic interneurons, *eLife*, **9**, e51996, <https://doi.org/10.7554/eLife.51996>.
21. Fasano, C., Rocchetti, J., Pietrajtis, K., Zander, J. F., Manseau, F., Sakae, D. Y., Marcus-Sells, M., Ramet, L., Morel, L. J., Carrel, D., Dumas, S., Bolte, S., Bernard, V., Vigneault, E., Goutagny, R., Ahnert-Hilger, G., Giros, B., Daumas, S., Williams, S., and El Mestikawy, S. (2017) Regulation of the hippocampal network by VGLUT3-positive CCK-GABAergic basket cells, *Front. Cell Neurosci.*, **11**, 140, <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00140>.
22. Johnson, J. W., and Ascher, P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons, *Nature*, **325**, 529-531, <https://doi.org/10.1038/325529a0>.
23. Cortese, K., Gagliani, M. C., and Raiteri, L. (2023) Interactions between glycine and glutamate through activation of their transporters in hippocampal nerve terminals, *Biomedicines*, **11**, 3152, <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123152>.
24. Кичигина В. Ф., Шубина Л. В., Попова И. Ю. (2022) Роль зубчатой извилины в осуществлении функций гиппокампа: здоровый мозг, *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова*, **72**, 317-342, <https://doi.org/10.31857/S0044467722030030>.
25. Ramirez, M., and Gutiérrez, R. (2001) Activity-dependent expression of GAD67 in the granule cells of the rat hippocampus, *Brain Res.*, **917**, 139-146, [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02794-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02794-9).
26. Gutiérrez, R. (2003) The GABAergic phenotype of the “glutamatergic” granule cells of the dentate gyrus, *Prog. Neurobiol.*, **71**, 337-358, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2003.11.004>.
27. Gutiérrez, R. (2005) The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells, *Trends Neurosci.*, **28**, 297-303, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.04.005>.
28. Safiulina, V. F., Fattorini, G., Conti, F., and Cherubini, E. (2006) GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal rat hippocampus, *J. Neurosci.*, **26**, 597-608, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4493-05.2006>.
29. Beltrán, J. Q., and Gutiérrez, R. (2012) Co-release of glutamate and GABA from single, identified mossy fibre giant boutons, *J. Physiol.*, **590**, 4789-4800, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.236372>.
30. Sloviter, R. S., Dichter, M. A., Rachinsky, T. L., Dean, E., Goodman, J. H., Sollas, A. L., and Martin, D. L. (1996) Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus, *J. Comp. Neurol.*, **373**, 593-618, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960930\)373:4<593::AID-CNE8>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960930)373:4<593::AID-CNE8>3.0.CO;2-X).
31. Bergersen, L., Ruiz, A., Bjaalie, J. G., Kullmann, D. M., and Gunderson, V. (2003) GABA and GABAA receptors at hippocampal mossy fibre synapses, *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 931-941, <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02828.x>.
32. Zander, J. F., Munster-Wandowski, A., Brunk, I., Pahner, I., Gomez-Lira, G., Heinemann, U., Gutiérrez, R., Laube, G., and Ahnert-Hilger, G. (2010) Synaptic and vesicular coexistence of VGLUT and VGAT in selected excitatory and inhibitory synapses, *J. Neurosci.*, **30**, 7634-7645, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0141-10.2010>.

33. Gomez-Lira, G., Lamas, M., Romo-Parra, H., and Gutierrez, R. (2005) Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells, *J. Neurosci.*, **25**, 6939-6946, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1674-05.2005>.
34. Chaudhry, F. A., Reimer, R., Bellocchio, E. E., Danbolt, N. C., Osen, K. K., Edwards, R. H., and Storm-Mathisen, J. (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons, *J. Neurosci.*, **18**, 9733-9750, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09733.1998>.
35. Sperk, G., Wieselthaler-Hölzl, A., Pirker, S., Tasan, R., Strasser, S. S., Drexel, M., Pifl, C., Marschalek, J., Ortler, M., Trinka, E., Heitmair-Wietzorrek, K., Ciofi, P., et al. (2012) Glutamate decarboxylase 67 is expressed in hippocampal mossy fibers of temporal lobe epilepsy patients, *Hippocampus*, **22**, 590-603, <https://doi.org/10.1002/hipo.20923>.
36. Galván, E. J., and Gutiérrez, R. (2017) Target-dependent compartmentalization of the corelease of glutamate and GABA from the mossy fibers, *J. Neurosci.*, **37**, 701-714, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1915-16.2016>.
37. Uchigashima, M., Fukaya, M., Watanabe, M., and Kamiya, H. (2007) Evidence against GABA release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus, *J. Neurosci.*, **27**, 8088-8100, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0702-07.2007>.
38. Xiong, G., Zhang, L., Mojsilovic-Petrovic, J., Arroyo, E., Elkind, J., Kundu, S., Johnson, B., Smith, C. J., Cohen, N. A., Grady, S. M., and Cohen, A. S. (2012) GABA and glutamate are not colocalized in mossy fiber terminals of developing rodent hippocampus, *Brain Res.*, **1474**, 40-49, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.042>.
39. Gutiérrez, R. (2016) The plastic neurotransmitter phenotype of the hippocampal granule cells and of the moss in their messy fibers, *J. Chem. Neuroanat.*, **73**, 9-20, <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.11.007>.
40. Gutiérrez, R. (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system, *J. Neurophysiol.*, **84**, 3088-3090, <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.6.3088>.
41. Walker, M. C., Ruiz, A., and Kullmann, D. M. (2002) Do mossy fibers release GABA? *Epilepsia*, **43**, 196-202, <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.43.s.5.6.x>.
42. Treviño, M., and Gutiérrez, R. (2005) The GABAergic projection of the dentate gyrus to hippocampal area CA3 of the rat: pre- and postsynaptic actions after seizures, *J. Physiol.*, **567**, 939-949, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.092064>.
43. Walker, M. C., Ruiz, A., and Kullmann, D. M. (2001) Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapses, *Neuron*, **29**, 703-715, [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00245-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00245-8).
44. Romo-Parra, H., Vivar, C., Maqueda, J., Morales, M. A., and Gutiérrez, R. (2003) Activity-dependent induction of multitransmitter signaling onto pyramidal cells and interneurons of hippocampal area CA3, *J. Neurophysiol.*, **89**, 3155-3167, <https://doi.org/10.1152/jn.00985.2002>.
45. Vinogradova, O. S. (1995) Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm, *Prog. Neurobiol.*, **45**, 523-583, [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)00051-I](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)00051-I).
46. Vinogradova, O. S. (2001) Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information, *Hippocampus*, **11**, 578-598, <https://doi.org/10.1002/hipo.1073>.
47. Vinogradova, O. S., Brazhnik, E. S., Kitchagina, V. F., and Stafekhina, V. S. (1993) Acetylcholine, theta-rhythm and activity of the hippocampal neurons in the rabbit. IV. Sensory stimulation, *Neuroscience*, **53**, 993-1007, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90484-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90484-w).
48. Buzsáki, G. (2002) Theta oscillations in the hippocampus, *Neuron*, **33**, 325-340, [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00586-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00586-x).
49. Freund, T. F., and Gulyás, A. I. (1997) Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**, 479-487, <https://doi.org/10.1139/y97-033>.
50. Toth, K., Freund, T. F., and Miles, R. (1997) Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum, *J. Physiol.*, **500**, 463-474, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp022033>.
51. Soty, M., Danik, F., Manseau, F., Laplante, R., Quirion, S., and Williams, S. (2003) Glutamatergic, cholinergic and GABAergic neurons contribute to the septohippocampal pathway and exhibit distinct electrophysiological properties: novel implications for hippocampal rhythmicity, *J. Physiol.*, **551**, 927-943, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046847>.
52. Colom, L. V., Castañeda, M. T., Reyna, T., Hernandez, S., and Garrido-Sanabria, E. (2005) Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus, *Synapse*, **58**, 151-164, <https://doi.org/10.1002/syn.20184>.
53. Tkatch, K., Baranauskas, G., and Surmeier, D. J. (1998) Basal forebrain neurons adjacent to the globus pallidus co-express GABAergic and cholinergic marker mRNAs, *Neuroreport*, **9**, 1935-1939, <https://doi.org/10.1097/00001756-199806220-00004>.
54. Puma, C., Danik, M., Quirion, R., Ramon, F., and Williams, S. (2001) The chemokine interleukin-8 acutely reduces  $\text{Ca}^{2+}$  currents in identified cholinergic septal neurons expressing CXCR1 and CXCR2 receptor mRNAs, *J. Neurochem.*, **78**, 960-971, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00469.x>.

55. Han, S.-H., McCool, B. A., Murchison, D., Nahm, S.-S., Parrish, A., and Griffith, W. H. (2002) Single-cell RT-PCR detects shifts in mRNA expression profiles of basal forebrain neurons during aging, *Mol. Brain Res.*, **98**, 67-80, [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(01\)00322-9](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(01)00322-9).
56. Huh, C. Y., Danik, M., Manseau, F., Trudeau, L. E., and Williams, S. (2008) Chronic exposure to nerve growth factor increases acetylcholine and glutamate release from cholinergic neurons of the rat medial septum and diagonal band of Broca via mechanisms mediated by p75NTR, *J. Neurosci.*, **6**, 1404-1409, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4851-07.2008>.
57. Case, D. T., Burton, S. D., Gedeon, J. Y., Williams, S. G., Urban, N. N., and Seal, R. P. (2017) Layer- and cell type-selective co-transmission by a basal forebrain cholinergic projection to the olfactory bulb, *Nat. Commun.*, **8**, 652, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00765-4>.
58. Hillegaart, V. (1991) Functional topography of brain serotonergic pathways in the rat, *Acta Physiol. Scand.*, **142**, 1-54.
59. Acsady, L., Halasy, K., and Freund, T. D. (1993) Calretinin is present in nonpyramidal cells of the rat hippocampus. III. Their inputs from the medial raphe and medial septal nuclei, *Neuroscience*, **52**, 829-841, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90532-k](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90532-k).
60. McQuade, R., and Sharp, T. (1997) Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis, *J. Neurochem.*, **69**, 791-796, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020791.x>.
61. Kusljanic, S., and van den Buuse, M. (2004) Functional dissociation between serotonergic pathways in dorsal and ventral hippocampus in psychotomimetic drug-induced locomotor hyperactivity and prepulse inhibition in rats, *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 3424-3432, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03804.x>.
62. Freund, T. F., Gulyás, A. I., Acsády, L., Görcs, T., and Tóth, K. (1990) Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8501, <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8501>.
63. Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotoninergic neurons, *J. Neurosci.*, **22**, 5442-5451, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-13-05442.2002>.
64. Shutoh, F., Ina, A., Yoshida, S., Konno, J., and Hisano, S. (2008) Two distinct subtypes of serotonergic fibers classified by co-expression with vesicular glutamate transporter 3 in rat forebrain, *Neurosci. Lett.*, **432**, 132-136, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.12.050>.
65. Voisin, A. N., Mnie-Filali, O., Giguere, N., Fortin, G. M., Vigneault, E., El Mestikawy, S., Descarries, L., and Trudeau, L. E. (2016) Axonal segregation and role of the vesicular glutamate transporter VGLUT3 in serotonin neurons, *Front. Neuroanat.*, **10**, 39, <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00039>.
66. Calizo, L. H., Akanwa, A., Ma, X., Pan, Y. Z., Lemos, J. C., Craige, C., Heemstra, L. A., and Beck, S. G. (2011) Raphe serotonin neurons are not homogenous: Electrophysiological, morphological and neurochemical evidence, *Neuropharmacology*, **61**, 524-543, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.008>.
67. Gagnon, D., and Parent, M. (2014) Distribution of VGLUT3 in highly collateralized axons from the rat dorsal raphe nucleus as revealed by single-neuron reconstructions, *PLoS One*, **9**, e87709, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087709>.
68. Belmer, A., Beecher, K., Jacques, A., Patkar, O. L., Sicherre, F., and Bartlett, S. E. (2019) Axonal Non-segregation of the vesicular glutamate transporter VGLUT3 within serotonergic projections in the mouse forebrain, *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 193, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00193>.
69. Ren, J., Friedmann, D., Xiong, J., Liu, C. D., Ferguson, B. R., Weerakkody, T., DeLoach, K. E., Ran, C., Pun, A., Sun, Y., Weissbourd, B., Neve, R. L., Huguenard, J., et al. (2018) Anatomically defined and functionally distinct dorsal raphe serotonin sub-systems, *Cell*, **175**, 472-487, e420, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.043>.
70. Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P., and El Mestikawy, S. (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain, *Neuroscience*, **123**, 983-1002, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.10.039>.
71. Hioki, H., Nakamura, H., Ma, Y. F., Konno, M., Hayakawa, T., Nakamura, K. C., Fujiyama, F., and Kaneko, T. (2010) Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei, *J. Comp. Neurol.*, **518**, 668-686, <https://doi.org/10.1002/cne.22237>.
72. Sos, K. E., Mayer, M. I., Cserep, C., Takacs, F. S., Szonyi, A., Freund, T. F., and Nyiri, G. (2017) Cellular architecture and transmitter phenotypes of neurons of the mouse median raphe region, *Brain Struct. Funct.*, **222**, 287-299, <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1217-x>.
73. Zimmermann, J., Herman, M. A., and Rosenmund, C. (2015) Co-release of glutamate and GABA from single vesicles in GABAergic neurons exogenously expressing VGLUT3, *Front. Synaptic Neurosci.*, **7**, 16, <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2015.00016>.
74. Pan, W. X., and McNaughton, N. (2004) The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus, *Prog. Neurobiol.*, **74**, 127-166, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.003>.

75. Vertes, R. P., and Kocsis, B. (1997) Brainstem-diencephalo-septohippocampal system controlling the theta rhythm of the hippocampus, *Neuroscience*, **81**, 893-926, [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00239-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00239-x).
76. Billwiller, F., Castillo, L., Elseedy, H. A., Ivanov, A. I., Scapula, J., Ghestem, A., Carponcy, J., Libourel, P. A., Bras, H., Abdelmeguid, N. E. S., Krook-Magnuson, E., Soltesz, I., Bernard, C., Luppi, P.-H., and Esclapez, M. (2020) GABA-glutamate supramammillary neurons control theta and gamma oscillations in the dentate gyrus during paradoxical (REM) sleep, *Brain Struct. Funct.*, **225**, 2643-2668, <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02146-y>.
77. Boulland, J. L., Jenstad, M., Boekel, A. J., Wouterlood, F. G., Edwards, R. H., Storm-Mathisen, J., and Chaudhry, F. A. (2009) Vesicular glutamate and GABA transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of pre-synaptic terminals, *Cereb. Cortex*, **19**, 241-248, <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn077>.
78. Soussi, R., Zhang, N., Tahtakran, S., Houser, C. R., and Esclapez, M. (2010) Heterogeneity of the supramammillary-hippocampal pathways: evidence for a unique GABAergic neurotransmitter phenotype and regional differences: GABAergic and glutamatergic supramammillary-hippocampal pathways, *Eur. J. Neurosci.*, **32**, 771-785, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07329.x>.
79. Root, D. H., Zhang, S., Barker, D. J., Miranda-Barrientos, J., Liu, B., Wang, H. L., and Morales, M. (2018) Selective brain distribution and distinctive synaptic architecture of dual glutamatergic-GABAergic neurons, *Cell Rep.*, **23**, 3465-3479, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.063>.
80. Pedersen, N. P., Ferrari, L., Venneri, A., Wang, J. L., Abbott, S. B. G., Vujovic, N., Arrigoni, E., Saper, C. B., and Fuller, P. M. (2017) Supramammillary glutamate neurons are a key node of the arousal system, *Nat. Commun.*, **8**, 1405, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01004-6>.
81. Hashimotodani, Y., Karube, F., Yanagawa, Y., Fujiyama, F., and Kano, M. (2018) Supramammillary nucleus afferents to the dentate gyrus co-release glutamate and GABA and potentiate granule cell output, *Cell Rep.*, **25**, 2704-2715, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.016>.
82. Kocsis, B., and Vertes, R. P. (1994) Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat, *J. Neurosci.*, **14**, 7040-7052, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-11-07040.1994>.
83. Kocsis, B., and Kaminski, M. (2006) Dynamic changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramammillary nucleus and the septohippocampal system, *Hippocampus*, **16**, 531-540, <https://doi.org/10.1002/hipo.20180>.
84. Pasquier, D. A., and Reinoso-Suarez, F. (1976) Direct projections from hypothalamus to hippocampus in the rat demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase, *Brain Res.*, **108**, 165-169, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90172-4).
85. Richmond, M. A., Yee, B. K., Pouzet, B., Veenman, L., Rawlins, J. N., Feldon, J., and Bannerman, D. M. (1999) Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning, *Behav. Neurosci.*, **113**, 1189-1203, <https://doi.org/10.1037/0735-7044.113.6.1189>.
86. Pan, W. X., and McNaughton, N. (2002) The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behaviour in rats, *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 1797-1809, <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02267.x>.
87. Santin, L. J., Aguirre, J. A., Rubio, S., Begega, A., Miranda, R., and Arias, J. L. (2003) c-Fos expression in supramammillary and medial mammillary nuclei following spatial reference and working memory tasks, *Physiol. Behav.*, **78**, 733-739, [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(03\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(03)00060-x).
88. Shahidi, S., Motamedi, F., and Naghdi, N. (2004) Effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on spatial learning and memory in rats, *Brain Res.*, **1026**, 267-274, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.08.030>.
89. Gasbarri, A., Verney, C., Innocenzi, R., Campana, E., and Pacitti, C. (1994) Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study, *Brain Res.*, **668**, 71-79, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90512-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90512-6).
90. Samson, Y., Wu, J. J., Friedman, A. H., and Davis, J. N. (1990) Catecholaminergic innervation of the hippocampus in the cynomolgus monkey, *J. Comp. Neurol.*, **298**, 250-263, <https://doi.org/10.1002/cne.902980209>.
91. Sulzer, D., Joyce, M. P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S. N., Hattori, T., and Rayport, S. (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses *in vitro*, *J. Neurosci.*, **18**, 4588-4602, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-12-04588.1998>.
92. Hnasko, T. S., Chuhma, N., Zhang, H., Goh, G. Y., Sulzer, D., Palmiter, R. D., Rayport, S., and Edwards, R. H. (2010) Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease *in vivo*, *Neuron*, **65**, 643-656, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.02.012>.
93. Chuhma, N., Mingote, S., Moore, H., and Rayport, S. (2014) Dopamine neurons control striatal cholinergic neurons via regionally heterogeneous dopamine and glutamate signaling, *Neuron*, **81**, 901-912, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.027>.

94. Trudeau, L.-E., Hnasko, T. S., Wallén-Mackenzie, A., Morales, M., Rayport, S., and Sulzer, D. (2014) The multilingual nature of dopamine neurons, *Prog. Brain Res.*, **211**, 141-164, <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63425-2.00006-4>.
95. Nelson, A. B., Bussert, T. G., Kreitzer, A. C., and Seal, R. P. (2014) Striatal cholinergic neurotransmission requires VGLUT3, *J. Neurosci.*, **34**, 8772-8777, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0901-14.2014>.
96. Frahm, S., Antolin-Fontes, B., Görlich, A., Zander, J.-F., Ahnert-Hilger, G., and Ibañez-Tallon, I. (2015) An essential role of acetylcholine-glutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence, *Elife*, **4**, e11396, <https://doi.org/10.7554/elife.11396>.
97. Yamaguchi, T., Sheen, W., and Morales, M. (2007) Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area, *Eur. J. Neurosci.*, **25**, 106-118, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05263.x>.
98. Li, X., Qi, J., Yamaguchi, T., Wang, H.-L., and Morales, M. (2013) Heterogeneous composition of dopamine neurons of the rat A10 region: molecular evidence for diverse signaling properties, *Brain Struct. Funct.*, **218**, 1159-1176, <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0452-z>.
99. Loy, R., Koziell, D. A., Lindsey, J. D., and Moore, R. Y. (1980) Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation, *J. Comp. Neurol.*, **189**, 699-710, <https://doi.org/10.1002/cne.901890406>.
100. Ford, B., Holmes, C. J., Mainville, L., and Jones, B. E. (1995) GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: tegmental neurons projecting to the posterior hypothalamus, *J. Comp. Neur.*, **363**, 177-196, <https://doi.org/10.1002/cne.903630203>.
101. Privitera, M., von Ziegler, L. M., Floriou-Servou, A., Duss, S. N., Zhang, R., Waag, R., Leimbacher, S., Sturman, O., Roessler, F. K., Heylen, A., Vermeiren, Y., Van Dam, D., et al. (2024) Noradrenaline release from the locus coeruleus shapes stress-induced hippocampal gene expression, *Elife*, **12**, RP88559, <https://doi.org/10.7554/eLife.88559>.
102. Stornetta, R. L., Rosin, D. L., Simmons, J. R., McQuiston, T. J., Vujovic, N., Weston, M. C., and Guyenet, P. G. (2005) Coexpression of vesicular glutamate transporter-3 and g-aminobutyric acidergic markers in rat rostral medullary raphe and intermediolateral cell column, *J. Comp. Neurol.*, **492**, 477-494, <https://doi.org/10.1002/cne.20742>.
103. Mather, M., Clewett, D., Sakaki, M., and Harley, C. W. (2016) Norepinephrine ignites local hotspots of neuronal excitation: how arousal amplifies selectivity in perception and memory, *Behav. Brain Sci.*, **39**, e200, <https://doi.org/10.1017/S0140525X15000667>.
104. Devoto, P. and Flore, G. (2006) On the origin of cortical dopamine: is it a co-transmitter in noradrenergic neurons? *Curr. Neuropharmacol.*, **4**, 115-125, <https://doi.org/10.2174/157015906776359559>.
105. Smith, C. C., and Greene, R. W. (2012) CNS dopamine transmission mediated by noradrenergic innervation, *J. Neurosci.*, **32**, 6072-6080, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6486-11.2012>.
106. Hansen, N., and Manahan-Vaughan, D. (2014) Dopamine D1/D5 receptors mediate informational saliency that promotes persistent hippocampal long-term plasticity, *Cereb. Cortex*, **24**, 845-858, <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs362>.
107. Takeuchi, T., Duszkiewicz, A. J., Sonneborn, A., Spooner, P. A., Yamasaki, M., Watanabe, M., Smith, C. C., Fernández, G., Deisseroth, K., Greene, R. W., and Morris, R. G. M. (2016) Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory, *Nature*, **537**, 357-362, <https://doi.org/10.1038/nature19325>.
108. Sonneborn, A., and Greene, R. W. (2021) Norepinephrine transporter antagonism prevents dopamine-dependent synaptic plasticity in the mouse dorsal hippocampus, *Neurosci. Lett.*, **740**, 135450, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135450>.
109. Bragin, A. G., Zhadina, S. D., Vinogradova, O. S., and Kozhevkin, S. N. (1977) Topography and some characteristics of the dentate fascia-field CA3 relations investigated in hippocampal slices *in vitro*, *Brain Res.*, **135**, 55-66.
110. Lehmann, H., Ebert, U., and Loscher, W. (1996) Immunocytochemical localization of GABA immunoreactivity in dentate granule cells of normal and kindled rats, *Neurosci. Lett.*, **212**, 41-44, [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12777-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12777-4).
111. Виноградова О. С. (2000) Нейронаука конца второго тысячелетия: смена парадигм. *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова*, **50**, 743-774.
112. Kitchigina, V. F. (2010) Theta oscillations and reactivity of hippocampal stratum oriens neurons, *Sci. World J.*, **10**, 930-943, <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.90>.
113. Bartesaghi, R., and Gessi, T. (2003) Activation of perforant path neurons to field CA1 by hippocampal projections, *Hippocampus*, **13**, 235-249, <https://doi.org/10.1002/hipo.10074>.
114. Conrad, B., Benecke, R., and Goehmann, M. (1983) Premovement silent period in fast movement initiation, *Exp. Brain Res.*, **51**, 310-313, <https://doi.org/10.1007/BF00237208>.
115. Чебкасов С. А. (1995) Предстимульное торможение в нейронных модулях зрительной коры морской свинки, *Физиол. Журн. Сеченова*, **81**, 119.
116. Gemin, O., Serna, P., Zamith, J., Assendorp, N., Fossati M., Rostaing, P., Triller, A., and Charrier, C. (2021) Unique properties of dually innervated dendritic spines in pyramidal neurons of the somatosensory cortex uncovered by 3D correlative light and electron microscopy, *PLoS Biol.*, **19**, e3001375, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001375>.

117. Chiu, C. Q., Martenson, J. S., Yamazaki, M., Natsume, R., Sakimura, K., Tomita, S., Steven, J. T., and Higley, M. J. (2018) Input-specific NMDAR-dependent potentiation of dendritic GABAergic inhibition, *Neuron*, **97**, 368-377.e3, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.032>.
118. Dorman, D. B., Jędrzejewska-Szmk, J., and Blackwell, K. T. (2018) Inhibition enhances spatially-specific calcium encoding of synaptic input patterns in a biologically constrained model, *Elife*, **7**, e38588, <https://doi.org/10.7554/eLife.38588>.
119. El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, Å., Fortin, G. M., Descarries, L., and Trudeau, L. E. (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters, *Nat. Rev. Neurosci.*, **12**, 204-216, <https://doi.org/10.1038/nrn2969>.
120. Ajibola, M. I., Wu, J.-W., Abdulmajeed, W. I., and Lien, C.-C. (2021) Hypothalamic glutamate/GABA cotransmission modulates hippocampal circuits and supports long-term potentiation, *J. Neurosci.*, **41**, 8181-8196, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0410-21.2021>.
121. Кичигина В. Ф., Гордеева Т. А. (1995) Регуляция септального пейсмекера тета-ритма медианным ядром шва, *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова*, **45**, 848-859.
122. Nitz, D. A., and McNaughton, B. L. (1999) Hippocampal EEG and unit activity responses to modulation of serotonergic median raphe neurons in the freely behaving rat, *Learn. Mem.*, **6**, 153-167.
123. Huh, C. Y., Jacobs, B. L., and Azmitia E. C. (1992) Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol. Rev.*, **72**, 165-229, <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>.
124. Kandel, E., Schwartz, J. H., and Jessel, T. M. (2000) *Principles of Neural Science*, McGraw Hill, New York, Edn. 4.
125. Varga, V., Losonczy, A., Zemelman, B. V., Borhegyi, Z., Nyiri, G., Domonkos, A., Hangya, B., et al. (2009) Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits, *Science*, **326**, 449-453, <https://doi.org/10.1126/science.1178307>.
126. Collins, S. A., Stinson, H. E., Himes, A., Nestor-Kalinowski, A., and Ninan, I. (2023) Sex-specific modulation of the medial prefrontal cortex by glutamatergic median raphe neurons, *Sci. Adv.*, **9**, eadg4800, <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg4800>.
127. Gullino, L. S., Fuller, C., Dunn, P., Collins, H. M., El Mestikawy, S., and Sharp, T. (2024) Evidence for a Role of 5-HT-glutamate co-releasing neurons in acute stress mechanisms, *ACS Chem Neurosci.*, **15**, 1185-1196, <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.3c00758>.
128. Hirase, H., Leinekugel, X., Csicsvari, J., Czurkó, A., and Buzsáki, G., (2001) Behavior-dependent states of the hippocampal network affect functional clustering of neurons, *J. Neurosci.*, **21**, RC145, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-10-j-0003.2001>.
129. Moita, M. A. P., Rosis, S., Zhou, Y., LeDoux, J. E., and Blair, H. T. (2003) Hippocampal place cells acquire location-specific responses to the conditioned stimulus during auditory fear conditioning, *Neuron*, **37**, 485-497, [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00033-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00033-3).
130. Freund, T. F., and Antal, M. (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus, *Nature*, **336**, 170-173, <https://doi.org/10.1038/336170a0>.
131. Cardin, J. A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., and Moore, C. I. (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses, *Nature*, **459**, 663, <https://doi.org/10.1038/nature08002>.
132. Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations, *Science*, **321**, 53-57, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3269-05.2005>.
133. Valero, M., Cid, E., Averkin, R. G., Aguilar, J., Sanchez-Aguilera, A., Viney, T. J., Gomez-Dominguez, D., Bellistri, E., and de la Prida, L. M. (2015) Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1281-1290, <https://doi.org/10.1038/nn.4074>.
134. Craske, M. G., Kircanski, K., Zelikowsky, M., Mystkowski, J., Chowdhury, N., and Baker, A. (2008) Optimizing inhibitory learning during exposure therapy, *Behav. Res. Ther.*, **46**, 5-27, <https://doi.org/10.1016/j.brat.2007.10.003>.
135. Ballinger, E. C., Ananth, M., Talmage, D. A., and Role, L. W. (2016) Basal forebrain cholinergic circuits and signaling in cognition and cognitive decline, *Neuron*, **91**, 1199-1218, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.006>.
136. Baratta, M. V., Kodandaramaiah, S. B., Monahan, P. E., Yao, J., Weber, M. D., Lin P.-A., Gisabella, B., Petrossian, N., Amat, J., Kim, K., Yang, A., Forest, C. R., Boyden, E. S., and Goosens, K. A. (2016) Stress enables reinforcement-elicited serotonergic consolidation of fear memory, *Biol. Psychiatry*, **79**, 814-822, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.06.025>.
137. Wilson, M. A., and Fadel, J. R. (2017) Cholinergic regulation of fear learning and extinction, *J. Neurosci. Res.*, **95**, 836-852, <https://doi.org/10.1002/jnr.23840>.
138. Krabbe, S., Gründemann, J., and Lüthi, A. (2018) Amygdala inhibitory circuits regulate associative fear conditioning, *Biol. Psychiatry*, **83**, 800-809, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.006>.
139. Amilhon, B., Lepicard, É., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., Miot, S., Gras, C., Gardier, A. M., Gallego, J., Hamon, M., et al. (2010) VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety, *J. Neurosci.*, **30**, 2198-2210, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5196-09.2010>.

140. Omiya, Y., Uchigashima, M., Konno, K., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yoshida, T., Kusumi, I., and Watanabe, M. (2015) VGlut3-expressing CCK-positive basket cells construct invaginating synapses enriched with endocannabinoid signaling proteins in particular cortical and cortex-like amygdaloid regions of mouse brains, *J. Neurosci.*, **35**, 4215-4228, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4681-14.2015>.
141. Rovira-Esteban, L., Péterfi, Z., Vikór, A., Máté, Z., Szabó, G., and Hájos, N. (2017) Morphological and physiological properties of CCK/CB1 reexpressing interneurons in the basal amygdala, *Brain Struct. Funct.*, **222**, 3543-3565, <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1417-z>.
142. Sengupta, A., and Holmes, A. (2019) A discrete dorsal raphe to basal amygdala 5-HT circuit calibrates aversive memory, *Neuron*, **103**, 489-505.e7, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.029>.
143. Balázsfi, D., Fodor, A., Török, B., Ferenczi, S., Kovács, K. J., Haller, J., and Zelena, D. (2018) Enhanced innate fear and altered stress axis regulation in VGlut3 knockout mice, *Stress*, **21**, 151-161, <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1423053>.
144. Fazekas, C. L., Balázsi, D., Horvath, H. R., Balogh, Z., Aliczki, M., Puhova, A., Balagova, L., Chmelova, M., Jezova, D., Haller, J., and Zelena, D. (2019) Consequences of VGlut3 deficiency on learning and memory in mice, *Physiol. Behav.*, **212**, 112688, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112688>.
145. Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C., and Zhuang, X. (2010) Superresolution imaging of chemical synapses in the brain, *Neuron*, **68**, 843-856, <https://doi.org/10.1016/j.NEURON.2010.11.021>.
146. Chang, J. B., Chen, F., Yoon, Y. G., Jung, E. E., Babcock, H., Kang, J. S., Asano, S., Suk, H. J., Pak, N., Tillberg, P. W., et al. (2017) Iterative expansion microscopy, *Nat. Methods*, **14**, 593-599, <https://doi.org/10.1038/nmeth.4261>.

## COLOCALIZATION OF NEUROTRANSMITTERS IN THE HIPPOCAMPUS AND AFFERENT SYSTEMS: POSSIBLE FUNCTIONAL ROLE

### Review

**V. F. Kitchigina**

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics Russian Academy of Sciences,  
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: vkitchigina@gmail.com*

In neurophysiology, the transmitter phenotype is considered a sign of neuronal identity. Since the end of the last century, it has become known that a nerve cell can produce and use several different molecules to communicate with other neurons. These can be "classical" transmitters: glutamate or gamma-aminobutyric acid (or acetylcholine, serotonin, norepinephrine), as well as second messengers, mainly neuropeptides released from the same neurons. If classical neurotransmitters are released together from the same nerve cell, this is called cotransmission or coreleasing (release from the same vesicles). In this review article, the term "cotransmission" is used in a broad sense, denoting neurons that can release more than one classical mediator. Since transmitters are often intermediate products of metabolism and are found in many cells, the classification of neurons is currently based on carrier proteins (transporters) that "pack" neurotransmitters synthesized in the cytoplasm into vesicles. Here, we limit the question of colocalization of the main neurotransmitters in mammals to neurons of the hippocampus and those structures that send their pathways to it. The review considers problems affecting the mechanisms of multitransmitter signaling, as well as the probable functional role of mediator colocalization in the work of the hippocampus, which has not yet been clarified. It is suggested that co-expression of different mediator phenotypes is involved in maintaining the balance of excitation and inhibition in different regions of the hippocampus; facilitates rapid selection of information processing methods, induction of long-term potentiation, maintenance of spatial coding by place cells, as well as ensuring flexibility of learning and formation of working memory. However, the functional role of mediator colocalization, as well as the mechanisms of release of "dual" transmitters, have not been fully clarified. The solution of these problems will advance some areas of fundamental neuroscience and help in the treatment of those diseases where a violation of the balance of excitation and inhibition is detected, for example, epilepsy, Alzheimer's disease and many others.

**Keywords:** hippocampus, dentate gyrus, afferent structures, pyramidal neurons, granule cells, interneurons, transmitters, glutamate, GABA, transporters, theta rhythm, mechanisms, functional role, seizure pathology

## РОЛЬ $\beta$ - И $\alpha$ -СТРУКТУР МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В ИЗМЕНЕНИИ СТРУКТУРЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ

© 2025 П.В. Мокрушинов<sup>1\*</sup>, В.Я. Рудяк<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный архитектурно-строительный университет (Сибстрин), 630008 Новосибирск, Россия; электронная почта: pavel.mokrushnikov@bk.ru

<sup>2</sup> Институт теплофизики им. С.С. Кутателадзе СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 25.06.2024

После доработки 06.11.2024

Принята к публикации 05.12.2024

Изменение структуры плазматических мембран влияет на функции мембран и клеток. Некоторые из этих изменений могут приводить к развитию патологий организма, что делает актуальной задачу изучения влияния изменений структуры мембран на их функции. В настоящее время установлено, что при взаимодействии гормонов стресса и андрогенов с плазматическими мембранами происходит изменение их структуры. При этом в плазмалеммах меняются взаимодействия между белками и липидами, образуется неподвижная квазипериодическая сеть белок-липидных доменов, связанная с цитоскелетом. Инициаторами образования белок-липидных доменов являются мембранные белки, которые изменили свою вторичную структуру при взаимодействии мембранных белков с гормонами. Вместе с тем всё ещё не ясно, какие именно изменения во вторичной структуре мембранных белков способствуют образованию вокруг них белок-липидных доменов. Целью данной работы являлось установление этих вторичных структур мембранных белков. Для достижения поставленной цели изучались изменения структуры мембран при их взаимодействии с дегидроэпиандростероном, кортизолом, андростероном, тестостероном и адреналином. В работе для изучения изменения структуры мембран использовались флуоресцентные методы измерения спектров возбуждения и испускания собственной флуоресценции мембранных белков и относительной микровязкости мембран с помощью зонда пирен. Изменение вторичной структуры мембранных белков при структурных переходах в мембранах изучалось с помощью ИК-спектроскопии. Установлено, что инициаторами появления белок-липидных доменов в плазматических мембранах являются мембранные белки, в которых после взаимодействия с гормонами увеличивается доля  $\beta$ -структур. При этом появление новых  $\alpha$ -спиралей в мембранных белках не усиливает притяжение между мембранными белками, белок-липидные домены не образуются. Напротив, появление большого числа  $\alpha$ -спиралей в мембранных белках может привести к уменьшению микровязкости липидного бислоя.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** белок-белковые и белок-липидные взаимодействия в плазматических мембранах, белок-липидные домены в плазматических мембранах,  $\beta$ -структуры,  $\alpha$ -спирали, структурные изменения плазматических мембран, апо А-1, болезнь Альцгеймера.

DOI: 10.31857/S0320972525010064 EDN: CPSLIG

### ВВЕДЕНИЕ

Изменение структуры плазматических мембран влияет на функции мембран и клеток. Под изменением структуры плазматических мембран понимается изменение вторичной, третичной и четвертичной структур мембранных белков, фаз

липидного бислоя, перераспределение белков и липидов по бислою, изменение морфологии мембран. Некоторые из этих изменений могут приводить к развитию патологий организма. С другой стороны, развитие тех или иных патологий может вызывать изменения в структуре плазмалеммы. Таким образом, изучение влияния

Принятые сокращения: ДЭА – дегидроэпиандростерон;  $D_f$  – интенсивность возбуждения собственной флуоресценции мембранных белков;  $F$  – интенсивность испускания собственной флуоресценции мембранных белков;  $I$  – интенсивность испускания флуоресценции мембран;  $L$  – относительная микровязкость мембран;  $L_o$  и  $L_d$  – жидкое-упорядоченное и -неупорядоченное состояния липидов соответственно.

\* Адресат для корреспонденции.

изменения структуры плазматических мембран на их функции актуально не только с точки зрения фундаментальной науки, но и чрезвычайно важно с практической точки зрения.

Хорошей моделью для исследования влияния изменения структуры плазматических мембран на их функции является мембрана эритроцита, которую можно легко выделить и которая имеет строение, подобное многим другим плазматическим мембранам. Изучению этой модели посвящено много работ. Например, описание возрастных изменений структуры мембран эритроцитов представлено в обзорах Боровской и др. [1] и Боронихиной и др. [2]. Основными факторами, повреждающими структуру эритроцитов и нарушающими их жизнедеятельность, являются активные формы кислорода, воздействию которых эритроциты постоянно подвергаются при 4-месячном функционировании в кровотоке. Следствиями окислительного стресса являются: нарушение водно-электролитного баланса стареющих эритроцитов; уменьшение их объёма, площади поверхности и отношения площадь/объём; увеличение концентрации гемоглобина и вязкости цитоплазмы. Всё это ведёт к разрушению цитоскелета и его связей с плазмалеммой, снижению возможности мембранны деформироваться в микрокапиллярах и способности красной клетки выполнять свои функции [1, 2].

Ранее проведены исследования влияния изменения структуры плазматических мембран на их функции на примере взаимодействия гормонов стресса и андрогенов с мембранами эритроцитов, при котором происходит изменение структуры последних [3–5]. При этом в плазмалеммах меняются взаимодействия между белками и липидами. Около мембранных белков, изменивших свою вторичную структуру, образуется неподвижная квазипериодическая сеть белок-липидных доменов, связанная с цитоскелетом [3–5]. В образовавшихся доменах липиды находятся в жидкуюпорядоченном состоянии ( $L_o$ ), между доменами липиды находятся в жидкое-неупорядоченном состоянии ( $L_d$ ) [3–5].

В результате таких структурных изменений меняется поле механических напряжений в плазматической мембране, что ведёт к появлению складчатости мембраны [6–8], изменению функций мембран и красных клеток. Например, при увеличении концентрации гормонов во взвеси мембран эритроцитов происходит увеличение микровязкости мембран и увеличение механических напряжений сжатия в них [9]. Из-за этого активность  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -АТРазы этих мембран при увеличении концентрации гормонов во взвеси сначала увеличивается, достигает максимума, затем начинает уменьшаться [9]. В результате меняются кон-

центрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  на внутренней и внешней сторонах мембраны, меняются как разность электрохимических потенциалов на внутренней и внешней сторонах мембраны, так и дзета-потенциал эритроцита, что влияет на его прохождение по микрокапиллярному руслу [10, 11].

При прохождении эритроцитов по микрокапиллярному руслу, когда на его мембрану действуют одновременно механические поперечные усилия сжатия и продольные усилия растяжения, в жирнокислотных хвостах фосфолипидов могут возникать кинки-солитоны. Как показано в работе Mokrushnikov et al. [12], эти кинки-солитоны могут усиливать перенос молекул газа через мембрану.

Квазипериодическая сеть белок-липидных доменов, появившаяся в плазматической мемbrane в результате структурных изменений, представляет собой неоднородности, в которых коэффициент диффузии липидов ниже, чем в среднем по мембране. В результате меняется характер латеральной диффузии липидов вдоль цитоплазматической мембраны. В однородной мембране она представляет собой простую броуновскую диффузию. После появления сети белок-липидных доменов она становится нелинейной, могут появиться промежутки времени, когда вместе с диффузией существует и адвекция [13].

Инициаторами образования белок-липидных доменов в плазматической мембране являются мембранные белки, которые поменяли свою вторичную структуру при взаимодействии мембран с гормонами [3–5]. Вместе с тем всё ещё не ясно, какие именно изменения во второй структуре мембранных белков способствуют образованию вокруг них белок-липидных доменов. Целью данной работы является установление этих изменений во второй структуре мембранных белков.

Для достижения поставленной цели в представленной работе *in vitro* исследуются изменения структуры мембран эритроцитов крыс при связывании их с дегидроэпиандростероном (ДЭА), кортизолом, андростероном, тестостероном и адреналином. Возникающие при этом изменения структуры мембранных белков исследовали с помощью измерения собственной флуоресценции мембранных белков. Изменения структуры липидного бислоя мембран изучали с применением флуоресцентного метода измерения микровязкости мембран с помощью зонда пирен. Изменение второй структуры мембранных белков исследовали методом измерения поглощения мембранами ИК-излучения.

С помощью измерения зависимости микровязкости мембран от концентрации гормона во взвеси мембран определяли гормоны, взаимодействие с которыми вело к образованию в мембра-

нах сети белок-липидных доменов. Также определяли гормон, взаимодействие с которым не вело к образованию в мембранах сети белок-липидных доменов. Далее, анализируя результаты ИК-спектроскопии мембран эритроцитов, находили различия в изменении вторичной структуры мембранных белков при взаимодействии мембран с этими гормонами. Сопоставляя полученные результаты, удалось выявить вторичную структуру мембранных белков, которая способствует образованию белок-липидных доменов в плазматической мембране.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение мембран эритроцитов.** Основным материалом для проведения экспериментов являлись мембранные эритроциты крыс. В представленной работе для их выделения использовали метод Доджа, который представляет собой осмотический гемолиз эритроцитов и отмыкание мембран в гипотоническом буфере [14]. Мембранные эритроциты крыс получали по следующей методике. Самцы крыс линии Wistar подвергались декапитации под лёгким нембуталовым наркозом. Крысы имели возраст 3 месяца, вес – 250–300 г. Полученную свежесобранную кровь разбавляли вдвое изотоническим фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 44 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> и 136 мМ На<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>. После этого проводили осаждение красных клеток с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 4 °C и 330 g (r<sub>cp</sub> 6 см). Надосадочную жидкость сливали, и процедуру промывки повторяли ещё 2 раза. Мембранные эритроциты были получены после гемолиза эритроцитов в гипотоническом фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 2,75 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> и 8,5 мМ На<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>. Мембранные осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4 °C и 5500 g (r<sub>cp</sub> 6 см), надосадочную жидкость сливали. Процедуру повторяли 4 раза. Получение и хранение мембран производили при 4 °C.

**Методика исследования препарата мембран.** На стекло светового микроскопа «Биомед-6» («Биомед», Россия) для наблюдения в проходящем свете методом фазового контраста наносили каплю препарата. После добавления в центр препарата иммерсионного масла при увеличении 1000× проводили исследование образца.

**Выделение из мембран эритроцитов липидов.** Для анализа спектра испускания собственной флуоресценции мембран необходимы данные о спектре испускания собственной флуоресценции липидов мембран. Для этого из мембран эритроцитов крыс выделяли липиды по следующей методике. Готовили смесь хлороформа и взвеси мембран в объёмном соотноше-

нии 10/1. После встряхивания содержимого пробирки удаляли белковый осадок фильтрацией. Чтобы удалить остатки белков из надосадочной жидкости, добавляли дистиллированную воду в соотношении 1/10. После встряхивания в течение 5 мин смесь центрифугировали в течение 10 мин при 4 °C и 870 g (r<sub>cp</sub> 6 см). В результате центрифugирования происходит разделение на две фазы: верхнюю (водную), содержащую белок, и нижнюю (органическую), содержащую липидную фракцию. Верхнюю фазу вместе с остальным белковым осадком удаляли пипеткой; процедуру удаления белков повторяли 2 раза. Полученный осадок представлял собой мембранные липиды. Взвесь липидов из шприца впрыскивали в фосфатный гипотонический буфер, в котором они образовывали липосомы. К этой взвеси липосом добавляли гормоны в необходимой концентрации и проводили измерения спектров испускания и возбуждения собственной флуоресценции гормонов и липидов.

**Методика измерения собственной флуоресценции мембранных белков.** В представленной работе измеряли зависимости интенсивности собственной флуоресценции мембранных белков (*F*) на длине волн 332 нм при длине волн возбуждения 281 нм от удельной концентрации гормонов во взвеси мембран эритроцитов. Удельная концентрация гормона во взвеси мембран эритроцитов вычисляется по формуле:

$$c = C_h / C_{\text{pep}}, \quad (1)$$

где *C<sub>h</sub>* – молярная концентрация гормона во взвеси, *C<sub>pep</sub>* – массовая концентрация мембранных белков во взвеси [15].

Массовую концентрацию мембранных белков (*C<sub>pep</sub>*) определяли методом Варбурга и Кристиана по изменению оптической плотности взвеси [16]. В разных пробах она менялась от 0,050 мг/мл до 0,250 мг/мл. В представленной работе в экспериментальных результатах грубые ошибки отсутствуют, систематические ошибки исключены, а неисключённая систематическая погрешность (НСП) оценки любой измеряемой величины ничтожно мала по сравнению с доверительными границами случайной погрешности оценки измеряемой величины. Делалось три измерения массовой концентрации белка (*C<sub>pep</sub>*) в одной и той же взвеси. По распределению Стьюдента вычисляли оценку и доверительные границы погрешности оценки *C<sub>pep</sub>*. Доверительные границы погрешности оценки *C<sub>pep</sub>* в относительной форме равны ± 2% при доверительной вероятности 0,95.

В работе использовались гормоны производства фирмы «Sigma-Aldrich», США. Гормоны, кроме адреналина, предварительно растворяли в смеси

диметилсульфоксид–этанол (1/1 по объёму). Концентрация каждого гормона в исходном маточном растворе составляла 1 мМ. При необходимости данный раствор разбавлялся фосфатным гипотоническим буфером до нужной концентрации. Раствор адреналина с концентрацией 1 мКМ предварительно готовили в гипотоническом фосфатном буфере. Далее, этот маточный раствор добавлялся в образец для получения нужной концентрации гормона ( $c$ ) в образце. Доверительные границы погрешности оценки молярной концентрации гормонов ( $C_h$ ) в относительной форме равны  $\pm 2\%$  при доверительной вероятности 0,95. В представленной работе используется формула для вычисления доверительной границы погрешности оценки измеряемой величины  $A$  при косвенных измерениях (2), согласно рекомендациям Государственной системы обеспечения единства измерений [17]:

$$E_f = \frac{1}{\tilde{A}} \left( \sum_{i=1}^m \left( \frac{\partial f}{\partial a_i} \right)^2 \cdot \Delta^2(\tilde{a}_i) \right)^{0.5} \cdot 100\%, \quad (2)$$

где  $\tilde{A} = f(\tilde{a}_1, \dots, \tilde{a}_m)$  – результат измерения  $\tilde{A}$  в точке  $(\tilde{a}_1, \dots, \tilde{a}_m)$ ;  $f(a_1, \dots, a_m)$  – нелинейная функциональная зависимость измеряемой величины  $A$  от измеряемых аргументов  $a_i$ ;  $\partial f / \partial a_i$  – первая производная от функции  $f$  по аргументу  $a_i$ , вычисленная в точке  $(\tilde{a}_1, \dots, \tilde{a}_m)$ ;  $\Delta(\tilde{a}_i)$  – доверительная граница погрешности оценки аргумента  $a_i$ .

Используя формулы (1) и (2), можно вычислить доверительные границы погрешности оценки измерения удельной концентрации гормонов ( $c$ ) в относительной форме, которые равны  $\pm 3\%$ .

Если мембранные белки взаимодействуют с гормонами, происходит изменение их конформации. Меняется микроокружение около радикалов мембранных белков, меняются спектры возбуждения и испускания собственной флуоресценции мембранных белков. Измерения этих спектров проводили на спектрофлуориметре SHIMADZU RF-5301(PC)SCE («SHIMADZU», Япония). В кварцевую кювету размером  $1 \times 1 \times 4$  см вносили 3 мл гипотонического фосфатного буфера, содержащего 2,75 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 8,5 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (рН 7,4), мембранные эритроциты и необходимое количество гормонов. Кювету с образцом помещали в термостат спектрофлуориметра на 10 мин. Выход температуры в кювете на стационарный режим контролировался электронным термометром. Во всех экспериментах температура в кювете была  $(36,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ . После выхода температуры в кювете на стационарный режим снимался спектр испускания в диапазоне  $300 \text{ нм} \leq \lambda \leq 400 \text{ нм}$  при длине волны возбуждения 281 нм. При этом максимум интенсивности испускания приходился на

длину волны 332 нм. Среднее значение максимума интенсивности собственной флуоресценции мембран получали графически после непрерывного измерения в течение 4 мин; спектральная ширина щелей – 1,5/10. Далее, из максимума интенсивности флуоресценции мембран с гормонами вычитали интенсивность флуоресценции липидов с гормонами на длине волны 332 нм (при длине волны возбуждения 281 нм) и получали интенсивность собственной флуоресценции мембранных белков  $F$ , инкубированных с гормонами. Измерения интенсивностей собственной флуоресценции  $F$  при каждом значении концентрации гормона ( $c$ ) во взвеси проводили три раза. Используя распределение Стьюдента, вычисляли оценку  $F$  при каждом значении концентрации гормона ( $c$ ) во взвеси и доверительные границы погрешности  $F$  с доверительной вероятностью 0,95. Доверительные границы погрешности оценки  $F$  в относительной форме оказались равны  $\pm 3\%$ .

Строили зависимость величины тушения собственной флуоресценции мембранных белков, определяемой по формуле (3), от удельной концентрации гормонов ( $c$ ):

$$\Delta F = \frac{F_{\max} - F}{F_{\max}}, \quad (3)$$

где  $F_{\max}$  – интенсивность собственной флуоресценции мембранных белков, когда во взвеси нет гормонов;  $\Delta F$  – величина тушения флуоресценции мембранных белков, выраженная волях от  $F_{\max}$ . Чем выше  $\Delta F$ , тем больше тушение флуоресценции мембранных белка.

При взаимодействии адреналина с мембранными измеряли интенсивность возбуждения собственной флуоресценции мембран при  $\lambda = 228 \text{ нм}$  и длине волны испускания 332 нм. Далее, из этой интенсивности возбуждения флуоресценции мембран вычитали интенсивность возбуждения флуоресценции липидов с адреналином при  $\lambda = 228 \text{ нм}$  (длина волны испускания – 332 нм) и получали интенсивность возбуждения флуоресценции мембранных белков ( $D_f$ ), инкубированных с адреналином. Измерения интенсивностей возбуждения собственной флуоресценции мембранных белков ( $D_f$ ) при каждом значении концентрации гормона ( $c$ ) во взвеси проводили три раза. Используя распределение Стьюдента, вычисляли оценку  $D_f$  при каждом значении концентрации гормона ( $c$ ) во взвеси и доверительные границы погрешности  $D_f$  с доверительной вероятностью 0,95. Доверительные границы погрешности оценки  $D_f$  в относительной форме оказались равны  $\pm 3\%$ .

По формуле (3) находили величину тушения возбуждения флуоресценции мембранных белков ( $\Delta D_f$ ), заменяя в ней  $F_{\max}$  на  $D_{f\max}$  и  $F$  на  $D_f$ , где  $D_{f\max}$  – интенсивность возбуждения флуоресцен-

ции мембранных белков, когда во взвеси нет гормонов. Строили зависимость величины тушения возбуждения флуоресценции мембранных белков от удельной концентрации гормонов ( $c$ ). По распределению Стьюдента, используя формулы (2) и (3), вычисляли оценки и доверительные границы погрешности оценки ( $\Delta F$ ) и ( $\Delta D_f$ ), которые равны  $\pm 4\%$  при доверительной вероятности 0,95.

По трём независимым измерениям, используя графики зависимости  $\Delta F(c)$  и  $(\Delta D_f)$ , графически определяли оценку максимального тушения собственной флуоресценции мембранных белков  $\Delta F_{max}$ , определяли  $c_F$  – удельную концентрацию гормонов, при которой наступает максимум тушения флуоресценции; оценку максимального тушения возбуждения собственной флуоресценции мембранных белков  $\Delta D_{fmax}$ , определяли  $c_D$  – удельную концентрацию гормонов, при которой наступает максимум тушения возбуждения флуоресценции мембранных белков. Используя распределение Стьюдента, получали доверительные границы погрешности измерения этих величин при доверительной вероятности 0,95. Доверительные границы погрешности измерения  $\Delta D_{fmax}$  и  $\Delta F_{max}$  в относительной форме равны  $\pm 5\%$ . Доверительные границы погрешности оценки  $c_F$  и  $c_D$  в относительной форме равны  $\pm 6\%$ . Случайные погрешности возникали из-за того, что  $c_F$  и  $c_D$  определялись из пересечения двух прямых на графиках  $\Delta F(c)$  и  $\Delta D(c)$ , аппроксимирующих экспериментальные результаты. Поскольку экспериментальные результаты определены с некоторой погрешностью, то и угол наклона этих прямых тоже определён с некоторой погрешностью, и, следовательно, значения  $c_F$  и  $c_D$  также определяются с некоторой погрешностью. Оценку различий между выборками проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Методика измерения относительной микровязкости мембран эритроцитов флуоресцентным методом с помощью зонда пирен.** Измерения микровязкости мембран эритроцитов проводили по методике, изложенной в работе Dembo et al. [18], на спектрофлуориметре SHIMADZU RF-5301(PC)SCE. Опытный образец в виде взвеси готовили следующим образом. В кварцевую кювету размером  $1 \times 1 \times 4$  см вносили 3 мл гипотонического фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 2,75 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 8,5 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , взвесь мембран эритроцитов, необходимое количество гормонов, флуоресцентный зонд пирен. Предварительно пирен разводили в этаноле: его исходная концентрация составляла 1,5 мМ, а концентрация в кювете составляла 7,76 мкМ. Все компоненты взвеси до использования хранились при 4 °C.

Кювету с образцом помещали в термостат спектрофлуориметра на 10 мин, после этого проводили измерения его спектра испускания собственной флуоресценции при температуре 36 °C. Перед тем как поставить кювету с образцом в термостат спектрофлуориметра, её энергично встряхивали в течение 1 мин. Для измерения флуоресценции мембран, инкубированных с другим количеством гормонов, каждый раз готовили новую пробу. Это связано с тем, что пирен способствует быстрой деградации мембран эритроцитов.

Строго говоря, микровязкость определяется через коэффициент диффузии в данном случае флуоресцентного зонда пирен в биологической мембране. Скорость поступательной диффузии зонда определяется микроструктурой его непосредственного окружения, поэтому и пользуются термином «микровязкость». Практически под этим понимается некоторый эквивалент: он соответствует вязкости однородной среды, в которой зонд двигался бы с той же скоростью, с которой он движется в реальной мембране [15]. Другими словами, микровязкость показывает, с каким сопротивлением встречается зонд при движении внутри мембраны. Отсюда понятно, что в зависимости от метода измерения подвижности, характера зонда и глубины его локализации в мемbrane значения микровязкости могут варьироваться. Тем не менее данный параметр является важнейшим для идентификации структурных изменений в биомембране [15].

Перед измерением спектра испускания флуоресценции пирена в мембранах с добавленными к взвеси мембран гормонами получали спектр испускания флуоресценции мембран с добавленными к взвеси мембран гормонами, но без добавления пирена (длина волны возбуждения – 281 нм); спектральная ширина щелей – 1,5/5. В результате получали значения  $I_{393}(c)$ ,  $I_{468}(c)$  – интенсивности флуоресценции мембран, инкубированных с гормонами с удельной концентрацией  $c$  во взвеси, при длине волны излучения 393 и 468 нм соответственно.  $I_{393}(0)$ ,  $I_{468}(0)$  – интенсивности флуоресценции мембран, когда во взвеси мембран нет гормонов и пирена, при длине волны излучения 393 и 468 нм соответственно. Для исключения систематической погрешности интенсивности флуоресценции  $I_{393}$ ,  $I_{468}$  вычитали из интенсивностей флуоресценции образцов  $F_{393}$ ,  $F_{468}$  для повышения точности измерения относительной микровязкости мембран ( $L$ ). При длине волны возбуждения, равной 337 нм, и спектральной ширине щелей 1,5/3 интенсивности флуоресценции мембран и гормонов на длинах волн испускания 393 и 468 нм были близки к нулю, ими можно было пренебречь при расчётах микровязкости мембран.

Далее, готовили образцы с пиреном и проводили измерения спектров испускания мембран с добавлением гормонов и пирена. По результатам измерения строили зависимости относительной микропропускности ( $L$ ) липидного бислоя по формуле, приведённой в монографии Добрецова [15], от удельной концентрации с гормонов во взвеси:

$$L = \eta(c)/\eta(0), \quad (4)$$

где  $\eta(c)$ ,  $\eta(0)$  – микропропускности мембран при добавлении во взвесь гормонов с удельной концентрацией  $c$  и без добавления гормона соответственно.

Для области липид-липидного взаимодействия относительную микропропускность липидного бислоя  $L$  вычисляли по формуле, приведённой в монографии Добрецова [15]:

$$L = \eta(c)/\eta(0) = (F_{393}(c) \cdot F_{468}(0)) / (F_{468}(c) \cdot F_{393}(0)), \quad (5)$$

где  $F_{468}(c)$ ,  $F_{468}(0)$  – интенсивности флуоресценции образца при  $\lambda = 468$  нм при удельной концентрации гормона ( $c$ ) во взвеси и при отсутствии гормона во взвеси соответственно;  $F_{393}(c)$ ,  $F_{393}(0)$  – интенсивности флуоресценции образца при  $\lambda = 393$  нм при удельной концентрации гормона ( $c$ ) во взвеси и при отсутствии гормона во взвеси соответственно. Длина волны возбуждения – 337 нм; спектральная ширина щелей – 1,5/3.

Относительную микропропускность  $L$  для области белок-липидного взаимодействия вычисляли по формуле:

$$\begin{aligned} L &= \eta(c)/\eta(0) = \\ &= (F_{393}(c) - I_{393}(c)) \cdot (F_{468}(0) - I_{468}(0)) / \\ &/ [(F_{468}(c) - I_{468}(c)) \cdot (F_{393}(0) - I_{393}(0))], \end{aligned} \quad (6)$$

где  $I_{393}$ ,  $I_{468}$  – интенсивности флуоресценции мембран с гормоном без пирена при  $\lambda = 393$  нм и  $\lambda = 468$  нм соответственно. Длина волны возбуждения – 281 нм; спектральная ширина щелей – 1,5/5.

Измерения микропропускности липидного бислоя при каждом значении концентрации гормона во взвеси проводили три раза; используя распределение Стьюдента, вычисляли оценку и доверительные границы погрешности оценки относительной микропропускности липидного бислоя ( $L$ ) при каждом значении концентрации гормона во взвеси с доверительной вероятностью 0,95. Используя формулы (5), (6), формулу вычисления погрешности при косвенных измерениях (2), получили доверительные границы погрешности оценки относительной микропропускности  $L$  мембран в относительной форме, которые равны  $\pm 6\%$ , с доверительной вероятностью 0,95. Доверительные границы погрешности оценки  $c_{max}$  в относительной форме равны  $\pm 10\%$ . Они складывались

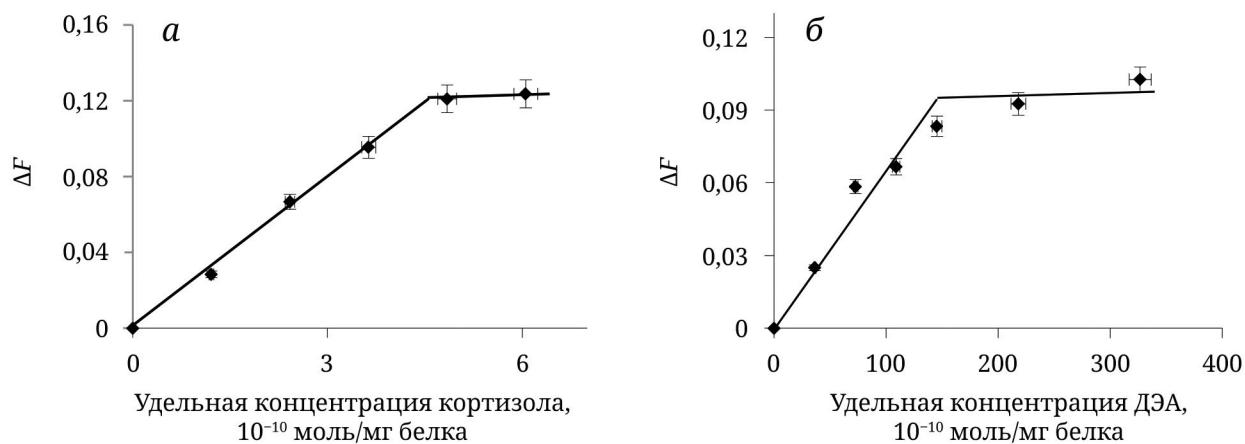
из погрешностей определения концентраций гормонов во взвеси и случайных погрешностей при определении  $c_{max}$ , аналогично погрешности определения  $c_f$ . Доверительные границы погрешности оценки  $L_{max}$  равны  $\pm 6\%$ . Оценку различий между выборками проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Методика измерения поглощения мембранами электромагнитного излучения с помощью ИК-спектроскопии.** Для снятия ИК-спектров сначала по описанной выше методике получали взвесь мембран эритроцитов крыс. Далее, в кювету с флюоритовой подложкой вносили 60 мкл этой взвеси мембран в 1 мМ К<sub>3</sub>Na-фосфатном буфер (рН 7,35). После этого к данному объёму добавляли ещё 30 мкл того же буфера и 1 мкл маточного раствора гормона. Концентрация гормона в маточном растворе – 1 мМ. Полученную взвесь перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при температуре 16 °C. Для уменьшения поглощения ИК-излучения ОН-группами воды взвесь подсушивали. Кювету располагали строго горизонтально на специальном столике вакуумной установки. Плёнку мембран эритроцитов для снятия их ИК-спектров готовили в кювете путём медленного испарения воды из взвеси мембран в течение 180 мин в слабом вакууме при давлении порядка 0,1 атмосферы ( $\sim 0,5 \cdot 10^4$  Па) и температуре 4 °C. Не все молекулы воды удаляются при этом из плёнки. В ней остаются молекулы воды, связанные с мембранными липидами и белками, так что плёнка не получается абсолютно сухой. В результате мембранны в плёнке сохраняют свои структуры, которые они имели во взвеси.

После приготовления плёнки кювету ставили в оптическую камеру ИК-спектрометра, продували камеру с кюветой сухим воздухом при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем включали сканирование прибора. ИК-спектры поглощения (A) теней эритроцитов крыс снимали на двухлучевом спектрометре Specord-M80 («Carl Zeiss», Германия). Во всех экспериментах, наряду с получением спектров опытного образца (плёнка из мембран и гормонов), выполняли и спектроскопирование контрольного образца (плёнка из одних только мембран без гормонов) относительно флюоритовой подложки. Проводилось три независимых измерения ИК-спектра одного и того же образца.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Исследование препарата мембран.** Прежде чем проводить измерения, необходимо продемонстрировать, что именно представляет собой



**Рис. 1.** Зависимость величины тушения собственной флуоресценции мембранных белков эритроцитов  $\Delta F$  от удельной концентрации с во взвеси кортизола (*а*) и дегидроэпиандростерона (*б*). ДЭА – дегидроэпиандростерон

препарат мембран, выделенных согласно данной методике. Необходимо выяснить, что это: везикулы или липосомы, где встроенные в мембранные белки остались после выделения примерно в том же состоянии, что и в составе плазмалеммы эритроцитов? Или это обрывки мембран? Или это смесь липидных капель и белков в растворе? Для этого взвесь мембран эритроцитов, полученную по описанной выше методике, разводили в 10 раз, и каплю полученной взвеси наносили на предметное стекло светового микроскопа «Биомед-6» для наблюдения в проходящем свете методом фазового контраста. После добавления в центр препарата иммерсионного масла при увеличении 1000 $\times$  на предметном стекле были видны овалы правильной формы размером 6–7 мкм, что соответствует размерам эритроцитов крыс. Таким образом, полученный препарат представляет собой взвесь крысиных эритроцитов, из которых удалён гемоглобин. При этом у большинства эритроцитов сохранились и внутренние цитоскелеты, и прикреплённые к ним плазматические мембранные.

**Исследование зависимости интенсивности собственной флуоресценции мембранных белков от удельной концентрации гормонов во взвеси.** Ранее группой под руководством Ю.А. Владимирикова было установлено, что белки плазматических мембран имеют собственную флуоресценцию [15, 19]. Однако, кроме белков, плазматические мембранные имеют в своём составе и липиды. Поэтому сначала были проведены измерения интенсивности собственной флуоресценции мембранных липидов и гормонов. Взвесь липидов, выделенных из мембран по описанной выше методике, из шприца впрыскивали в фосфатный гипотонический буфер, в котором они образовывали липосомы. Концентрация липидов соответствовала их концентрации при измерении

спектра испускания собственной флуоресценции мембранных белков. К этой взвеси липосом добавляли по отдельности гормоны дегидроэпиандростерон, кортизол, андростерон, тестостерон в таких же концентрациях, как при измерении спектра испускания собственной флуоресценции мембран, инкубированных с этими гормонами. Проводили измерения спектров испускания собственной флуоресценции взвеси липидов с гормонами при тех же параметрах, что и измерения спектров испускания собственной флуоресценции мембран. Величины собственной флуоресценции взвесей липидов с гормонами в диапазоне  $300 \text{ нм} \leq \lambda \leq 400 \text{ нм}$  были постоянными для каждого гормона, не зависели от его концентрации, были незначительными и не превышали 4% от величины собственной флуоресценции мембран. При дальнейших расчётах величины собственной флуоресценции мембранных белков эти постоянные величины вычитались из величины собственной флуоресценции мембран.

На рис. 1, *a* дана зависимость величины тушения собственной флуоресценции мембранных белков эритроцитов ( $\Delta F$ ) на длине волны 332 нм (длина волны возбуждения – 281 нм) от удельной концентрации (*c*) добавленного в кювету гормона кортизола. Максимум тушения собственной флуоресценции  $\Delta F_{\max} = (0,110 \pm 0,006)$  отмечался при концентрации гормона в среде инкубации  $c_F = (4,60 \pm 0,28) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка (рис. 1, *a*).

На рис. 1, *b* дана зависимость величины тушения собственной флуоресценции мембранных белков эритроцитов ( $\Delta F$ ) на длине волны 332 нм (длина волны возбуждения – 281 нм) от удельной концентрации ДЭА. Максимум тушения собственной флуоресценции  $\Delta F_{\max} = (0,103 \pm 0,005)$  отмечался при концентрации ДЭА в среде инкубации  $c_F = (1,80 \pm 0,11) \cdot 10^{-8}$  моль/мг белка (рис. 1, *b*).

**Таблица 1.** Результаты измерения флуоресценции мембран эритроцитов при их инкубации с различными гормонами

Гормон	$\Delta F_{\max}$	$c_f$ , моль/мг белка
ДЭА	0,103 ± 0,005	(1,80 ± 0,11)·10 <sup>-8</sup>
Тестостерон	0,180 ± 0,009	(1,10 ± 0,10)·10 <sup>-9</sup>
Кортизол	0,110 ± 0,006	(4,60 ± 0,28)·10 <sup>-10</sup>
Адреналин	0,150 ± 0,008*	(2,00 ± 0,12)·10 <sup>-10</sup>
Андростерон	0,060 ± 0,003	(1,000 ± 0,060)·10 <sup>-10</sup>

Примечание. Используемые сокращения:  $\Delta F_{\max}$  – величины максимума тушения собственной флуоресценции мембранных белков;  $c_f$  – удельные концентрации гормонов, при которых наступают максимумы тушения; \* – измеряли максимум тушения интенсивности возбуждения флуоресценции ( $\Delta D_{f\max}$ ) мембранных белков.

На рис. 1 видно, что при добавлении кортизола и ДЭА к взвеси мембран эритроцитов тушение собственной флуоресценции мембранных белков  $\Delta F$  увеличивалось почти линейно, при концентрации гормона  $c_f$  – достигало своего максимума, при дальнейшем увеличении концентрации гормона во взвеси  $\Delta F$  изменялось слабо (рис. 1, а и б).

Подобные результаты дали измерения величины тушения собственной флуоресценции  $\Delta F$  мембранных белков при инкубации мембран с тестостероном и андростероном (табл. 1). При инкубации мембран с адреналином измерялась зависимость величины тушения возбуждения флуоресценции  $\Delta D_f$  мембранных белков при  $\lambda = 228$  нм (длина волны излучения – 332 нм) от концентрации адреналина. При добавлении адреналина к взвеси мембран эритроцитов  $\Delta D_f$  увеличивалась почти линейно вплоть до концентрации адреналина  $c_D = (2,00 \pm 0,12) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка. Значение максимума тушения интенсивности возбуждения флуоресценции  $\Delta D_{f\max} = (0,150 \pm 0,008)$ . При дальнейшем увеличении концентрации адреналина величина  $\Delta D_f$  менялась слабо. Результаты измерений представлены в табл. 1.

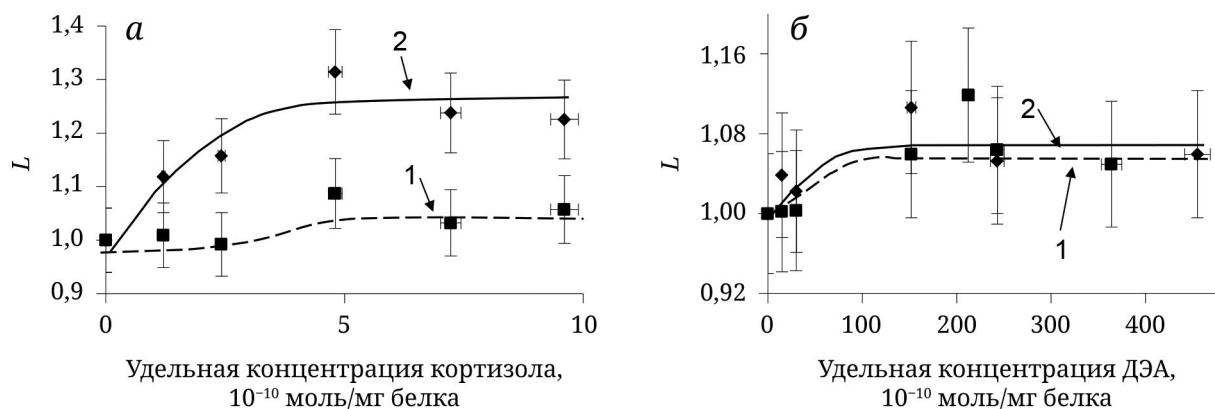
Значения  $\Delta F_{\max}$  мембранных белков статистически значимо отличаются от  $\Delta F$  этих белков, когда во взвеси мембран нет гормонов. Величина максимума снижения относительной интенсивности собственной флуоресценции мембранных белков ( $\Delta F_{\max}$ ) и концентрация гормона ( $c_f$ ), при которых наступает максимум тушения, разные для разных гормонов (табл. 1). Когда мембранные белки взаимодействуют с гормонами, происходит изменение их конформации. Меняется микроокружение около радикалов мембранных белков, уменьшаются интенсивности испускания и возбуждения флуоресценции. При концентрации

гормонов во взвеси большей, чем  $c_f$  или  $c_D$ , когда испускание или возбуждение флуоресценции почти перестаёт меняться, конформация мембранных белков и микроокружение вокруг них также перестаёт изменяться (рис. 1; табл. 1).

**Результаты измерения микровязкости мембран.** Одной из характеристик мембран, которая меняется при изменении её структуры, является микровязкость её липидного бислоя [15]. На рис. 2, а и б приведены зависимости относительной микровязкости ( $L$ ) мембран эритроцитов от удельной концентрации кортизола и ДЭА соответственно. При взаимодействии мембран с кортизолом статистически значимое увеличение микровязкости липидного бислоя в белок-липидной области взаимодействия достигало 1,250 ± 0,075 по отношению к контрольным образцам, когда во взвеси мембран не добавлялся гормон (рис. 2, а; кривая 2). Она нарастала вплоть до концентрации гормона  $c_{\max} = (4,60 \pm 0,46) \cdot 10^{-10}$  моль/мг (рис. 2, а; кривая 2). Затем кривая микровязкости вышла на плато. Для области липид-липидных взаимодействий кривая микровязкости вела себя подобным образом, но увеличение было всего до 1,050 ± 0,063, значения микровязкости в этой области статистически значимо не отличались от таких же значений в контрольных образцах (рис. 2, а; кривая 1). Повышение микровязкости в липид-липидной области взаимодействий начиналось при большей концентрации кортизола  $(2,50 \pm 0,25) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка и достигало меньшей величины, чем в области белок-липидных взаимодействий (рис. 2, а; кривые 1 и 2).

Измерения микровязкости липидного бислоя в белок-липидной области взаимодействия, приведённые на рис. 2, являются ещё одним подтверждением, что в представленных экспериментах пирен внедрялся в мембранные белки. При длине волны возбуждения, равной 281 нм, в липидных бислоях, не содержащих белков, флуоресценция пирена не наблюдается [15]. В мембранах белки при длине волны возбуждения 281 нм флуоресцируют на длине волны 332 нм, что близко к длине волны максимума возбуждения флуоресценции пирена (336 нм). В представленных экспериментах молекулы пирена флуоресцировали при длине волны возбуждения 281 нм, что говорит о наличии мембранных белков в выделенных мембранах (рис. 2).

При сравнении рис. 1, а и 2, а видно, что диапазон концентрации кортизола во взвеси, при которой происходит изменение конформации мембранных белков, и диапазон концентрации кортизола, при которой микровязкость увеличивается и выходит на постоянное значение, совпадают. Это значит, что именно мембранные белки



**Рис. 2.** Зависимость относительной микровязкости мембран ( $L$ ) от удельной концентрации кортизола (а) и дегидроэпиандростерона (б). Кривая 1 – изменение относительной микровязкости в области липид-липидного взаимодействия; кривая 2 – изменение относительной микровязкости в области белок-липидного взаимодействия. ДЭА – дегидроэпиандростерон

являются инициаторами структурного перехода в мембранах при их взаимодействии с кортизолом. При этом микровязкость липидного бислоя в области липид-липидного взаимодействия увеличилась на меньшую величину (рис. 2, а; кривая 1), чем около мембранных белков, поменявших свою конформацию в результате взаимодействия с кортизолом (рис. 2, а; кривая 2). Это значит, что липиды стали сильнее притягиваться к этим белкам, их поверхностная плотность (число липидов на единицу площади мембраны) увеличилась. Как следствие, около этих белков меняется структура липидного бислоя, липиды из жидкно-неупорядоченного состояния переходят в жидкокоупорядоченное ( $L_d \rightarrow L_o$ ). Образуются белок-липидные домены. Такое изменение структуры ведёт к большему увеличению микровязкости липидного бислоя в белок-липидных доменах. Между доменами липидный бислой остаётся в жидкко-неупорядоченном состоянии ( $L_d$ ), его микровязкость и поверхностная плотность меньше, чем в доменах.

Взаимодействие мембран с ДЭА происходит качественно иначе. Под влиянием этого гормона микровязкость липидного бислоя мембран увеличивалась всего лишь до  $1,060 \pm 0,064$  по сравнению с контрольными образцами, к которым не добавляли гормон (рис. 2, б). Концентрация, при которой достигался максимум микровязкости, была равна  $c_{\max} = (1,70 \pm 0,17) \cdot 10^{-8}$  моль/мг белка (рис. 2, б). Кривые 1 и 2 на рис. 2, б очень близки, это говорит о том, что увеличение микровязкости липидного бислоя происходит на одну и ту же величину в белок-липидной и липид-липидной областях взаимодействия. Следовательно, в отличие от взаимодействия кортизола с мембранами, взаимодействие ДЭА с мембранами не ведёт к образованию белок-липидных доменов с разными поверхностными плотностями липидов в доменах и между доменами.

При взаимодействии мембран с андростероном, тестостероном и адреналином структура мембран меняется подобно взаимодействию мембран с кортизолом. В табл. 2 представлены результаты измерения микровязкости мембран эритроцитов при их инкубации с различными гормонами.

При взаимодействии мембран с андростероном их микровязкость в белок-липидной области взаимодействия увеличивалась до  $L_{\max} = 1,500 \pm 0,090$  по отношению к исходному состоянию ( $p < 0,05$ ; табл. 2). Она увеличивалась вплоть до концентрации  $c_{\max} = (2,50 \pm 0,25) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка, после чего не менялась. В липид-липидной области взаимодействия микровязкость увеличилась до  $L_{\max} = 1,250 \pm 0,075$  по отношению к исходному состоянию ( $p < 0,05$ ). Увеличение происходило вплоть до концентрации  $c_{\max} = (3,00 \pm 0,30) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка (табл. 2). Изменение конформации мембранных белков происходило вплоть до концентрации андростерона ( $c_F$ ) во взвеси ( $1,000 \pm 0,060) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка (табл. 1), которая меньше концентрации  $c_{\max}$  андростерона во взвеси, при которой относительная микровязкость мембраны достигала максимального значения (табл. 2). Это значит, что при взаимодействии андростерона с мембранами в них образуются белок-липидные домены, и именно мембранные белки являются инициаторами этого структурного перехода.

При добавлении тестостерона микровязкость мембран в области белок-липидных взаимодействий увеличивалась почти до  $L_{\max} = (1,200 \pm 0,072)$  (табл. 2). Увеличение микровязкости происходило до концентрации тестостерона во взвеси с мембранами, равной  $c_{\max} = (1,10 \pm 0,11) \cdot 10^{-9}$  моль/мг белка. В липид-липидной области взаимодействия микровязкость увеличивалась вплоть до концентрации  $c_{\max} = (2,00 \pm 0,20) \cdot 10^{-9}$  моль/мг белка и увеличилась до  $L_{\max} = (1,150 \pm 0,069)$  по отношению к исходному состоянию (табл. 2). Отсюда следует,

**Таблица 2.** Результаты измерения микровязкости мембран эритроцитов при их инкубации с различными гормонами

Гормон	Липид-липидная область взаимодействия		Белок-липидная область взаимодействия	
	$L_{max}$	$c_{max}$ , моль/мг белка	$L_{max}$	$c_{max}$ , моль/мг белка
ДЭА	1,060 ± 0,064	(1,70 ± 0,17)·10 <sup>-8</sup>	1,060 ± 0,064	(1,70 ± 0,17)·10 <sup>-8</sup>
Тестостерон	1,150 ± 0,069	(2,00 ± 0,20)·10 <sup>-9</sup>	1,200 ± 0,072*	(1,10 ± 0,11)·10 <sup>-9</sup>
Кортизол	1,050 ± 0,063	(4,60 ± 0,46)·10 <sup>-10</sup>	1,250 ± 0,075*	(4,60 ± 0,46)·10 <sup>-10</sup>
Адреналин	1,200 ± 0,072*	(2,00 ± 0,20)·10 <sup>-10</sup>	1,400 ± 0,084*	(2,00 ± 0,20)·10 <sup>-10</sup>
Андростерон	1,250 ± 0,075*	(3,00 ± 0,30)·10 <sup>-10</sup>	1,500 ± 0,090*	(2,50 ± 0,25)·10 <sup>-10</sup>

Примечание. Используемые сокращения:  $L_{max}$  – максимальное увеличение микровязкости липидного бислоя при добавлении гормонов;  $c_{max}$  – удельная концентрация гормонов во взвеси эритроцитов, при которой микровязкость мембран достигает максимального значения; ДЭА – дегидроэпиандростерон. Значения  $L_{max}$  и  $c_{max}$  даны для липид-липидных и белок-липидных областей взаимодействия. \*  $p < 0,05$  – статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем, когда во взвесь мембран не добавлялся гормон.

что, как и в случае с кортизолом и андростероном, при взаимодействии тестостерона с мембранными в них образуются белок-липидные домены. Сравнивая данные табл. 1 и 2, видно, что диапазон концентраций тестостерона, при которых происходили изменения конформации мембранных белков ( $c_f$ ) и увеличение микровязкости липидного бислоя в области белок-липидного взаимодействия  $c_{max}$ , совпадают. Таким образом, мембранные белки являются инициаторами образования в мемbrane белок-липидных доменов при взаимодействии мембран с тестостероном.

При взаимодействии мембран с адреналином в области белок-липидных взаимодействий происходило увеличение относительной микровязкости мембран ( $L$ ) до  $L_{max} = 1,400 \pm 0,084$  ( $p < 0,05$ ; табл. 2). Она увеличивалась до концентрации адреналина  $c_{max} = (2,00 \pm 0,20) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка, далее кривая микровязкости выходит на плато (табл. 2). В липид-липидной области взаимодействия микровязкость тоже увеличивалась вплоть до концентрации  $c_{max} = (2,00 \pm 0,20) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка, но увеличивалась только до  $L_{max} = 1,200 \pm 0,072$  по отношению к исходному состоянию ( $p < 0,05$ ; табл. 2), что говорит об образовании в мемbrane белок-липидных доменов. Сравнивая данные табл. 1 и 2, видно, что диапазон концентраций адреналина, при которых происходили изменения конформации мембранных белков ( $c_D$ ) и увеличение микровязкости липидного бислоя в области белок-липидного взаимодействия ( $c_{max}$ ), совпадают. Таким образом, мембранные белки являются инициаторами образования в мемbrane белок-липидных доменов при взаимодействии мембран с адреналином.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что при взаимодействии кортизола, андростерона, тестостерона и адреналина с мембранными структурами плазмолемм меняется, в них образуется сеть белок-липидных доменов. В отличие от взаимодействия с этими гормонами, взаимодействие ДЭА с мембранными не ведёт к образованию белок-липидных доменов, а происходит равномерное увеличение поверхностной плотности липидного бислоя по всей мембране. Причину разного взаимодействия ДЭА и остальных гормонов (кортизола, андростерона, тестостерона, адреналина) с мембранными можно установить с помощью изучения изменения вторичной структуры мембранных белков при их взаимодействии с гормонами методом ИК-спектроскопии. Это сделано в следующем подразделе.

**Результаты измерения поглощения мембранами инфракрасного излучения.** Диагностика ИК-спектроскопии основывается на законе Бугера–Ламберта–Бера [20]. Измеряется поглощение образца:

$$A = \lg(I_0/I), \quad (7)$$

где  $I_0$  – интенсивность электромагнитного излучения, попадающего в образец,  $I$  – интенсивность излучения, пропущенного образцом.

Измерив поглощение  $A$ , можно оценить концентрацию поглощающих центров ( $c_0$ ), которая связана с  $A$  соотношением:

$$A = \varepsilon c_0 \ell_0, \quad (8)$$

где  $\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощения;  $\ell_0$  – толщина образца.

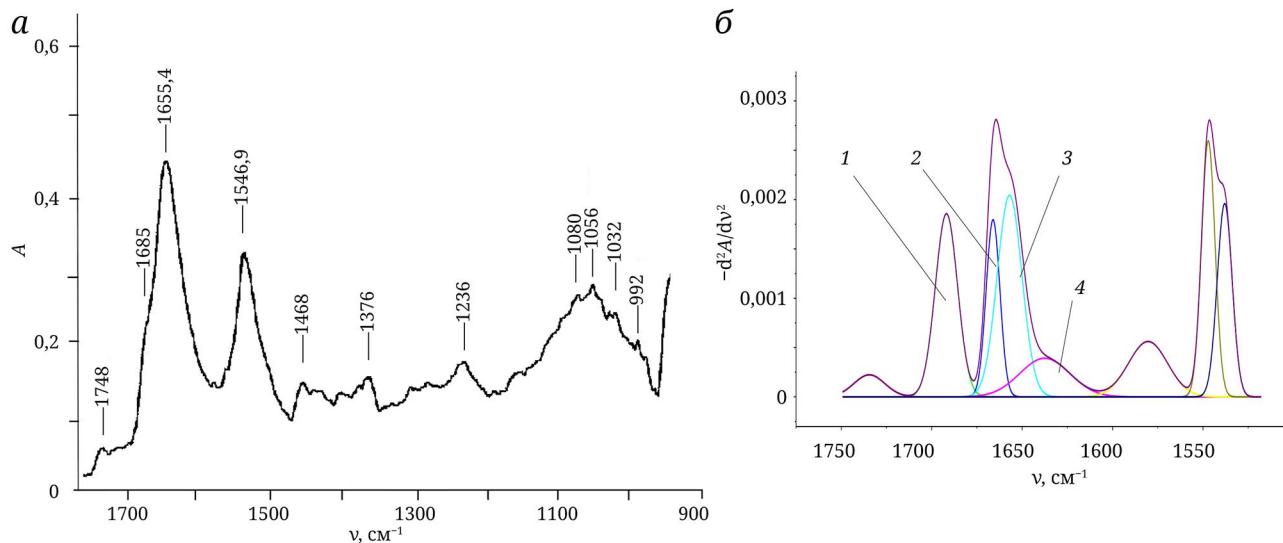
При добавлении гормонов к мембранам изменяются взаимодействия между функциональными группами молекул белков и липидов мембранны. Между ними образуются новые водородные связи. Всё это приводит к сдвигам частот, на которых наблюдаются максимумы поглощения электромагнитного излучения функциональными группами, входящими в состав мембранных белков и липидов. Изменяется интенсивность этих полос поглощения, согласно формуле (8). Выделение полос поглощения, соответствующих разным функциональным группам молекул, проводилось по методикам, описанным в работах Yang et al. [20], Barth и Zscherp [21] и Носенко и др. [22].

При проведении трёх независимых измерений ИК-спектра одного и того же образца для каждого измерения проводилось вычисление второй производной ИК-спектра в области амид I с помощью программы OriginPro 2021. Эта вторая производная слаживалась с помощью процедуры быстрого преобразования Фурье. Для удобства разложения вторые производные ИК-спектров умножались на (-1). После этого слаженная вторая производная ИК-спектра разлагалась на отдельные полосы. Каждая полоса представляет собой функцию Гаусса со своим среднеквадратическим отклонением и математическим ожиданием, которые подбирались так, что сумма этих полос была равна второй производной ИК-спектра. По площадям отдельных полос в разложении второй производной спектра поглощения определялись доли вторичных структур мембранных белков. Используя распределение Стьюдента, определялись оценка и доверительные границы погрешности оценки долей вторичных структур мембран-

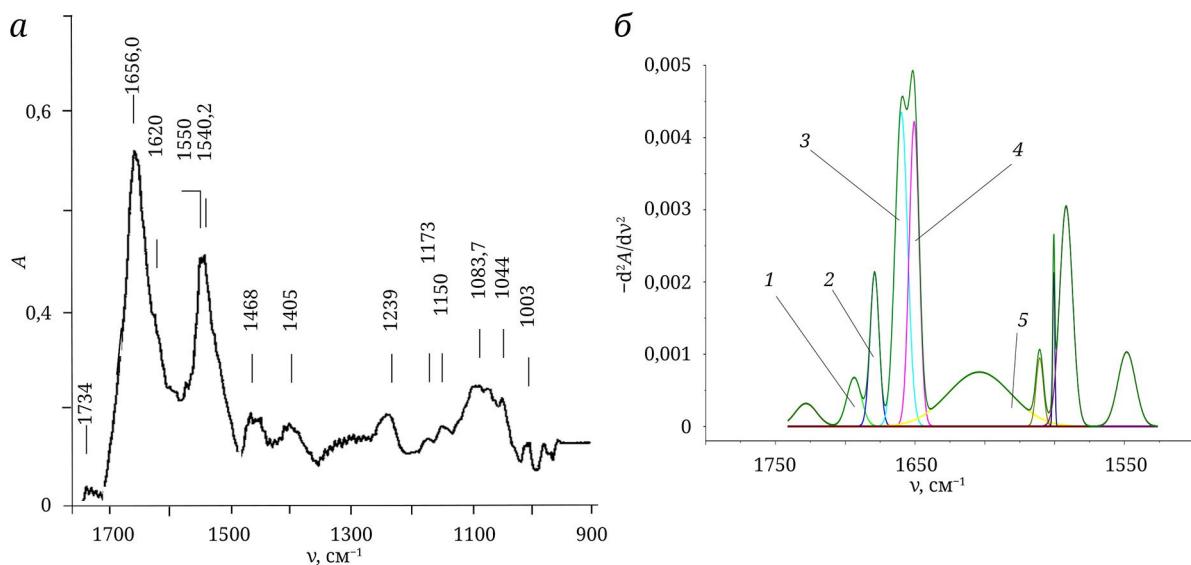
ных белков при доверительной вероятности 0,95. Оценку различий между выборками проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Методика обработки спектров описана в работах Yang et al. [20], Носенко и др. [22].

Спектр поглощения контрольных образцов (мембранны, не инкубированных с гормонами) приведён на рис. 3, а. На рис. 3, б приведено разложение второй производной спектра поглощения контрольных образцов в области частот амид I. На рис. 4, а приведён спектр поглощения мембранны, инкубированных с кортизолом, его концентрация в плёнке  $c = (2,100 \pm 0,063) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка. На рис. 4, б приведено разложение второй производной спектра поглощения образцов мембранны, инкубированных с кортизолом ( $c = (2,100 \pm 0,063) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка), в области частот амид I. На рис. 5, а приведён спектр поглощения мембранны, инкубированных с ДЭА, его концентрация в плёнке  $c = (5,30 \pm 0,16) \cdot 10^{-11}$  моль/мг белка. На рис. 5, б приведено разложение второй производной спектра поглощения образцов мембранны, инкубированных с ДЭА ( $c = (5,30 \pm 0,16) \cdot 10^{-11}$  моль/мг белка), в области частот амид I. На этих рисунках цифрами указаны номера полос, на которые разложены вторые производные спектров поглощения мембранны. Указаны названия и доли в процентах вторичных структур мембранных белков, соответствующие этим полосам.

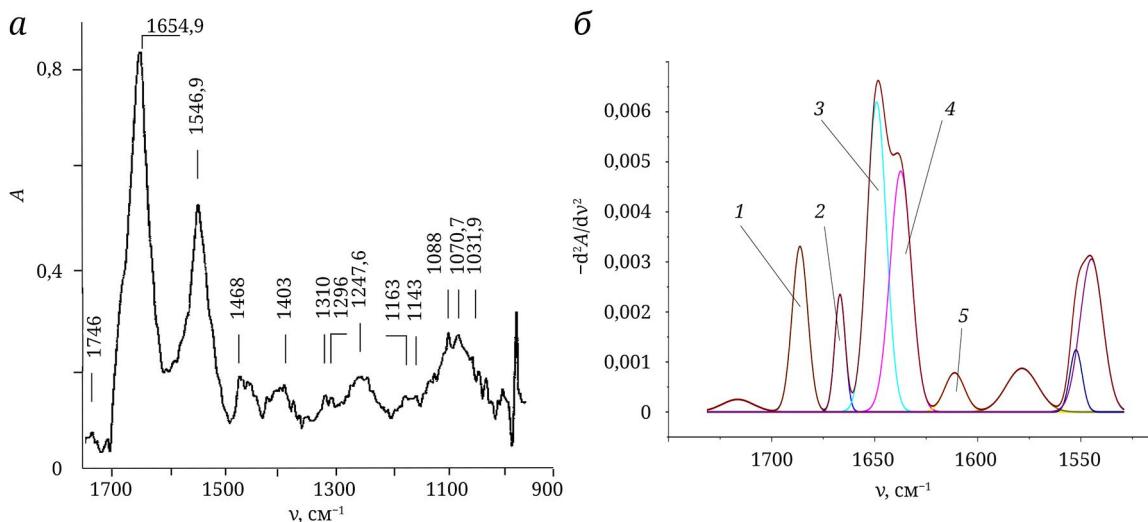
В табл. 3 приведены характерные частоты спектров поглощения мембранны эритроцитов крыс после их взаимодействия с ДЭА, андростероном, тестостероном, кортизолом и адреналином.



**Рис. 3.** ИК-спектр поглощения контрольных (без гормонов) образцов мембранны эритроцитов крыс в диапазоне  $\nu = 900$ – $1800$   $\text{см}^{-1}$  (а); разложение второй производной ИК-спектра поглощения контрольных образцов мембранны эритроцитов крыс в области частот амид I (б): 1 –  $\beta$ -лист (30,3%); 2 –  $3_{10}$   $\alpha$ -структур (18,2%); 3 –  $\alpha$ -структур (37,1%); 4 – неупорядоченная структура (14,4%)



**Рис. 4.** ИК-спектр поглощения образцов мембран эритроцитов крыс, инкубированных с кортизолом ( $c = (2,100 \pm 0,063) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка) в диапазоне  $\nu = 900$ – $1800$  см $^{-1}$  (а); разложение второй производной ИК-спектра поглощения образцов мембран эритроцитов крыс, инкубированных с кортизолом ( $c = (2,100 \pm 0,063) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка) в области частот амид I (б): 1 –  $\beta$ -лист (5,6%); 2 –  $\beta$ -поворот (11%); 3 –  $3_{10}$   $\alpha$ -структура (31,6%); 4 –  $\alpha$ -структуря (24,2%); 5 – межмолекулярные  $\beta$ -листы (27%)



**Рис. 5.** ИК-спектр поглощения образцов мембран эритроцитов крыс, инкубированных с ДЭА ( $c = (5,30 \pm 0,16) \cdot 10^{-11}$  моль/мг белка) в диапазоне  $\nu = 900$ – $1800$  см $^{-1}$  (а); разложение второй производной ИК-спектра поглощения образцов мембран эритроцитов крыс, инкубированных с ДЭА ( $c = (5,30 \pm 0,16) \cdot 10^{-11}$  моль/мг белка) в области частот амид I (б): 1 –  $\beta$ -лист (15,6%); 2 –  $3_{10}$   $\alpha$ -структура (7,6%); 3 –  $\alpha$ -структуря (37,1%); 4 – неупорядоченная структура (35,5%); 5 – межмолекулярные  $\beta$ -листы (4,2%). ДЭА – дегидроэпиандростерон

На рис. 3, а приведён спектр поглощения контрольных образцов мембран (мембранные, не взаимодействующие с гормонами). Анализ полосы амид I (рис. 3, б) показал, что, наряду с неупорядоченной структурой, доля которой в мембранных белках составляет  $(14,4 \pm 1,0)\%$ , в белках мембран эритроцитов крыс присутствуют  $\alpha$ -спирали, доля которых в мембранных белках составляет  $(55,3 \pm 2,6)\%$ . Имеются также  $\beta$ -структуры, доля которых в мембранных белках составляет  $(30,3 \pm 1,4)\%$ . В полосе амид II,

создаваемой деформационными колебаниями NH-связи, присущей  $\beta$ -структуре, есть максимум на  $1546,9$  см $^{-1}$  (рис. 3, а; табл. 3). Мембранные фосфолипиды тоже имеют ряд характерных полос поглощения, в частности, для валентных колебаний C=O-связи –  $1748$  см $^{-1}$ , асимметричных колебаний PO<sub>2</sub>-связи –  $1236$  см $^{-1}$ , валентных колебаний P–O–C-связи –  $1056$  см $^{-1}$  (рис. 3, а; табл. 3). Необходимо отметить, что полоса максимума поглощения C=O-связи  $1748$  см $^{-1}$  довольно узкая, это даёт основание предполагать, что фосфолипиды

**Таблица 3.** Характерные частоты спектров поглощения мембран эритроцитов крыс после их взаимодействия со стероидными гормонами

Гормон и его концентрация с, моль/мг белка	Частоты валентных колебаний пептидной C=O-группы $\nu_{CO}$ , см <sup>-1</sup>	Частоты деформационных колебаний пептидных NH-связей $\nu_{NH}$ , см <sup>-1</sup>	Частоты валентных колебаний фосфолипидных C=O-связей $\nu_{C=O}$ , см <sup>-1</sup>	Частоты валентных колебаний		Частоты валентных колебаний фосфолипидных PO <sub>2</sub> -связей $\nu_{PO_2}$ , см <sup>-1</sup>	Частоты валентных колебаний фосфолипидных PO <sub>2</sub> -связей $\nu_{PO_2}$ , см <sup>-1</sup>	Частоты валентных колебаний CН-связей $\nu_{CH}$ , см <sup>-1</sup>
				асимметричных колебаний фосфолипидных PO <sub>2</sub> -связей	симметричных фосфолипидных PO <sub>2</sub> -связей			
Контроль	1686 1655,4	1546,9	1748	1236	1080	1056	2948 2930,8 2848	2948 2930,8 2848
ДЭА (5,3·10 <sup>-11</sup> )	1654,9	1546,9	1746	1247,6	1088	1070,7	2956,3 2925,8 2851,8	2956,3 2925,8 2851,8
Андростерон (5,5·10 <sup>-11</sup> )	1656 1635 1620	1545		1260 1240	1098 1088		2958 2928 2848	2958 2928 2848
Тестостерон (5,5·10 <sup>-11</sup> )	1684 1657 1632	1545	1739,4	1247 1236	1100 1088	1065 1056	2956,4 2924 2850	2956,4 2924 2850
Кортизол (2,1·10 <sup>-10</sup> )	1656,0 1620	1550 1540,2	1734	1239	1083,7	1044,0	2962 2925 2852	2962 2925 2852
Адреналин (2·10 <sup>-10</sup> )	1686 1656 1646	1544 1525	1740	1256 1248 1236	1096 1080	1070 1060 1044	2956 2924 2852	2956 2924 2852

**Таблица 4.** Влияние гормонов на содержание элементов вторичной структуры мембранных белков

Гормон и его концентрация (с), моль/мг белка	R – неупорядоченные структуры, %	$\alpha$ -спирали, %	$\beta$ -структуры, %
Контроль	14,4 ± 1,0	55,3 ± 2,6	30,3 ± 1,4
ДЭА ((5,30 ± 0,16)·10 <sup>-11</sup> )	35,5 ± 1,6*	44,7 ± 2,1*	19,8 ± 1,0*
Кортизол ((2,100 ± 0,063)·10 <sup>-10</sup> )	< 0,1*	55,9 ± 2,6	44,1 ± 2,1*
Тестостерон ((5,50 ± 0,17)·10 <sup>-11</sup> )	9,8 ± 1,0*	55,9 ± 2,7	34,3 ± 1,6*
Адреналин ((2,000 ± 0,060)·10 <sup>-10</sup> )	< 0,1*	49,8 ± 2,2	50,2 ± 2,6*

Примечание. \*  $p < 0,05$  – статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем.

достаточно упорядочены на уровне сложноэфирных связей высших карбоновых кислот и глицерина (рис. 3, а).

На рис. 4, а приведён ИК-спектр поглощения мембран эритроцитов крыс, проинкубированных с кортизолом. Удельная концентрация гормона в образце –  $(2,100 \pm 0,063) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка. Известно, что кортизол является гидрофобным соединением, он плохо растворим в воде. Однако в его структуре присутствуют 3 OH-группы (в положениях 11, 17 и 21) и 2 кетогруппы в положениях 3 и 20 [4], именно они принимают участие в образовании водородных связей с CO- и NH-группами мембранных белков и фосфолипидов. Это видно по смещению максимума поглощения валентных колебаний пептидной CO-связи  $1655,4 \rightarrow 1656 \text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует о структурных переходах в мембранных белках. Появление полосы поглощения валентных колебаний CO-связи  $1620 \text{ см}^{-1}$  соответствует появлению межмолекулярных  $\beta$ -листов [20] (рис. 4, а и б). Расщепление полосы деформационных колебаний NH-связи  $1546,9 \rightarrow 1550$  и  $1540,2 \text{ см}^{-1}$  тоже говорит о появлении новых водородных связей между пептидными группами CO и NH [21] и появлении новых  $\beta$ -структур в мембранных белках (рис. 4, а и б; табл. 3). Подтверждается этот вывод расчётом долей вторичных структур мембранных белков при взаимодействии мембран с гормонами (табл. 4).

Из табл. 4 видно, что при взаимодействии мембран с кортизолом при его удельной концентрации во взвеси  $(2,100 \pm 0,063) \cdot 10^{-10}$  моль/мг белка увеличивается доля  $\beta$ -структур (с  $(30,3 \pm 1,4)$  до  $(44,1 \pm 2,1)\%$ ), по сравнению с контрольными измерениями, и уменьшается доля неупорядоченных структур с  $(14,4 \pm 1,0)\%$  почти до нуля. Доля  $\alpha$ -спиралей не меняется. Таким образом, в мембранах происходит переход неупорядоченная структура  $\rightarrow \beta$ -структура. По сравнению с контрольными образцами произошло увеличение доли межмолекулярных  $\beta$ -листов с 0 до  $(27,4 \pm 2,0)\%$  (рис. 3, б и 4, б). Это указывает на агрегацию мембранных белков, которая способствует образованию белок-липидных доменов.

При взаимодействии кортизола с мембранами увеличивается и упорядоченность липидного бислоя. Об этом свидетельствует сдвиг полосы поглощения C=O-связи сложноэфирной группы фосфолипидов  $1748 \rightarrow 1734 \text{ см}^{-1}$  (рис. 4, а; табл. 3). Сдвиг полосы поглощения симметричных валентных колебаний PO<sub>2</sub>-связи фосфолипидов  $1080 \rightarrow 1083,7 \text{ см}^{-1}$  и сдвиг полосы асимметричных валентных колебаний PO<sub>2</sub>-связи  $1236 \rightarrow 1239 \text{ см}^{-1}$  (рис. 4, а) связан с процессом дегидратации фосфолипидов в результате увеличения их упорядоченности [23]. При этом возрастает относительная микровязкость мембраны

в белок-липидной области взаимодействия, по сравнению с контролем, до  $1,050 \pm 0,063$ ; в области липид-липидного взаимодействия микровязкость не меняется (рис. 2, а). Таким образом, в мембране происходит образование белок-липидных доменов, в которых поверхностная плотность липидов выше, чем между доменами (рис. 2, а), за счёт образования белок-белковых сшивок и новых белок-липидных связей.

Гормоны андростерон и адреналин меняют структуру мембран подобным образом (табл. 3 и 4). Их взаимодействие вызывает сдвиг полос поглощения в полосе амид I и амид II (табл. 3), что свидетельствует об изменении вторичной структуры мембранных белков. Фиксируется увеличение интенсивности полосы поглощения валентных колебаний CO-связи  $1620 \text{ см}^{-1}$ , что соответствует появлению межмолекулярных  $\beta$ -листов [22] (табл. 3). По сравнению с контролем, в мембранных белках увеличивается доля  $\beta$ -структур в результате перехода неупорядоченная структура  $\rightarrow \beta$ -структура (табл. 4). Доля  $\alpha$ -структур статистически достоверно не меняется (табл. 4).

При взаимодействии андростерона, тестостерона и адреналина с мембранами увеличивается упорядоченность липидного бислоя за счёт усиления белок-липидных и липид-липидных взаимодействий (табл. 3). При этом относительная микровязкость мембранны в белок-липидной области взаимодействия возрастает на большую величину, чем в области липид-липидного взаимодействия (табл. 2), что говорит об образовании в мембране белок-липидных доменов. Таким образом, увеличение во вторичной структуре мембранных белков доли  $\beta$ -структур ведёт к образованию в мембране белок-липидных доменов, в которых поверхностная плотность липидов выше, чем между ними.

По-другому взаимодействует с мембранами ДЭА. На рис. 5, а приведён ИК-спектр поглощения мембран эритроцитов крыс, проинкубированных с ДЭА. Концентрация гормона в плёнке равна  $(5,30 \pm 0,16) \cdot 10^{-11}$  моль/мг белка; видно, что не произошло смещения полосы  $1546,9 \text{ см}^{-1}$ , что при сущем появлению новых  $\beta$ -структур белков. Действительно, из табл. 4 и рис. 5, б видно, что доля  $\beta$ -структур мембранных белков при взаимодействии мембран с ДЭА уменьшилась (с  $(30,3 \pm 1,4)$  до  $(19,8 \pm 1,0)\%$ ). При этом, по сравнению с контролем, увеличилась доля неупорядоченных структур (с  $(14,4 \pm 1,0)$  до  $(35,5 \pm 1,6)\%$ ). Доля  $\alpha$ -спиралей уменьшилась с  $(55,3 \pm 2,6)$  до  $(44,7 \pm 2,1)\%$ . Это значит, что при взаимодействии ДЭА с мембранами, в отличие от взаимодействия с кортизолом, андростероном, тестостероном и адреналином, в мембранных белках не происходил переход

неупорядоченная структура  $\rightarrow \beta$ -структур, а на-  
против, происходили переходы  $\beta$ -структура  $\rightarrow$  не-  
упорядоченная структура и  $\alpha$ -спираль  $\rightarrow$  неупо-  
рядоченная структура. Изменение конформации  
мембранных белков при этом подтверждается  
уменьшением интенсивности их собственной  
флуоресценции (рис. 1, б; табл. 1).

На увеличение упорядоченности липид-  
ного бислоя при взаимодействии ДЭА с мембра-  
нами указывают следующие результаты анализа  
ИК-спектров мембран. Наблюдается сдвиг полосы  
поглощения асимметричных валентных колебаний  
 $\text{PO}_2$ -связи  $1236 \rightarrow 1247,6 \text{ см}^{-1}$ , который отра-  
жает дегидратацию фосфатных групп фосфолипи-  
дов (рис. 5, а; табл. 3). Кроме этого, появился сдвиг  
частоты  $\text{C=O}$ -связи фосфолипидов  $1748 \rightarrow 1732 \text{ см}^{-1}$ ,  
интенсивность данной полосы также увеличи-  
лась (рис. 5, а; табл. 3). Однако увеличение упоря-  
доченности липидного бислоя при его взаимодей-  
ствии с ДЭА вело лишь к небольшому увеличению  
микровязкости бислоя (рис. 2, б; табл. 2). Самое  
главное, взаимодействие ДЭА с мембранами не  
вело к образованию белок-липидных доменов, а  
происходило равномерное увеличение поверх-  
ностной плотности липидного бислоя по всей  
мемbrane (рис. 2, б).

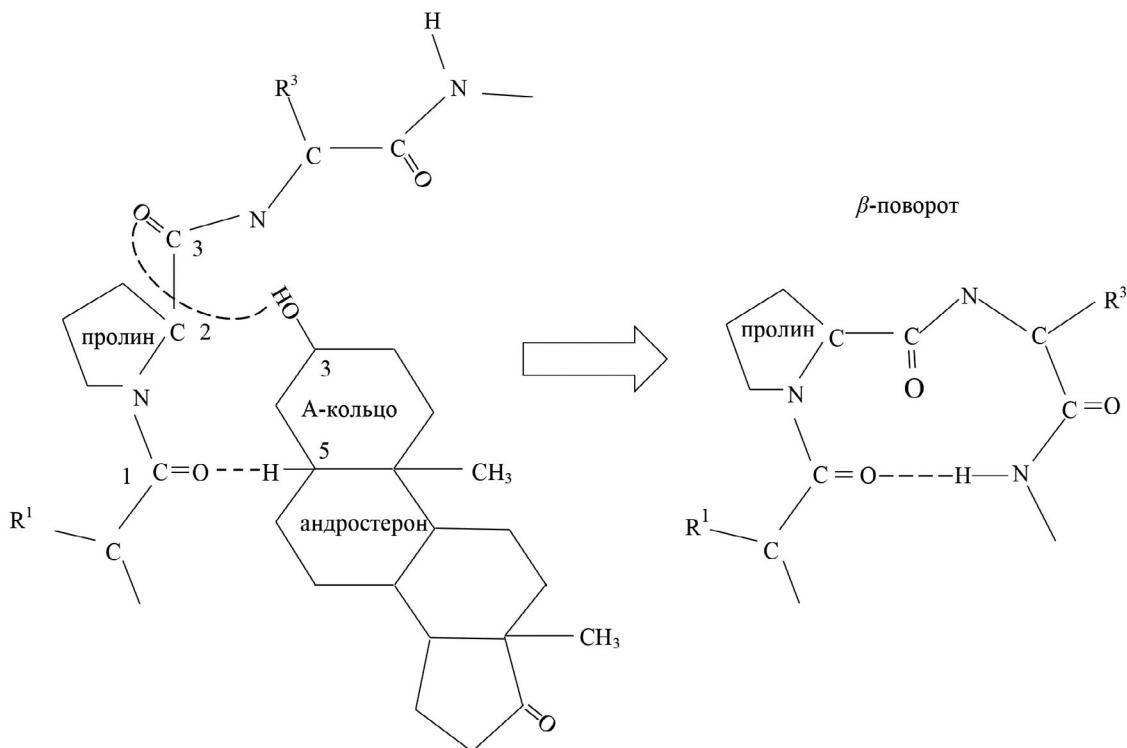
Таким образом, при взаимодействии мембран  
с андростероном, тестостероном, кортизолом и адре-  
налином в мембранных белках происходило об-  
разование новых  $\beta$ -структур (рис. 3, 4; табл. 3 и 4).  
При увеличении концентрации этих гормонов во  
взвеси увеличение микровязкости в белок-липид-  
ной области взаимодействия было больше увели-  
чения микровязкости липидного бислоя в липид-  
липидной области (рис. 2, а; табл. 2). Это значит,  
что увеличение поверхностной плотности липи-  
дов около мембранных белков больше, нежели в  
липид-липидной области взаимодействия. В мем-  
бране происходило образование белок-липидных  
доменов, в которых липидный бислоем имеет  
большую поверхностную плотность, чем между  
доменами. При взаимодействии мембран с ДЭА  
в мембранных белках доли  $\beta$ -структур и  $\alpha$ -спи-  
ралей уменьшались (рис. 5, а; табл. 3 и 4). При  
этом увеличение микровязкости мембран проис-  
ходило равномерно по всей мемbrane (рис. 2, б;  
табл. 2), образования белок-липидных доменов  
не происходило.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из данных, описанных в предыдущих разде-  
лах, следует, что при взаимодействии гормонов  
с мембранами за образование белок-липидных  
доменов в плазматических мембранах ответ-  
ственны не  $\alpha$ -спирали, а  $\beta$ -структуры мембранных

белков, образующиеся при их взаимодействии.  
Связано это с тем, что, во-первых, появившиеся  
в результате изменения вторичной структуры  
мембранных белков  $\beta$ -структуры образуют меж-  
молекулярные сшивки между мембранными  
белками (рис. 3, б и 4, б). В результате увеличе-  
ния числа водородных связей между мембранны-  
ми белками происходит их агрегация [24–26].  
Таким образом, в мембране создаются кластеры  
из белков и окружающих их липидов. Во-вторых,  
в  $\beta$ -структуре мембранных белков алифатиче-  
ские боковые цепи незаряженных аминокислот  
располагаются напротив углеводородных цепей  
мембранных липидов, ароматические группы  
пептидов предпочитают взаимодействовать с кар-  
бонильными группами окружающих липидов, а  
полярные группы пептидов взаимодействуют с  
заряженными липидными головными группами [27, 28]. Это стимулирует притяжение липидов  
к белкам. В результате действия этих двух меха-  
низмов образуются белок-липидные домены, в  
которых липиды около мембранных белков совер-  
шают переход из жидкое-неупорядоченного состоя-  
ния в жидкое-упорядоченное ( $L_d \rightarrow L_o$ ). Следствием  
появления доменов является увеличение микро-  
вязкости и поверхностной плотности липидного  
бислоя в доменах. Между доменами липидный  
бислоем имеет меньшую микровязкость и поверх-  
ностную плотность.

Каким образом некоторые гормоны способ-  
ствуют образованию  $\beta$ -структур в мембранных  
белках? Рассмотрим взаимодействия с мембраной  
ДЭА и андростерона. Связывание андростерона с  
мембраной приводит к увеличению доли  $\beta$ -стру-  
ктур в мембранных белках (табл. 3) и образованию  
в мембране белок-липидных доменов (табл. 2).  
С другой стороны, при связывании ДЭА с мем-  
бранами эти домены не образовывались (табл. 2),  
поскольку доля  $\beta$ -структур в мембранных белках  
при этом уменьшалась (рис. 5, а; табл. 4). При-  
чину такого различного взаимодействия ДЭА и  
андростерона с мембранами нужно искать в их  
структуре. Различие в структуре этих гормонов  
заключается лишь в том, что у андростерона к  
атому углерода в А-кольце в положении 5 присо-  
единён водород, а у ДЭА он отсутствует [4]. Такое  
различие в строениях ДЭА и андростерона позво-  
ляет сформулировать механизм  $\beta$ -поворота в молекуле  
пептида. Можно заключить, что наличие  
у андростерона Н-группы у атома C5 способству-  
ет образованию таких связей с молекулой про-  
теина, появление которых ведёт к образованию  
 $\beta$ -поворотов и созданию в молекуле  $\beta$ -структур.  
На рис. 6 показан механизм образования этого  
 $\beta$ -поворота. Здесь молекула андростерона присо-  
единяется к молекуле пептида с помощью водо-  
родных связей (рис. 6, левая часть). Атом углерода,



**Рис. 6.** Механизм  $\beta$ -поворота и образования из пептидной нити  $\beta$ -структуре при помощи молекулы андростерона

находящийся в А-кольце андростерона в положении 5, через присоединённую Н-группу образует водородную связь с СО-группой номер 1 в пептидной цепи (рис. 6, левая часть). Кроме этого, атом углерода в А-кольце андростерона в положении 3 через присоединённую ОН-группу образует водородную связь с СО-группой номер 3 в пептидной цепи (рис. 6, левая часть). В результате образования этих водородных связей происходит поворот С–С-связи между атомами 2 и 3 молекулы пептида. Этот поворот ведёт к  $\beta$ -повороту молекулы пептида (рис. 6, правая часть). В молекуле ДЭА, в которой нет Н-группы у атома С5 в А-кольце, не образуется водородная связь между этим С5-атомом и СО-группой номер 1 в пептидной цепи. В результате не происходит поворота С–С-связи между атомами 2 и 3 молекулы пептида, не возникает  $\beta$ -поворот молекулы пептида, вторичная  $\beta$ -структура молекулы белка не образуется.

Явления, подобные образованию белок-липидных доменов в плазматических мембранах, наблюдаются и в других случаях. Известно, например, что в тканях организма могут появляться белковые структуры, названные амилоидными фибриллами [29]. Они представляют собой уложенные в стопку антипараллельные  $\beta$ -структуры, направленные перпендикулярно оси фибриллы [30]. Процесс образования этих амилоидных фибрилл начинается с образования протофибриллярных образований, богатых  $\beta$ -структурными [29],

подобно образованию белок-липидных доменов в мембранах, описанных выше. Образование нерасстворимых фибрилл  $\beta$ -амилоида в тканях головного мозга сопровождает многие нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна [29].

Взаимодействие между белковыми нитями, свёрнутыми в  $\alpha$ -спирали, имеет другой характер. На основании компьютерных расчётов свободной энергии спонтанной ассоциации трансмембранных  $\alpha$ -спиралей показано, что липиды вносят более значительный вклад в энергию димеризации, в то время как контакты аминокислотных остатков часто являются невыгодными [31, 32]. Это значит, что  $\alpha$ -спиралы препятствуют агрегации белков и образованию в мемbrane белок-липидных доменов. В свою очередь, это препятствует увеличению микровязкости липидного бислоя. Более того, увеличение доли  $\alpha$ -спиралей в мембранных белках может привести к уменьшению микровязкости липидного бислоя мембран. Известны соединения, которые при взаимодействии с мембраной уменьшают её микровязкость, т.е. разрыхляют липидный бислон. Таким соединением является, например, белок-транспортер apo A-1 [33]. Ранее было показано, что нативный apo A-1, находясь в составе липопротеина высокой плотности (ЛПВП), имеет в своей вторичной структуре до 85%  $\alpha$ -спиралей [34]. С помощью ЛПВП происходит обратный захват холестерина из клеток и дальнейший

перенос его в печень [35, 36]. Для этого необходимо разрыхление липидного бислоя. Это явление было обнаружено при инкубации нативного апо A-1 с мембранными эритроцитами. Относительная микропропицаемость мембран при взаимодействии с нативным апо A-1 понижалась на 15% [33]. Понижение микропропицаемости происходило почти одинаково и в области липид-липидного взаимодействия, и в области белок-липидного взаимодействия [33]. Это обусловлено неспецифическим взаимодействием  $\alpha$ -спиралей апо A-1 с белками и липидами мембраны, в результате которых происходит разрыв водородных связей между белками и липидами мембраны.

Явление разрыва водородных связей между молекулами при их взаимодействии с  $\alpha$ -спиральами апо A-1 было открыто ранее группой под руководством академика Л.Е. Панина с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния [37]. Было показано, что взаимодействие комплекса тетрагидрокортизол-апо A-1 и эукариотических ДНК приводит к разрыву водородных связей между парами азотистых оснований и образованию однонитевых структур ДНК [37]. Подобным образом и в цитоплазматической мемbrane апо A-1 разрывает водородные связи между мембранными белками и создаёт в них структурные переходы  $\beta$ -структур  $\rightarrow$  неупорядоченные структуры и  $\alpha$ -спиралей  $\rightarrow$  неупорядоченные структуры, что ведёт к уменьшению взаимодействий между белками и липидами мембраны. Вследствие этого микропропицаемость липидного бислоя уменьшается [33].

Окислительно-модифицированный апо A-1 не меняет микропропицаемость мембран [33]. Причина существования качественно разных механизмов взаимодействий нативного и окислительно-модифицированного апо A-1 заключается в их разных вторичных структурах. Ранее в работе Дударева и др. [38] было установлено, что, по сравнению с нативной конформацией, в окислительно-модифицированном апо A-1 уменьшается доля  $\alpha$ -спиралей с 48% до 31% и увеличивается доля  $\beta$ -структур с 33% до 49%. Образовавшиеся  $\beta$ -структуры окислительно-модифицированных белков апо A-1 усиливают взаимодействие между ними и липидами мембраны, создают новые водородные связи с функциональными группами фосфолипидов, компенсируя разрыв этих связей  $\alpha$ -спиральами апо A-1. В результате микропропицаемость мембран при взаимодействии с ними окислительно-модифицированных апо A-1 не меняется [33].

Известно, что перспективными лекарствами для лечения болезни Альцгеймера являются молекулы, которые при взаимодействии с амилоидами фибрилл способны уменьшать в них долю  $\beta$ -структур или препятствовать образованию в них новых  $\beta$ -структур [39, 40]. Поскольку при

неспецифическом взаимодействии  $\alpha$ -спиралей нативных апо A-1 с мембранными белками доля  $\beta$ -структур в мембранных белках уменьшается за счёт разрыва водородных связей между пептидными нитями мембранных белков, то нативный апо A-1 может быть одним из кандидатов на лекарство для лечения и профилактики болезни Альцгеймера.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Флуоресцентным методом измерения относительной микропропицаемости мембран с помощью зонда пирен было установлено, что при взаимодействии кортизола, андростерона, тестостерона и адреналина с мембранными структурами плазмалеммы меняется, в них образуется сеть белок-липидных доменов. В этих неподвижных доменах поверхностная плотность липидов выше, чем между доменами. В то же время при взаимодействии ДЭА с мембранными не происходит образования в мембранах белок-липидных доменов. Причину разного взаимодействия гормонов с мембранными удалось выяснить с помощью ИК-спектроскопии мембран. Оказалось, что при взаимодействии кортизола, андростерона, тестостерона и адреналина с мембранными происходит увеличение доли  $\beta$ -структур и уменьшение доли неупорядоченных структур в мембранных белках. Однако при взаимодействии ДЭА с мембранными происходит уменьшение долей  $\beta$ -структур и  $\alpha$ -спиралей во вторичных структурах мембранных белков. Увеличивалась лишь доля неупорядоченных структур во вторичных структурах мембранных белков.

Таким образом, установлено *in vitro*, что инициаторами появления белок-липидных доменов в плазматических мембранах являются мембранные белки, в которых после взаимодействия с гормонами увеличивается доля  $\beta$ -структур. При этом появление новых  $\alpha$ -спиралей в мембранных белках не усиливает взаимодействие между белками, белок-липидные домены не образуются. Напротив, появление большого числа  $\alpha$ -спиралей в мембранных белках может привести к уменьшению микропропицаемости липидного бислоя.

**Вклад авторов.** В.Я. Рудяк, П.В. Мокрушников – концепция и руководство работой; П.В. Мокрушников – проведение экспериментов; В.Я. Рудяк, П.В. Мокрушников – обсуждение результатов исследования; П.В. Мокрушников – написание текста; В.Я. Рудяк – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-19-00043).

**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 утвержденным правовыми актами РФ и международных организаций.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боровская М. К., Кузнецова Э. Э., Горохова В. Г., Корякина Л. Б., Курильская Т. Е., Пивоваров Ю. И. (2010) Структурно-функциональная характеристика мембранные эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза, *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*, **3**, 334-354.
- Боронихина Т. В., Ломановская Т. А., Яцковский А. Н. (2021) Плазмолемма эритроцитов и ее изменения в течение жизни клеток, *Журн. Анат. Гистопатол.*, **10**, 62-72.
- Mokrushnikov, P. V., Panin, L. E., and Zaitsev, B. N. (2015) The action of stress hormones on the structure and function of erythrocyte membrane, *Gen. Physiol. Biophys.*, **34**, 311-321.
- Мокрушников П. В., Панин Л. Е., Панин В. Е., Козельская А. И., Зайцев Б. Н. (2019) *Структурные переходы в мембранах эритроцитов (экспериментальные и теоретические модели)*, Новосибирский государственный архитектурно-строительный университет (Сибстрин), Новосибирск.
- Mokrushnikov, P. V. (2019) In *Lipid Bilayers: Properties, Behavior and Interactions* (Mohammad Ashrafuzzaman, ed) Nova Science Publishers, New York, pp. 43-91.
- Мокрушников П. В. (2017) Механические напряжения в мембранах эритроцитов (теоретическая модель), *Биофизика*, **62**, 330-335.
- Мокрушников П. В., Рудяк В. Я. (2023) Механическая модель образования складок на плазматической мембране, *Докл. Акад. Наук Высш. Школы Российской Федерации*, **59**, 29-40.
- Panin, L. E., Mokrushnikov, P. V., Kunitsyn, V. G., Panin, V. E., and Zaitsev, B. N. (2011) Fundamentals of multilevel mesomechanics of nanostructural transitions in erythrocyte membranes and their destructions in interaction with stress hormones, *Phys. Mesomech.*, **14**, 167-177, <https://doi.org/10.1016/j.physme.2011.08.008>.
- Панин Л. Е., Мокрушников П. В. (2014) Воздействие андрогенов на активность  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитарных мембран, *Биофизика*, **59**, 127-133.
- Куницын В. Г., Мокрушников П. В., Панин Л. Е. (2007) Механизм микроциркуляции эритроцита в капиллярном русле при физиологическом сдвиге pH, *Бюлл. Сиб. Отдел. Росс. Акад. Мед. Наук*, **5**, 28-32.
- Мокрушников П. В. (2010) Влияние pH на поверхностное натяжение взвеси эритроцитов, *Бюлл. Сиб. Отдел. Росс. Акад. Мед. Наук*, **1**, 38-46.
- Mokrushnikov, P. V., Rudyak, V. Ya., Lezhnev, E. V. (2021) Mechanism of gas molecule transport through erythrocytes' membranes by kinks-solitons, *Nanosystems Phys. Chem. Math.*, **12**, 22-31, <https://doi.org/10.17586/2220-8054-2021-12-1-22-31>.
- Мокрушников П. В., Рудяк В. Я. (2023) Модель диффузии липидов в цитоплазматических мембранах, *Биофизика*, **68**, 41-56.
- Dodge, J., Mitchell, C., and Hanahan, D. (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119-130, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90042-0).
- Добрецов Г. Е. (1989) *Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов: монография*, Наука, Москва.
- Dawson Rex, M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H., and Jones, K. M. (1986) *Data for Biochemical Research*, Clarendon Press, Oxford.
- ГСИ. Измерения косвенные. Определение результатов измерений и оценивание их погрешностей МИ 2083-90.
- Dembo, M., Glushko, V., Aberlin, M. E., and Sonenberg, M. (1979) A method for measuring membrane microviscosity using pyrene excimer formation. Application to human erythrocyte ghosts, *Biochim. Biophys. Acta*, **552**, 201-211, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(79\)90277-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90277-3).
- Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. (1980) *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран: монография*, Наука, Москва.
- Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., and Yu, S. (2015) Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy, *Nat. Protoc.*, **10**, 382-396, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>.
- Barth, A., and Zscherp, C. (2002) What vibrations tell us about proteins, *Quart. Rev. Biophys.*, **35**, 369-430, <https://doi.org/10.1017/S0033583502003815>.

22. Носенко Т. Н., Ситникова В. Е., Стрельникова И. Е., Фокина М. И. (2021) *Практикум по колебательной спектроскопии*, Изд. Университета ИТМО, СПб.
23. Semenov, M. A., Bol'bukh, T. V., Kashpur, V. A., Maleyev, V. Ya., and Mrevlishvili, G. M. (1994) Hydration and stability of the  $\beta$ -form of LiDNA, *Biophysics*, **39**, 47-54.
24. Van Montfort, R., Slingsby, C., and Vierling, E. (2001) Structure and function of the small heat shock protein/ $\alpha$ -crystallin family of molecular chaperones, *Adv. Protein Chem.*, **59**, 105-156, [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(01\)59004-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(01)59004-X).
25. Vetri, V., D'Amico, M., Fodera, V., Leone, M., Ponzoni, A., Sberveglieri, G., and Militello, V. (2011) Bovine serum albumin protofibril-like aggregates formation: Solo but not simple mechanism, *Arch. Biochem. Biophys.*, **508**, 13-24, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.01.024>.
26. Sciandrone, B., Ami, D., D'Urzo, A., Angeli, E., Relini, A., Vanoni, M., Natalello, A., and Regonesi, M. E. (2023) HspB8 interacts with BAG3 in a “native-like” conformation forming a complex that displays chaperone-like activity, *Protein Sci.*, **32**, e4687, <https://doi.org/10.1002/pro.4687>.
27. Killian, J. A., and von Heijne, G. (2000) How proteins adapt to a membrane-water interface, *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 429-434, [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01626-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01626-1).
28. Montoyaa, M., and Gouaux, E. (2003)  $\beta$ -barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of  $\alpha$ -hemolysin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1609**, 19-27, [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00663-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00663-6).
29. Довидченко Н. В., Леонова Е. И., Галзитская О. В. (2014) Механизмы образования амилоидных фибрилл, *Усп. Биол. Хим.*, **54**, 203-230.
30. Sunde, M., and Blake, C. (1997) The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction, *Adv. Protein Chem.*, **50**, 123-159, [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60320-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60320-4).
31. Кузнецова А. С., Дубовский П. В., Воронцова О. В., Феофанов А. В., Ефремов Р. Г. (2014) Взаимодействие линейных катионных пептидов с фосфолипидными мембранами и полимерами сиаловой кислоты, *Биохимия*, **79**, 583-594.
32. Ефремов Р. Г. (2015) Белки в мембранах: «хозяева» или гости? (по данным компьютерного эксперимента), *Материалы VII Российского симпозиума «белки и пептиды»*. Новосибирск.
33. Мокрушников П. В., Дударев А. Н., Ткаченко Т. А., Городецкая А. Ю., Усынин И. Ф. (2016) Влияние нативного и окислительно модифицированного аполипопротеина А-I на микровязкость липидного бислоя плазматической мембранны эритроцитов, *Биол. Мембр.*, **33**, 406-411, <https://doi.org/10.7868/S0233475516060074>.
34. Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M., and Murthy, K. H. M. (2006) Crystal structure of lipid-free human apolipoprotein A-I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2126-2131, <https://doi.org/10.1073/pnas.0506877103>.
35. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor, *Science*, **271**, 518-520, <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.518>.
36. Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M. L., Phillips, M. C., Rothblat, G. H., Swaney, J.B., and Tall, A.R. (1997) Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux, *J. Biol. Chem.*, **272**, 20982-20985, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.20982>.
37. Панин Л. Е., Тузиков Ф. В., Тузикова Н. А., Харьковский А. В., Усынин И. Ф. (1999) Влияние комплекса тетрагидрокортизол-аполипопротеин А-1 на биосинтез белка в гепатоцитах и на вторичную структуру эукариотических ДНК, *Мол. Биол.*, **33**, 673-678.
38. Usynin, I. F., Dudarev, A. N., Miroshnichenko, S. M., Tkachenko, T. A., and Gorodetskaya, A. Yu. (2017) Effect of native and modified apolipoprotein A-I on DNA synthesis in cultures of different cells, *Cell Technol. Biol. Med.*, **3**, 247-251, <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3967-8>.
39. Bocharov, E. V., Okhrimenko, I. S., Volynsky, P. E., Pavlov, K. V., Zlobina, V. V., Bershatsky, Ya. V., Kryuchkova, A. K., Kuzmichev, P. K., and Efremov, R. G. (2024) Molecular interactions of  $\beta$ -amyloid peptides as disordered proteins and promising drugs based on D-enantiomeric peptides, in *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology*, Abstracts the 14th International Multiconference, Novosibirsk, <https://doi.org/10.18699/bgrs2024-3.2-02>.
40. Бочаров, Э.В. (2024) Трансмембранный белок – предшественник  $\beta$ -амилоида в патогенезе болезни Альцгеймера и не только, *Сборник тезисов докладов «VI Международной конференции ПОСТГЕНОМ'2024, XI Российского симпозиума «Белки и пептиды», Российско-китайского конгресса в области наук о жизни* (ПСБ «Патриот», 29 октября–2 ноября 2024), стр. 263, М.: Издательство «Перо», [Электронное издание].

## ROLE OF MEMBRANE PROTEINS $\beta$ - AND $\alpha$ -STRUCTURES IN PLASMALEMM STRUCTURE CHANGE

P. V. Mokrushnikov<sup>1\*</sup> and V. Ya. Rudyak<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University of Architecture and Civil Engineering (Sibstrin),  
630008 Novosibirsk, Russia; e-mail: pavel.mokrushnikov@bk.ru

<sup>2</sup> Institute of Thermophysics, 630090 Novosibirsk, Russia

Changes in the structure of plasma membranes affect the functions of membranes and cells. Some of these changes can lead to the development of pathologies of the body, which makes it actually to study the effect of changes in the structure of membranes on their functions. It has now been established that when stress hormones and androgens interact with plasma membranes, their structure changes. At the same time, interactions between proteins and lipids change in plasmalemmas, and a fixed quasi-periodic network of protein-lipid domains associated with the cytoskeleton is formed. The initiators of the formation of protein-lipid domains are membrane proteins, which have changed their secondary structure during the interaction of the membrane with hormones. However, it is still unclear exactly what changes in the secondary structure of membrane proteins contribute to the formation of protein-lipid domains around them. The aim of this work was to establish these secondary structures of membrane proteins. To achieve this goal, changes in the structure of membranes during their interaction with dehydroepiandrosterone, cortisol, androsterone, testosterone, and adrenaline were studied. In this work, a fluorescent method for measuring the relative microviscosity of membranes using a pyrene probe was used to study changes in the membrane structure. The change in the secondary structure of membrane proteins during structural transitions in membranes was studied by measuring the IR absorption spectra of membranes. It has been established that the initiators of the appearance of protein-lipid domains in plasma membranes are membrane proteins, in which, after interaction with hormones, the proportion of  $\beta$ -structures increases. At the same time, the appearance of new  $\alpha$ -helices in membrane proteins does not enhance the attraction between membrane proteins and protein-lipid domains are not formed. On the contrary, the appearance of a large number of  $\alpha$ -helices in membrane proteins can lead to a decrease in the microviscosity of the lipid bilayer.

**Keywords:** protein–protein and protein–lipid interactions in plasma membranes, protein-lipid domains in plasma membranes,  $\beta$ -structures,  $\alpha$ -helices, structural changes of plasma membranes, apo A-1, Alzheimer's disease

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНГИБИРОВАНИЯ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ LRRK2 НА АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ НА ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГОШЕ

© 2025 Т.С. Усенко<sup>1,2\*</sup>, К.С. Башарова<sup>1</sup>, А.И. Безрукова<sup>1,2</sup>, В.А. Безруких<sup>3</sup>,  
Г.В. Байдакова<sup>4</sup>, Е.Ю. Захарова<sup>4</sup>, С.Н. Пчелина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИЦ «Курчатовский институт»,

Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова,  
188300 Гатчина, Ленинградская обл., Россия; электронная почта: usenko\_ts@pnpi.nrcki.ru

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова, 197022 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова Минздрава России,  
197341 Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова,  
115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 19.07.2024

После доработки 21.11.2024

Принята к публикации 12.12.2024

Биаллельные мутации в гене *GBA1*, кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), приводят к развитию лизосомной болезни накопления, болезни Гоше (БГ), а также являются фактором высокого риска распространенного нейродегенеративного заболевания, болезни Паркинсона (БП). В большинстве случаев мутации в гене *GBA1* локализуются вне активного сайта и приводят к снижению активности GCase из-за снижения эффективности транспорта фермента с измененной конформацией в лизосому. Препараты, которые применяются для терапии БГ (ферментозаместительная терапия), не способны проходить гематоэнцефалический барьер и не эффективны как для лечения нейрональных форм БГ, так и для БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (*GBA1*-БП). Для терапии БП на сегодняшний день проходят клинические испытания препараты, ингибирующие киназную активность обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2). Ранее было показано, что ингибирирование киназной активности LRRK2 приводит к увеличению активности GCase в пациент-специфичных клетках при *GBA1*-БП. Мы впервые оценили влияние ингибитора киназной активности LRRK2 (MLi-2) на активность GCase на первичной культуре макрофагов периферической крови, полученной от пациентов с БГ первого типа. Оценку активности GCase и уровня ее субстрата в клетках, культивируемых в присутствии и без MLi-2, проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией. Влияния ингибирирования активности LRRK2 на активность GCase в группе пациентов с БГ не выявлено.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** болезнь Гоше, макрофаги периферической крови, *GBA1*, GCase, ингибитор LRRK2, активность ферментов.

DOI: 10.31857/S0320972525010076 EDN: CPMAQE

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Гоше (БГ) – это редкое аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к классу лизосомных болезней накопления (ЛБН). В основе патогенеза БГ лежит снижение активности лизосомной гидrolазы глюкоцереброзидазы (GCase)

посредством биаллельных мутаций в гене *GBA1* (OMIM 606463) [1]. В свою очередь, дисфункция GCase приводит к накоплению субстрата GCase, сфинголипида глюкоцереброзида, преимущественно в лизосомах клеток печени, селезенки и костном мозге. Существуют три основные клинические формы БГ. Тип 1 является наиболее распространенной формой и традиционно считается единственным типом, при котором у паци-

\* Адресат для корреспонденции.

ентов обычно не наблюдаются первичные неврологические нарушения. Типы 2 и 3 встречаются довольно редко, связаны с неврологическими нарушениями различной степени и могут приводить к летальному исходу в молодом возрасте, в частности, тип 2 может проявляться перинатально [2, 3]. В зависимости от тяжести течения БГ и выраженности снижения активности GCase мутации в гене *GBA1* классифицируют как «мягкие» (остаточная активность GCase составляет 20–35%), например, p.N370S, p.V394L, p.R463C, и «тяжелые» (остаточная активность GCase составляет 5–10%), например, p.L444P, p.R120W, p.Leu29fs (84GG) [4].

Как гетерозиготные, так и гомозиготные носители мутаций в гене *GBA1* имеют повышенный риск развития распространенного нейродегенеративного заболевания, болезни Паркинсона (БП), в различных популяциях [5]. Нами и другими авторами было показано, что пациенты с БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (GBA1-БП), характеризуются снижением активности GCase в клетках крови и накоплением субстрата GCase, глюкоцереброзида, который в организме человека претерпевает деацетилирование и превращается в глюказилсфингозин. Однако при GBA1-БП изменения в активности фермента и концентрации субстрата менее выражены, чем при БГ [6–9].

На сегодняшний день не существует нейропротекторной терапии как для БГ типов 2 и 3, так и для БП, в частности GBA1-БП. Однако общность патогенеза БГ и GBA1-БП как заболеваний, связанных с дисфункцией GCase, позволяет предположить, что разрабатываемые таргетные препараты, направленные на повышение активности GCase, могут быть эффективны как для GBA1-БП, так и для БГ. Культура макрофагов периферической крови широко используется для изучения патогенеза заболеваний, связанных с дисфункцией GCase, а также для скрининга потенциальных лекарственных препаратов [10–12].

Нами и другими авторами было показано, что к увеличению активности GCase в пациент-специфичных клетках пациентов с GBA1-БП может приводить ингибирование киназной активности обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2). LRRK2 кодируется геном *LRRK2*, мутации в котором приводят к аутосомно-домinantной форме БП вследствие увеличения киназной активности, что приводит к нарушению функций LRRK2 в клетке, в частности, нарушению клеточного транспорта посредством нарушения фосфорилирования субстратов LRRK2 – GTPаз семейства Rab [13, 14]. В настоящее время ингибиторы киназной активности LRRK2 (DNL201, DNL151, идентификаторы ClinicalTrials.gov NCT04557800, NCT05119790, NCT04056689, NCT05005338, NCT05418673, NCT05348785, NCT 05229562, NCT04551534, NCT03710707 и NEU-723, идентификатор ClinicalTrials.gov NCT05633745; примечание: B1B122 – альтернативное название для DNL151) и один антисмысловой олигонуклеотид (B1B094, идентификатор ClinicalTrials.gov NCT03976349) проходят клинические испытания для терапии БП [15].

Впервые эффект влияния ингибиторов киназной активности LRRK2 на активность GCase был продемонстрирован Ysselstein et al. [16] на дофаминергических нейронах (ДН), дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, и подтвержден в дальнейших исследованиях [16–19]. В свою очередь, нами было показано увеличение активности GCase при ингибировании LRRK2 на первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП [17]. Предполагается, что увеличение активности GCase при ингибировании киназной активности LRRK2 может происходить в результате снижения фосфорилирования белка Rab10, который вовлечен в эндолизосомный транспорт, что в результате приводит к усилению транспорта GCase в лизосомы [16, 17, 19, 20]. Способны ли ингибиторы LRRK2 увеличивать активность при наличии биаллельных мутаций, в частности при БГ, остается неизвестным.

Цель данного исследования заключалась в оценке влияния ингибитора киназной активности LRRK2 (MLi-2) на активность GCase и концентрацию гексозилсфингозина (HexSph) в первичной культуре макрофагов пациентов с БГ. В качестве групп сравнения в исследование были также включены пациенты с GBA1-БП и группа неврологически здоровых индивидуумов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Характеристика групп, включенных в исследование.** В исследование вошло 7 пациентов с БГ, 9 пациентов с GBA1-БП и 8 неврологически здоровых индивидуумов (контроль). Клинические демографические характеристики исследуемых групп представлены в табл. 1. Пациенты с БГ наблюдаются в Национальном медицинском исследовательском центре имени В.А. Алмазова.

Принятые сокращения: БГ – болезнь Гоше; БП – болезнь Паркинсона; ДН – дофаминергические нейроны; ФШ – фармакологические шапероны; GBA1-БП – БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1*; GCase – глюкоцереброзидаза; HexSph – гексозилсфингозин; LRRK2 – обогащенная лейциновыми повторами киназа 2; MLi-2 – ингибитор киназной активности LRRK2.

Таблица 1. Клинические и демографические характеристики исследуемых групп

Группы	БГ	ГВА1-БП	Контроль
Численность ( <i>n</i> )	7	9	8
Пол (мужчины/женщины)	4/3	1/8	2/6
Возраст, годы	30,00 (21,00–56,00)	62,50 (48,00–73,00)	62,00 (54,00–72,00)
Мутации в гене <i>GBA1</i>	2 – p.N370S/p.L444P 1 – p.N370S/p.Leu29fs 2 – p.N370S/p.R120W 1 – p.N370S/p.N370S 1 – p.N370S/NA	5 – p.N370S/N 4 – p.L444P/N	—
Активность GCase в крови, ммоль/литр/ч	0,32 (0,01–0,96) p.N370S/p.L444P: 0,43 (0,01–0,51) p.N370S/p.Leu29fs: 0,06 (0,02–0,09) p.N370S/p.R120W: 0,48 (0,18–0,82) p.N370S/p.N370S: 0,96 (0,96–0,96) p.N370S/NA: 0,64 (0,64–0,64)	3,2 (1,42–5,07) p.N370S/N: 3,77 (2,32–5,07) p.L444P/N: 2,78 (1,42–4,96)	4,69 (2,85–12,87)
Концентрация HexSph в крови, нг/мл	223,59 (44,82–737,17) p.N370S/p.L444P: 279,67 (77,7–381,73) p.N370S/p.Leu29fs: 68,14 (47,29–122,28) p.N370S/p.R120W: 597,22 (347,99–737,17) p.N370S/p.N370S: 196,16 (196,16–196,16) p.N370S/NA: 44,82 (44,82–44,82)	4,38 (1,7–6,19) p.N370S/N: 4,15 (1,7–6,19) p.L444P/N: 4,62 (2,36–5,67)	5,42 (1,61–14,47)
Активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови, ммооль/литр/ч	0,16 (0,01–2,58) p.N370S/p.L444P: 0,43 (0,01–0,72) p.N370S/p.Leu29fs: 0,01 (0,01–0,09) p.N370S/p.R120W: 0,45 (0,16–0,84) p.N370S/p.N370S: 2,58 (2,58–2,58) p.N370S/NA: 0,01 (0,01–0,01)	6,26 (1,58–15,34) p.N370S/N: 13,04 (8,96–15,34) p.L444P/N: 3,46 (1,58–11,47)	15,94 (2,86–48,24)
Концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови, нг/мл	3,17 (0,01–20,19) p.N370S/p.L444P: 2,95 (2,55–3,32) p.N370S/p.Leu29fs: 16,27 (4,18–20,19) p.N370S/p.R120W: 2,14 (0,01–10,35) p.N370S/p.N370S: 0,99 (0,99–0,99) p.N370S/NA: 1,79 (1,79–1,79)	0,77 (0,08–2,68) p.N370S/N: 1,78 (0,08–2,68) p.L444P/N: 0,68 (0,12–1,96)	0,28 (0,07–1,06)

Примечание. HexSph – гексозилсфингозин; GCase – гликокереброзидаза; NA – нет сведений; /N – нормальный (диккий) аллель без мутации.

Все пациенты с БГ получают лечение ферментной заместительной терапией. Забор крови осуществлялся перед введением данной терапии.

Диагноз БГ был поставлен, согласно клиническим рекомендациям ([https://cr.menzdrav.gov.ru/recomend/24\\_2](https://cr.menzdrav.gov.ru/recomend/24_2)), на основании симптоматики и биохимической оценки активности GCase с последующим выявлением мутаций в гене *GBA1* методом прямого секвенирования по Сенгеру. Биохимический анализ и секвенирование гена *GBA1* у пациентов с БП проводилось в Медико-генетическом научном центре имени Н.П. Бочкова, Москва. Диагноз БГ для одного из всех пациентов был подтвержден только на основе биохимических параметров, в частности по активности GCase и концентрации HexSph, так как в ходе секвенирования гена *GBA1* была выявлена одна мутация в гетерозиготном состоянии.

Пациенты с *GBA1*-БП наблюдаются в институте мозга человека имени Н.П. Бехтеревой РАН. Диагноз БП был установлен по ранее опубликованным критериям [21]. Пациенты с *GBA1*-БП были выявлены нами ранее методом скрининга двух мажорных мутаций в гене *GBA1* (р.N370S [NM\_000157.4:c.1226A>G], р.L444P [NM\_000157.4:c.1448T>C]) среди пациентов с БП по ранее описанному протоколу [5]. Данная группа пациентов описана в нашем исследовании по оценке действия ингибиторов LRRK2 на биохимические характеристики при БП, ассоциированной с мутациями в генах *GBA1* и *LRRK2* на пациент-специфичных клетках [17]. Контроль был набран из добровольцев, которые наблюдаются в консультативно-диагностическом центре Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. Все индивидуумы контрольной группы были также проскринированы на две мажорные мутации в гене *GBA1* (р.N370S, р.L444P) с целью исключения носителей данных мутаций. Включенные в исследование группы статистически значимо различались по полу ( $p = 0,03$ ) и возрасту ( $p = 0,0002$ ).

Все участники исследования подписали информированное согласие. У каждого участника исследования был произведен забор крови для дальнейшего получения первичной культуры макрофагов периферической крови.

**Культивирование первичной культуры макрофагов периферической крови.** Первичная культура макрофагов периферической крови была получена по протоколу, описанному нами ранее, из мононуклеарной фракции, выделенной из цельной крови каждого индивидуума [22]. На четвертые сутки к первичной культуре макрофагов был добавлен селективный ингибитор киназной активности LRRK2, MLi-2 («Abcam», США), в концентрации 100 нМ с последующим культи-

вированием в течение 4 суток, как было описано нами ранее [17]. Эффективность действия ингибитора MLi-2 была подтверждена по соотношению фосфорилированной в положении Thr73 формы к нефосфорилированной форме белка Rab10, являющейся основным субстратом LRRK2, с помощью вестерн-блоттинга, как было описано нами ранее [17].

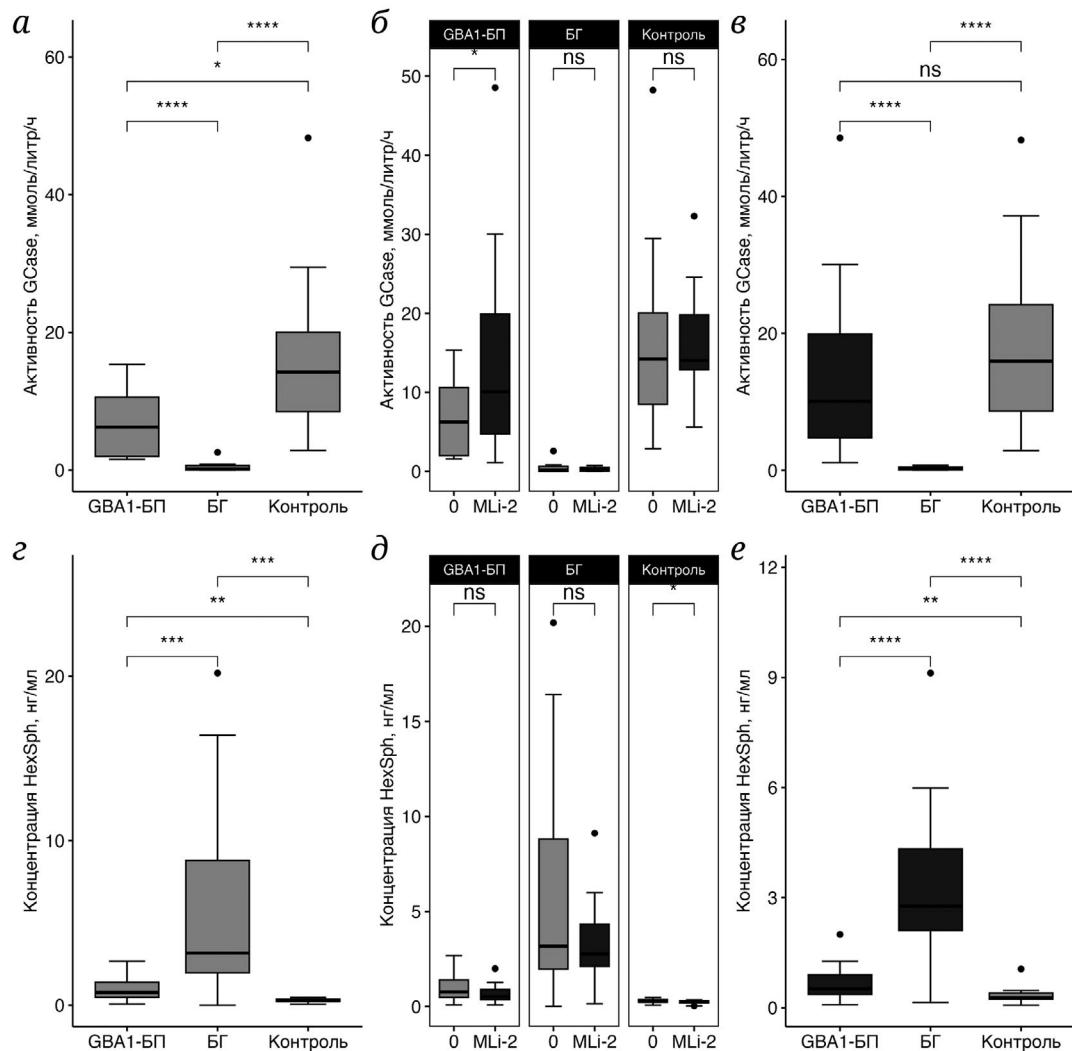
**Оценка активности GCase и концентрации HexSph.** Оценку ферментативной активности GCase и концентрации гексозилсфингозина, представляющего собой смесь двух эпимеров гликозилсфингозина (GlcSph) и галактозилсфингозина (GalSph), проводили методом высокоточной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на первичной культуре макрофагов периферической группы контроля в присутствии MLi-2 в концентрации 100 нМ и без него по протоколу, описанному ранее в лаборатории наследственных болезней обмена Медико-генетического научного центра имени Н.П. Бочкова, Москва [6, 9]. Все измерения были выполнены в трех повторах.

**Статистика.** Статистическую обработку полученных данных осуществляли в среде программирования R (версия 4.1.2) с использованием встроенных статистических пакетов. Проверку нормальности распределения данных проводили с использованием теста Шапиро–Уилка. Для анализа различий между группами применяли тест Вилкоксона. В случаях зависимых (парных) выборок использовали парный тест Вилкоксона. Для независимых выборок различия оценивали с применением теста Вилкоксона, дополненного post-hoc-анализом с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми. Клинические характеристики представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение, экспериментальные значения – медиана (минимальное/максимальное).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время не существует подходов для лечения нейрональных форм БГ, так же как и для лечения *GBA1*-БП. Ранее на ДН пациентов с *GBA1*-БП было показано увеличение активности GCase при ингибировании киназной активности LRRK2 [16, 19]. Нами подтверждены полученные ранее данные, и впервые показано влияние ингибирования активности LRRK2 на восстановление активности GCase на первичной культуре макрофагов пациентов с *GBA1*-БП.

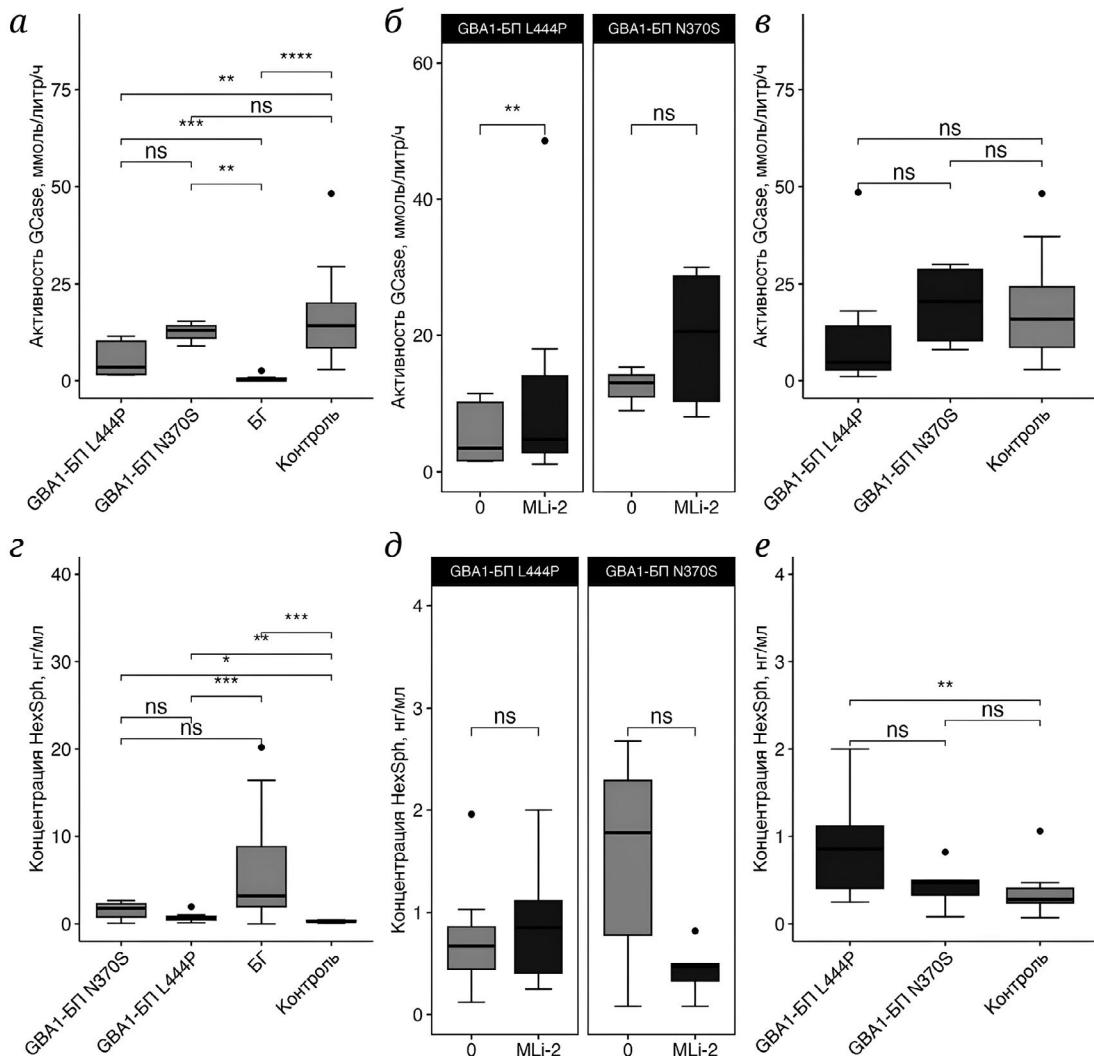
В настоящем исследовании нами впервые оценено влияние селективного ингибитора



**Рис. 1.** Уровень активности GCase и HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с БГ, GBA1-БП и контроля. *а* – Активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп; *б* – активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп при культивировании в присутствии и без ингибитора киназной активности LRRK2; *в* – активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП и БГ при культивировании в присутствии киназной активности LRRK2 и контроля без ингибитора киназной активности LRRK2; *г* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп; *д* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп при культивировании в присутствии и без ингибитора киназной активности LRRK2; *е* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП и БГ при культивировании в присутствии киназной активности LRRK2 и контроля без ингибитора киназной активности LRRK2. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns – нет статистической значимости

киназной активности LRRK2 на активность GCase и концентрацию HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с БГ. Первичная культура макрофагов периферической крови широко используется как для изучения патогенеза БГ, так и для скрининга потенциальных лекарственных препаратов, направленных на увеличение активности GCase [10–12]. В настоящем исследовании, так же как и было показано нами ранее, активность GCase была снижена, а концентрация HexSph была повышена в первичной культуре макрофагов пери-

ферической крови пациентов с БГ по сравнению с пациентами с GBA1-БП и контролем (GCase:  $p = 0,000043$ ,  $p = 0,0000074$ ; HexSph:  $p = 0,00042$ ,  $p = 0,00012$  соответственно) (рис. 1, *а* и *г*). В то же время пациенты с GBA1-БП с гетерозиготным носительством мутаций в гене *GBA1* характеризовались снижением активности GCase ( $p = 0,013$ ) и увеличением концентрации HexSph ( $p = 0,0026$ ) в первичной культуре макрофагов периферической крови по сравнению с контролем, однако данные изменения были менее выражены (рис. 1, *а* и *г*) [10, 11].



**Рис. 2.** Уровень активности GCase и HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с БГ, GBA1-БП и контроля в зависимости от мутаций в гене *GBA1* в группе пациентов с GBA1-БП. *a* – Активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп; *b* – активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп при культивировании в присутствии и без ингибитора киназной активности LRRK2; *c* – активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП и БГ при культивировании в присутствии киназной активности LRRK2 и контроля без ингибитора киназной активности LRRK2; *d* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп; *e* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП и БГ при культивировании в присутствии киназной активности LRRK2 и контроля без ингибитора киназной активности LRRK2. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns – нет статистической значимости

Как было показано нами ранее, ингибирование киназной активности LRRK2 приводило к статистически значимому увеличению активности GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови в группе пациентов с GBA1-БП по сравнению с контролем ( $p = 0,012$ ; рис. 1, б), что соответствует ранее полученным данным на ДН пациентов с GBA1-БП [16, 18, 19]. Предполагается, что изменение киназной активности LRRK2 может влиять на внутриклеточный транспорт, в частности, лизосомных ферментов от эндоплазма-

тического ретикулума в лизосому, посредством изменения уровня фосфорилирования белка Rab10, являющего основным субстратом LRRK2, что, в свою очередь, приводит к увеличению активности и уровня GCase [16].

Однако в группе пациентов с БГ и контроле изменений в уровне активности GCase при ингибировании LRRK2 выявлено не было ( $p > 0,05$ ; рис. 1, б). Существенно, что при ингибировании активности LRRK2 активность GCase в группе пациентов с GBA1-БП достигала значений активности

GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови контроля без ингибитора MLi-2 ( $p > 0,05$ ; рис. 1, в). Интересно отметить, что в группе пациентов с GBA1-БП было также выявлено снижение концентрации HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови при ингибировании киназной активности LRRK2 ингибитором MLi-2, в то же время в контроле было выявлено статистически значимое снижение концентрации HexSph при ингибировании киназной активности LRRK2 ( $p = 0,041$ ; рис. 1, д и е). В группе пациентов с БГ изменений в концентрации HexSph при ингибировании LRRK2 выявлено не было ( $p > 0,05$ ; рис. 1, д и е).

Первичная культура макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП характеризовалась снижением активности GCase и увеличением концентрации HexSph независимо от мутаций в гене *GBA1* (рис. 2, а и г). Интересно отметить, что мутация p.L444P не влияет на активность GCase, но снижает стабильность GCase, что приводит к снижению уровня данного белка в клетке [23–25]. В то же время для мутации p.N370S не было показано выраженного влияния на стабильность белка GCase [26]. Предполагается, что в случае мутации p.N370S суммарное снижение активности GCase объясняется изменением сродства фермента к мембранам [24]. Можно предположить, что усиление транспорта GCase в лизосому при ингибировании активности LRRK2 может зависеть от типа мутации. Воздействие ингибитором киназной активности LRRK2 приводило к увеличению активности GCase в первичной культуре макрофагов пациентов с GBA1-БП только с мутацией p.L444P ( $p = 0,0078$ ) и достижению уровня активности GCase в клетках необработанного контроля, но не в группе пациентов с GBA1-БП с мутацией p.N370S (рис. 2, б и в). Однако влияние ингибитора LRRK2 на уровень HexSph выявлено не было (рис. 2, д и е). В настоящем исследовании все пациенты с БГ являлись компаундными гетерозиготами «легкой» (p.N370S) и одной из «тяжелых» (p.L444P, p.Leu29fs, p.R120W) мутаций.

С другой стороны, нельзя исключить, что одной функциональной копии гена *GBA1* достаточно для увеличения активности GCase за счет усиления транспорта функционально активной GCase в лизосому. Отсутствие изменения уровня активности GCase в группе пациентов с БГ можно обосновать отсутствием функциональных копий гена *GBA1* вследствие биаллельных мутаций в гене *GBA1*. Усиление транспорта фермента GCase в лизосому посредством ингибирования активности LRRK2 при наличии только мутантных форм фермента является недостаточным для увеличения активности GCase. Нужно также учесть, что отсутствие влияния ингибирования LRRK2

при увеличении активности GCase на уровень HexSph в первичной культуре макрофагов пациентов с БГ может быть связано с недостаточным количеством времени культивирования клеток в присутствии MLi-2 или недостаточной концентрацией ингибитора.

В качестве перспективной стратегии для терапии GBA1-БП и БГ на сегодняшний день разрабатываются небольшие химические соединения, называемые фармакологическими шаперонами (ФШ), которые способны проникать через гематоэнцефалический барьер, селективно связываться с ферментом GCase, стабилизировать его структуру, способствуя его транслокации в лизосому, что в совокупности позволяет восстановить биологическую функцию данного фермента [10, 11]. На пациент-специфичных клетках нами и другими авторами показана эффективность данного класса препаратов в отношении восстановления активности GCase при БГ. В настоящее время ФШ проходят фазу 2 клинических испытаний для терапии БГ (NCT03950050) и фазу 3 клинических испытаний для терапии БП (NCT05778617). Однако в клиническую практику ФШ GCase еще не внедрены.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая полученные нами данные, ингибиторы LRRK2 не следует рассматривать в качестве монотерапии БГ, однако представляется важным оценить сочетанное действие ингибиторов LRRK2 с препаратами, способствующими коррекции сборки мутантного фермента, такими как ФШ GCase. Подобный подход может способствовать одновременно усилинию транспорта фермента в лизосому и восстановлению активной конформации GCase.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-15-00177).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам нацио-

нального 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 имени академика И.П. Павлова (протокол № 275 от 04.09.2023).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., Levade, T., Astudillo, L., Serratrice, J., Brassier, A., Rose, C., Billette de Villemeur, T., and Berger, M. G. (2017) A review of Gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 441, <https://doi.org/10.3390/ijms18020441>.
2. Gupta, P., and Pastores, G. (2018) Pharmacological treatment of pediatric Gaucher disease, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, **11**, 1183-1194, <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1549486>.
3. Gupta, N., Oppenheim, I. M., Kauvar, E. F., Tayebi, N., and Sidransky, E. (2011) Type 2 Gaucher disease: phenotypic variation and genotypic heterogeneity, *Blood Cells Mol. Dis.*, **46**, 75-84, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.08.012>.
4. Parlar, S. C., Grend, F. P., Kim, J. J., Baluwendraat, C., and Gan-Or, Z. (2023) Classification of GBA1 variants in Parkinson's disease: the GBA1-PD browser, *Mov. Disord.*, **38**, 489-495, <https://doi.org/10.1002/mds.29314>.
5. 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>.
6. 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>.
7. Kopytova, A. E., Usenko, T. S., Baydakova, G. V., Nikolaev, M. A., Senkevich, K. A., Izumchenko, A. D., Tyurin, A. A., Miliukhina, I. V., Emelyanov, A. K., Zakharova, E. Y., and Pchelina, S. N. (2022) Could blood hexosylsphingosine be a marker for Parkinson's disease linked with GBA1 mutations? *Mov. Disord.*, **37**, 1779-1781, <https://doi.org/10.1002/mds.29132>.
8. Alcalay, R. N., Levy, O. A., Waters, C. C., Fahn, S., Ford, B., Kuo, S. H., Mazzoni, P., Pauciulo, M. W., Nichols, W. C., Gan-Or, Z., Rouleau, G. A., Chung, W. K., Wolf, P., Oliva, P., Keutzer, J., Marder, K., and Zhang, X. (2015) Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations, *Brain*, **138**, 2648-2658, <https://doi.org/10.1093/brain/awv179>.
9. Polo, G., Burlina, A. P., Kolamunnage, T. B., Zampieri, M., Dionisi-Vici, C., Strisciuglio, P., Zaninotto, M., Plebani, M., and Burlina, A. B. (2017) Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **55**, 403-414, <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0340>.
10. 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. (2011) 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>.
11. 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., Izumchenko, A. D., Bogdanova, D. A., Boitsov, V. M., Rybakov, A. V., Miliukhina, I. V., Bezrukikh, 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**, 91-105, <https://doi.org/10.3390/ijms24109105>.
12. Aflaki, E., Stubblefield, B. K., Maniwang, 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>.
13. Liu, Z., Bryant, N., Kumaran, R., Beilina, A., Abeliovich, A., Cookson, M. R., and West, A. B. (2018) LRRK2 phosphorylates membrane-bound Rabs and is activated by GTP-Bound Rab7L1 to promote recruitment to the trans-Golgi network, *Hum. Mol. Genet.*, **27**, 385-395, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx410>.

14. Vides, E. G., Adhikari, A., Chiang, C. Y., Lis, P., Purlyte, E., Limouse, C., Shumate, J. L., Spínola-Lasso, E., Dhekne, H. S., Alessi, D. R., and Pfeffer, S. R. (2022) A feed-forward pathway drives LRRK2 kinase membrane recruitment and activation, *Elife*, **11**, e79771, <https://doi.org/10.7554/eLife.79771>.
15. Taymans, J. M., Fell, M., Greenamyre, T., Hirst, W. D., Mamais, A., Padmanabhan, S., Peter, I., Rideout, H., and Thaler, A. (2023) Perspective on the current state of the LRRK2 field, *NPJ Parkinsons Dis.*, **9**, 104, <https://doi.org/10.1038/s41531-023-00544-7>.
16. Ysselstein, D., Nguyen, M., Young, T. J., Severino, A., Schwake, M., Merchant, K., and Krainc, D. (2019) LRRK2 kinase activity regulates lysosomal glucocerebrosidase in neurons derived from Parkinson's disease patients, *Nat. Commun.*, **10**, 5570, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13413-w>.
17. Усенко Т. С., Башарова К. С., Безрукова А. И., Николаев М. А., Милюхина И. В., Байдакова Г. В., Захарова Е. Ю., Пчелина С. Н. (2022) Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона, *Мед. Генет.*, **21**, 26-29, <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.26-29>.
18. Kedariti, M., Frattini, E., Baden, P., Cogo, S., Civiero, L., Ziviani, E., Zilio, G., Bertoli, F., Aureli, M., Kaganovich, A., Cookson, M. R., Stefanis, L., Surface, M., Deleidi, M., Di Fonzo, A., Alcalay, R. N., Rideout, H., Greggio, E., and Plotegher, N. (2022) LRRK2 kinase activity regulates GCase level and enzymatic activity differently depending on cell type in Parkinson's disease, *NPJ Parkinsons Dis.*, **8**, 92, <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00354-3>.
19. Sanyal, A., Novis, H. S., Gasser, E., Lin, S., and LaVoie, M. J. (2020) LRRK2 kinase inhibition rescues deficits in lysosome function due to heterozygous GBA1 expression in human IPSC-derived neurons, *Front. Neurosci.*, **14**, 442, <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00442>.
20. Mamais, A., Sanyal, A., Fajfer, A., Zykoski, C. G., Guldin, M., Riley-DiPaolo, A., Subrahmanian, N., Gibbs, W., Lin, S., and LaVoie, M. J. (2023) The LRRK2 kinase substrates Rab8a and Rab10 contribute complementary but distinct disease-relevant phenotypes in human neurons, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.04.30.538317>.
21. Rao, G., Fisch, L., Srinivasan, S., D'Amico, F., Okada, T., Eaton, C., and Robbins, C. (2023) Does this patient have Parkinson disease? *JAMA*, **289**, 347-353, <https://doi.org/10.1001/jama.289.3.347>.
22. Nikolaev, M. A., Kopytova, A. E., Baidakova, G. V., Emel'yanov, A. K., Salogub, G. N., Senkevich, K. A., Usenko, T. S., Gorchakova, M. V., Koval'chuk, Yu. P., Berkovich, O. A., Zakharova, E. Y., and Pchelina, S. N. (2019) Human peripheral blood macrophages as a model for studying glucocerebrosidase dysfunction, *Cell Tissue Biol.*, **13**, 100-106, <https://doi.org/10.1134/S1990519X19020081>.
23. Tan, Y. L., Genereux, J. C., Pankow, S., Aerts, J. M., Yates, J. R., and Kelly, J. W. (2014) ERdj3 is an endoplasmic reticulum degradation factor for mutant glucocerebrosidase variants linked to Gaucher's disease, *Chem. Biol.*, **21**, 967-976, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.06.008>.
24. Sawkar, A. R., Schmitz, M., Zimmer, K. P., Reczek, D., Edmunds, T., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2006) Chemical chaperones and permissive temperatures alter localization of Gaucher disease associated glucocerebrosidase variants, *ACS Chem. Biol.*, **1**, 235-251, <https://doi.org/10.1021/cb600187q>.
25. Liou, B., Kazimierczuk, A., Zhang, M., Scott, C. R., Hegde, R. S., and Grabowski, G. A. (2006) Analyses of variant acid beta-glucosidases: effects of Gaucher disease mutations, *J. Biol. Chem.*, **281**, 4242-4253, <https://doi.org/10.1074/jbc.M511110200>.
26. Yap, T. L., Gruschus, J. M., Velayati, A., Westbroek, W., Goldin, E., Moaven, N., Sidransky, E., and Lee, J. C. (2011)  $\alpha$ -Synuclein interacts with glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases, *J. Biol. Chem.*, **286**, 28080-28088, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237859>.

## EVALUATION OF THE EFFECT OF INHIBITION OF LRRK2 KINASE ACTIVITY ON GLUCOCEREBROSIDASE ACTIVITY ON PATIENT-SPECIFIC CELLS FROM PATIENTS WITH GAUCHER DISEASE

T. S. Usenko<sup>1,2\*</sup>, K. S. Basharova<sup>1</sup>, A. I. Bezrukova<sup>1,2</sup>, V. A. Bezrukikh<sup>3</sup>,  
G. V. Baydakova<sup>4</sup>, E. Y. Zakharova<sup>4</sup>, and S. N. Pchelina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Petersburg Institute of Nuclear Physics Named after B. P. Konstantinov Research Center “Kurchatov Institute”, 188300 Gatchina, Russia; e-mail: usenko\_ts@pnpi.nrcki.ru

<sup>2</sup> First St. Petersburg State Medical University Named after acad. I.P. Pavlova, 197022 St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> National Medical Research Center Named after V. A. Almazov, 197341 St. Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Medical Genetic Research Center Named after acad. N. P. Bochkov, 115478 Moscow, Russia

Biallelic mutations in the *GBA1* gene, encoding the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase), lead to the development of a lysosomal storage disease, Gaucher disease (GD), and are also a high risk factor for a common neurodegenerative disease, Parkinson's disease (PD). In most cases, mutations in the *GBA1* gene are localized outside the active site and lead to a decrease in GCase activity due to a decrease in the efficiency of transport of the enzyme with an altered conformation into the lysosome. Drugs that are used to treat GD (enzyme replacement therapy) are not able to cross the blood-brain barrier and are not effective for the treatment of neuronal forms of GD or PD associated with mutations in the *GBA1* gene (*GBA1*-PD). For the treatment of PD, drugs that inhibit the kinase activity of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) are currently undergoing clinical trials. It was previously shown that inhibition of LRRK2 kinase activity leads to an increase in GCase activity in patient-specific *GBA1*-PD cells. We first assessed the effect of the kinase activity inhibitor LRRK2 (MLi-2) on GCase activity in a primary culture of peripheral blood macrophages obtained from patients with type 1 GD. Assessment of GCase activity and its substrate levels in cells cultured with and without MLi-2 was performed using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. There was no effect of inhibition of LRRK2 activity on GCase activity in the group of patients with GD.

*Keywords:* Gaucher disease, peripheral blood macrophages, *GBA1*, GCase, LRRK2, inhibitor, enzyme activity

## МЕХАНИЗМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ЧАСТИЦ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ОТ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

© 2025 В.З. Ланкин<sup>1\*</sup>, К.Б. Шумаев<sup>1,2</sup>, В.А. Медведева<sup>1</sup>,  
А.К. Тихазе<sup>1</sup>, Г.Г. Коновалова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова»  
Минздрава России, 121552 Москва, Россия; электронная почта: lankin0309@mail.ru

<sup>2</sup> ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.09.2024

После доработки 05.12.2024

Принята к публикации 10.12.2024

Установлено, что при введении больным атеросклерозом *per os* препарата убихинона Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) окисленность (содержание липогидропероксидов) частиц липопротеидов низкой плотности (ЛНП) резко снижается, что подтверждает важную роль этого природного антиоксиданта в защите частиц ЛНП от свободнорадикального окисления (СРО) *in vivo*. Исследовано влияние липофильных природных антиоксидантов убихинола Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) и α-токоферола (α-ТОН) на кинетические параметры Cu<sup>2+</sup>-инициированного СРО частиц ЛНП. В этой модельной системе показана возможность синергизма антиоксидантного действия CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и α-ТОН. Обсуждаются вероятные механизмы регенерации липофильных антиоксидантов в частицах ЛНП, в том числе регенерация α-ТОН из токофероксильного радикала (α-TO<sup>•</sup>) с участием CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и/или аскорбата.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** липопротеиды низкой плотности, свободнорадикальное окисление, антиоксиданты, убихинол Q<sub>10</sub>, α-токоферол, биорегенерация антиоксидантов.

DOI: 10.31857/S0320972525010087 EDN: CPLPQB

### ВВЕДЕНИЕ

Циркулирующие в кровяном русле наночастицы липид-транспортирующей системы – липопротеиды низкой плотности (ЛНП), в отличие от различных клеток и субклеточных структур (включая клетки крови), не содержат антиоксидантных ферментов (супероксид- и гидропероксид-оксидоредуктаз), защищающих липид-белковые надмолекулярные комплексы от повреждающего действия свободнорадикального окисления (СРО) [1]. Тем не менее ЛНП нуждаются в эффективной защите от СРО вследствие наличия большого количества субстрата окисления – ацилов полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в фосфо-

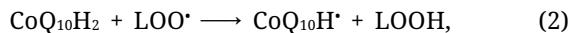
липidaх частиц [2]. Наружный фосфолипидный монослой ЛНП, так же как бислойные фосфолипидные мембранны, легко окисляется в аэробных условиях *in vitro* [3] и *in vivo* [4] как спонтанно, так и при катализе инициаторами разнообразной природы [5]. Наличие в плазме крови высокого парциального давления кислорода (pO<sub>2</sub>), а также индукторов СРО (таких как ионы металлов переменной валентности, гемопротеиды, Cu-содержащие белки, липогидропероксиды (LOOH)), различных генераторов H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, супероксидного анион-радикала (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) и других активных форм кислорода (АФК) [5] создаёт повышенную опасность повреждения частиц ЛНП вследствие их СРО в процессе циркуляции в кровяном русле.

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; СРО – свободнорадикальное окисление; Asc=O – дегидроаскорбиновая кислота; Asc-OH – аскорбиновая кислота; Asc-O<sup>•</sup> – семидегидроаскорбат (свободный радикал аскорбата); CoQ<sub>10</sub> – окисленная форма коэнзима Q<sub>10</sub> (убихинон Q<sub>10</sub>); CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> – восстановленная форма коэнзима Q<sub>10</sub> (убихинол Q<sub>10</sub>); CoQ<sub>10</sub>H<sup>•</sup> – убисемихинон (свободнорадикальная форма коэнзима Q<sub>10</sub>); LOOH – липогидропероксиды; LOO<sup>•</sup>, LO<sup>•</sup> и L<sup>•</sup> – пероксильный, аллоксильный и алкильный радикалы липидов; O<sub>2</sub><sup>•</sup> – супероксидный анион-радикал; HO<sup>•</sup> – гидроксильный радикал; α-ТОН – α-токоферол (витамин Е); α-TO<sup>•</sup> – токофероксильный радикал; skQ1 – 10-(6'-пластохинонил)декилтрифенилфосфоний.

\* Адресат для корреспонденции.

Полное отсутствие в этих структурных образованиях каких-либо антиоксидантных ферментов многократно повышает их подверженность СРО. Очевидно, что, исходя из прагматизма эволюции, наличие антиоксидантных белков в составе частиц ЛНП, конкретной функцией которых является транспорт липидов, синтезируемых в печени, в периферические ткани, является нецелесообразным. При этом все без исключения клетки должны были бы иметь ферментные системы утилизации этих белков после завершения липидного транспорта, что было бы сопряжено с дополнительным бесполезным расходом энергии. Природой был найден остроумный выход из создавшейся ситуации, заключающийся в создании эффективной системы неферментативного контроля СРО в ЛНП, представленной, прежде всего, жирорастворимыми фенольными антиоксидантами – восстановленной формой коэнзима Q<sub>10</sub> (убихинол Q<sub>10</sub>, CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) [6] и витамином Е (α-токоферолем, α-ТОН) [7]. Важно, что в отличие от истинного витамина α-ТОН (в организме не синтезируется) значительная часть CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> (около 60%) поступает в ткани не из пищевых источников, а образуется в результате биосинтеза *de novo* [8]. Жирорастворимые витамины (включая α-ТОН) транспортируются частицами ЛНП и локализованы в гидрофобном ядре наночастиц [9]. В литературе высказано мнение, что CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> является основным (наиболее эффективным) антиоксидантом, защищающим частицы ЛНП от окисления [10–12]. Тем не менее на 1 частицу ЛНП по расчётом приходится не более 1 молекулы CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> [13], что делает невозможным осуществление этим антиоксидантом эффективной защитной функции без существования механизма его биорегенерации (восстановления) в ЛНП.

Считается, что α-ТОН и CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> могут взаимодействовать с пероксильными радикалами (LOO<sup>•</sup>) липидов в следующих реакциях [14–16]:



Токофероксильный радикал (α-TO<sup>•</sup>), продуктируемый в процессе реакции (1), может вновь реагировать с LOO<sup>•</sup> или другой молекулой α-TO<sup>•</sup> с образованием нерадикальных продуктов [14]. В то же время CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> последовательно окисляется LOO<sup>•</sup> до убисемихинона (CoQ<sub>10</sub>H<sup>•</sup>) и далее – до полностью окисленной формы CoQ<sub>10</sub> (реакции (2) и (3)) [15]. Вместе с тем CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> восстанавливает не только свободные радикалы липидов, но и α-TO<sup>•</sup> в реакции (4) [16]:



Эта реакция может лежать в основе синергизма антиоксидантного действия CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и α-TON, участвуя тем самым в биорегенерации α-TON, причём не исключено, что именно этот механизм может играть важную роль в предотвращении СРО частиц ЛНП. Так, при отсутствии CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> накопление токофероксильных радикалов (α-TO<sup>•</sup>) может вызывать прооксидантное действие в ЛНП [17, 18], поскольку α-TO<sup>•</sup> в этих условиях может выступать в качестве инициатора цепных реакций:



где LH – ацилы ПНЖК; L<sup>•</sup> – алкильные радикалы липидов.

Тем не менее эффекты, наблюдаемые при взаимодействии CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и α-TON в модельных системах, не могут полностью объяснить биорегенерацию этих липофильных антиоксидантов в условиях *in vivo*, поскольку предполагаемая локализация CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и α-TON в частицах ЛНП [19] и описанные выше реакции взаимодействия этих жирорастворимых антиоксидантов в условиях *in vivo* не очевидны. В настоящей работе мы предприняли попытку экспериментально обосновать возможные механизмы биорегенерации CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и α-TON, обеспечивающие защиту этими антиоксидантами частиц ЛНП от СРО в процессе их циркуляции в кровяном русле.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

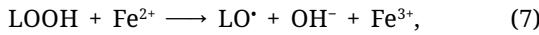
**Реактивы.** Для клинических исследований в работе использовали препарат убихинон Q<sub>10</sub> («Bioquione»; «Phrama Nord», Дания) в капсулах с соевым маслом. SkQ1 (10-(6'-пластохинонил)декилтрифенилfosфония) был любезно предоставлен академиком В.П. Скулачевым (НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова). Остальные реактивы были получены от фирмы «Sigma-Aldrich» (США).

**Клиническое исследование влияния длительного введения *per os* препарата убихинона Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) больным ИБС на содержание липогидропероксидов в ЛНП плазмы крови.** В клиническое исследование было включено 10 мужчин (49 ± 2,5 года) с хронической ишемической болезнью сердца (ИБС) и гиперлипидемией, которые проходили лечение в НМИЦ кардиологии Минздрава России. Пациенты не получали

липотропных препаратов и в течение 6 мес. принимали *per os* препарат убихинон Q<sub>10</sub> в суточной дозе 60 мг. Для контроля уровня LOOH в ЛНП у больных венозную кровь брали натощак в присутствии 1 мг/мл ЭДТА в качестве антикоагулянта и антиоксиданта, после чего изолировали ЛНП с помощью препаративного ультрацентрифугирования, как описано ниже. Данные по изменениям содержания LOOH в ЛНП больных ИБС при введении убихинона Q<sub>10</sub> представляли в % от исходного уровня (100%) LOOH в ЛНП.

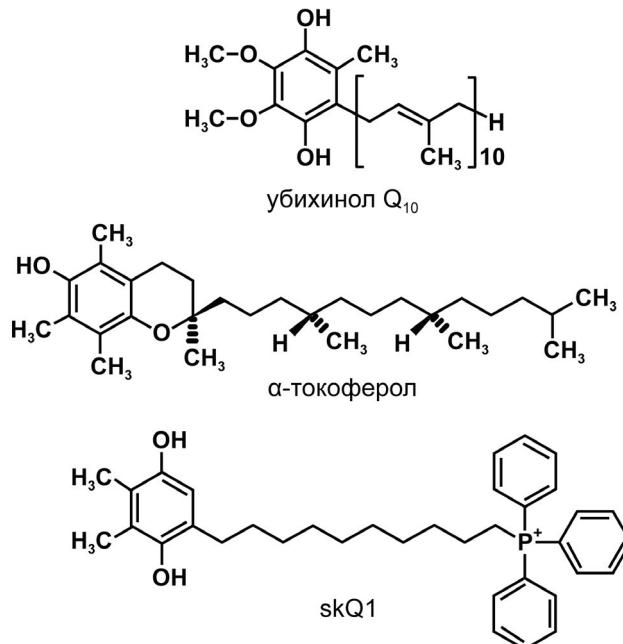
**Выделение ЛНП при помощи препаративного ультрацентрифугирования.** Получение ЛНП из плазмы крови практически здоровых доноров проводили при помощи центрифугирования в градиенте плотности NaBr на ультрацентрифуге Beckman Optima XPN-80 («Beckman», США) [20]. Липопroteиды изолировали из трёх образцов плазмы крови, полученных от трёх разных здоровых доноров. В центрифужную пробирку вносили донорскую плазму, содержащую 1 мМ ЭДТА, осторожно насылали раствор NaBr с плотностью 1,006 г/мл и центрифугировали (105 000 *g* в течение 18 ч при 4 °C) в роторе Ti-60. После удаления верхнего слоя, содержащего липопroteиды очень низкой плотности, к содержимому пробирки добавляли при перемешивании расчётное количество NaBr и растворяли соль для создания плотности 1,065 г/мл, после чего пробирку дополняли раствором NaBr этой же плотности. После центрифугирования (105 000 *g* в течение 18 ч при 4 °C) отбирали верхний слой, содержащий флотировавшие ЛНП. Полученную фракцию ЛНП подвергали диализу в течение 18 ч при температуре 4 °C против 2000 объёмов 145 мМ NaCl в 50 мМ K<sub>2</sub>Na-фосфатном буфере (рН 7,4).

**Определение содержания липогидропероксидов в ЛНП с использованием реактива Fe<sup>2+</sup>-ксиленолоранж.** Содержание гидропероксидов липидов (LOOH) в ЛНП определяли, используя окисление ионов Fe<sup>2+</sup> при реакции с LOOH:



где LO<sup>·</sup> – алкоксильный радикал липидов.

Ионы Fe<sup>3+</sup> (эквимолярные концентрации LOOH) образуют с ксиленоловым оранжевым (o-крезолсульфофталеин-3,3'-бисметилиминодиуксусной кислоты тетранатриевая соль) окрашенный комплекс, концентрацию которого измеряли на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu («Shimadzu», Япония) ( $\epsilon_{560} = 1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [21]. Для проведения анализов предварительно готовили реагент FOX, содержащий 1 мМ ксиленолового оранжевого и 2,5 мМ соли Мора Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> в 25 мМ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с добавлением 9 объёмов 4,4 мМ бутилгидрокситолуола (ВНТ) в 90%-ном метаноле



**Рис. 1.** Структурные формулы исследуемых липофильных фенольных антиоксидантов: убихинола Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>), α-токоферола, 10-(6'-пластохинонил)декилтрифенилfosфония (skQ1). Исследуемые антиоксиданты вводили в инкубационную смесь, содержащую ЛНП, в этанольных растворах (конечная концентрация спирта не более 2%), после чего встряхивали 1 мин в шейкере и инкубировали 4 мин при 37 °C

(степень чистоты для ВЭЖХ). В контрольных пробах LOOH количественно восстанавливали трифенилфосфином до гидроокисей, и поглощение этих образцов вычитали из показаний опытных проб [21]. В качестве стандарта использовали гидропероксид трет-бутила.

**Исследование кинетики свободнорадикального Cu<sup>2+</sup>-инициированного окисления ЛНП.** После диализа содержание белка в образцах ЛНП определяли по методу Лоури, а затем пробы разбавляли до 50 мкг белка/мл раствором, содержащим 154 мМ NaCl в 50 мМ K<sub>2</sub>Na-фосфатном буфере (рН 7,4), и окисление частиц ЛНП при 37 °C индуцировали введением в среду инкубации 30 мкМ CuSO<sub>4</sub>, после чего через фиксированные интервалы времени измеряли накопление конъюгированных диенов на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu [22–24]. В ходе образования гидропероксидов ПНЖК (LOOH) происходит формирование конъюгированных двойных связей, поглощающих при 233 нм. Содержание LOOH ( $\Delta D_{233}$ ) в частицах ЛНП может быть рассчитано, исходя из коэффициента молярной экстинкции 22 000  $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Продолжительность периода индукции ( $\tau$ ) на кинетических кривых СРО липидов в ЛНП определяли, как описано ранее [25]. Исследование кинетики Cu<sup>2+</sup>-зависимого СРО частиц ЛНП *in vitro* проводили, используя ЛНП,

изолированные из плазмы крови трёх доноров (ЛНП, выделенные из плазмы крови каждого донора использовали в независимых экспериментах). С использованием кинетической модели  $\text{Cu}^{2+}$ -инициированного СРО частиц ЛНП исследовали ингибирующее действие природных фенольных липофильных антиоксидантов ( $\alpha$ -токоферол, убихинол  $\text{Q}_{10}$ ) и синтетического пластохионана ( $\text{skQ1}$ ), структурные формулы которых приведены на рис. 1.

**Получение убихинола  $\text{Q}_{10}$  и свободных радикалов  $\alpha$ -токоферола и пробукола.**  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  получали, восстанавливая  $\text{CoQ}_{10}$  боргидридом натрия ( $\text{NaBH}_4$ ), для чего смешивали эквимолярные растворы этих соединений в этаноле [15]. Раствор  $\text{NaBH}_4$  готовили непосредственно перед его использованием. Токофероксильный радикал ( $\alpha\text{-TO}^\bullet$ ) получали окислением 400 мМ раствора  $\alpha\text{-TOH}$  в изопропаноле порошком диоксида марганца ( $\text{MnO}_2$ ). Для этого 1 мл раствора  $\alpha\text{-TOH}$  смешивали с 100 мг диоксида марганца и 20 мин встряхивали на шейкере, после чего смесь центрифugировали и фильтровали надосадочную жидкость для полного удаления частиц  $\text{MnO}_2$ . Феноксильный радикал пробукола (4,4'-(1-метилэтилиден)бис(тио))бис[2,6-бис(1,1-диметилэтил)фенола]) получали аналогично, окисляя 0,2 М раствор пробукола диоксидом марганца.

**Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).** Спектры ЭПР измеряли на автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП «КБСТ» БГУ (Беларусь). Растворы свободных радикалов  $\alpha$ -токоферола и пробукола в изопропаноле смешивали с этанолом и 160 мМ Na-фосфатным буфером (рН 7,4) в соотношении 8/1/1. Этую реакционную смесь (40 мкл) вводили в газопроницаемую капиллярную трубку PTFE Sub-Lite-Wall (внутренний диаметр – 0,635 мм; толщина стенки – 0,051 мм; «Zeus Industrial Products, Inc.», США). Капилляр дважды складывали и вставляли в кварцевую трубку диаметром ~4 мм, которая помещалась в резонатор спектрометра ЭПР. Регистрацию спектров  $\alpha\text{-TO}^\bullet$  проводили при 25 °C и следующих условиях: ослабление СВЧ-мощности – 1 дБ; амплитуда ВЧ-модуляции – 0,05 мТл; СВ-частота – ~9,32 ГГц; коэффициент усиления – 1000; диапазон развёртки – 5 мТл. Запись спектров начинали через 2 мин после смешивания компонентов реакционной смеси.

**Статистический анализ.** В клиническом исследовании для статистического анализа использовали программы SPSS 14 Windows Version 7.0. С помощью критерия Колмогорова–Смирнова проводили оценку нормальности распределения переменных. Для оценки значимости различий экспериментальных данных по отношению к контролю использовали  $t$ -критерий Стьюдента.

Результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, анализировали с помощью программы Origin Pro 8 («Origin Lab Corp.», США). Для сравнения средних значений использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением  $t$ -критерия Стьюдента, а также критерия Даннетта для оценки достоверности различий между группами. Данные всех проведённых исследований представлены как средние значения ( $M$ ) ± стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Влияние убихинона  $\text{Q}_{10}$  на содержание липогидропероксидов в ЛНП плазмы крови больных ИБС.** В течение первого месяца терапии  $\text{CoQ}_{10}$  содержание LOOH в ЛНП больных ИБС резко падает (на 61% от исходного уровня), а ко второму месяцу наблюдения – снижается до 19% и остается на близком к этому уровню в течение последующих 4 мес. терапии (рис. 2).

Следует отметить, что наблюдаемое выраженное антиоксидантное действие (по уменьшению содержания LOOH в ЛНП), отмеченное уже через 1 мес. после введения больным  $\text{CoQ}_{10}$ , может свидетельствовать о существовании его эффективной биорегенерации (восстановления) с образованием  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  в условиях *in vivo*, исследование механизма которой явилось предметом дальнейшего исследования.

**Влияние экзогенных убихинола  $\text{Q}_{10}$  и  $\alpha$ -токоферола на свободнорадикальное окисление частиц ЛНП *in vitro*.** В экспериментах *in vitro* исследовали влияние экзогенных гидрофобных антиоксидантов  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ ,  $\alpha\text{-TOH}$  и синтетического

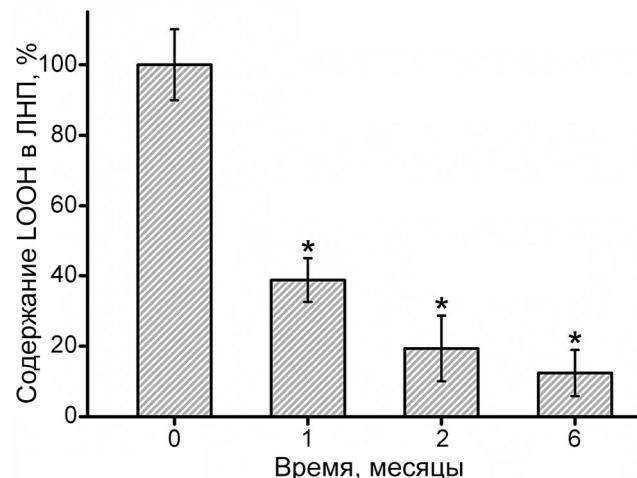
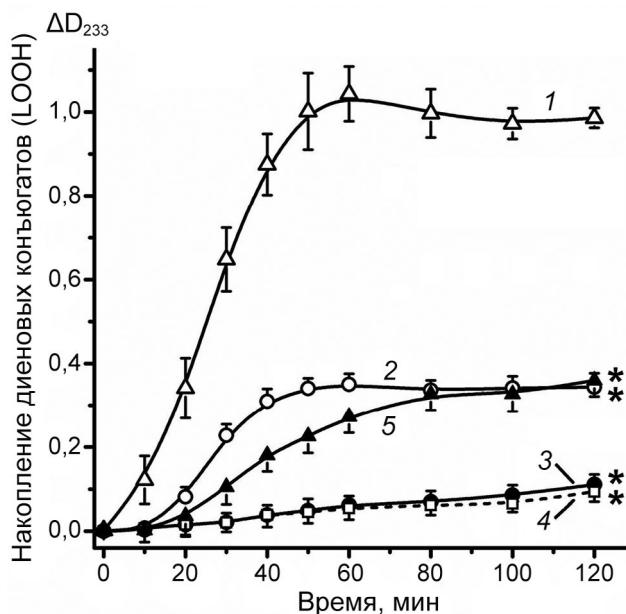


Рис. 2. Влияние перорального введения препарата убихинона  $\text{Q}_{10}$  больным ИБС на содержание LOOH в ЛНП плазмы крови. Различия с исходным уровнем LOOH в ЛНП были статистически значимы; \*  $p < 0,05$



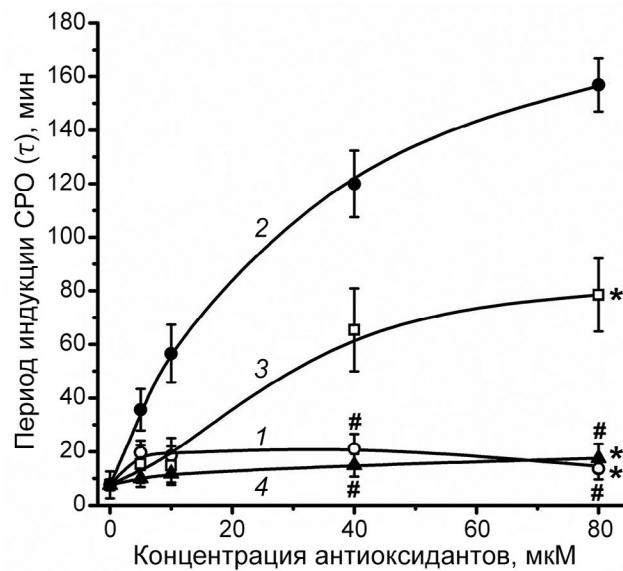
**Рис. 3.** Влияние различных липофильных антиоксидантов на кинетику накопления LOOH (диеновых конъюгатов) в процессе  $\text{Cu}^{2+}$ -инициированного СРО частиц ЛНП. 1 – Окисление нативных ЛНП без добавления антиоксидантов (контроль); 2 – ЛНП + 80 мкМ убихинола  $\text{Q}_{10}$ ; 3 – ЛНП + 80 мкМ  $\alpha$ -токоферола; 4 – ЛНП + 80 мкМ убихинола  $\text{Q}_{10}$  + 80 мкМ  $\alpha$ -токоферола; 5 – ЛНП + 80 мкМ skQ1. Статистически значимыми являются различия групп 2–5 по отношению к группе 1 (контроль); \*  $p < 0,05$

антиоксиданта skQ1 (аналог пластилоина) на кинетику СРО частиц ЛНП в диапазоне концентраций 5–80 мкМ. Кинетические кривые накопления LOOH, образующихся в ЛНП при  $\text{Cu}^{2+}$ -инициированном СРО в присутствии исследованных фенольных антиоксидантов в концентрации 80 мкМ, представлены на рис. 3. Как видно из этих данных, исследованные антиоксиданты влияют на начальную скорость накопления LOOH и продолжительность периода индукции ( $\tau$ ) на кинетических кривых СРО частиц ЛНП (рис. 3).

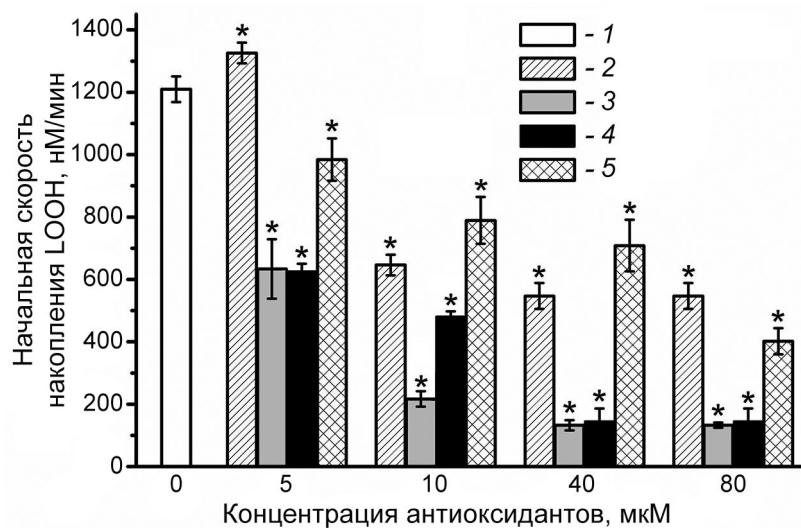
Очевидно, что исследованные кинетические параметры могут быть корректно использованы для оценки эффективности действия антиоксидантов в модельной системе. Известно, что продолжительность периода индукции СРО ( $\tau$ ) прямо пропорциональна концентрации ингибитора СРО в системе –  $[\text{InH}]$  и обратно пропорциональна скорости инициирования СРО –  $\omega$ , т.е.  $\tau = [\text{InH}] / \omega$  [26]. В использованной нами системе окисления при изучении частиц ЛНП с неизменным составом липидов  $\omega$  является величиной постоянной (constanta), исходя из чего продолжительность периода индукции СРО ( $\tau$ ) должна быть пропорциональна содержанию антиоксиданта (или его антиоксидантной активности). Из рис. 3 (кривая 2) видно, что  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  в концентрации 80 мкМ вызы-

вает существенное увеличение продолжительности  $\tau$  при СРО частиц ЛНП, а также уменьшение начальной скорости их окисления. При использовании такой же концентрации  $\alpha$ -ТОН (рис. 3, кривая 3) или совместном действии  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  и  $\alpha$ -ТОН в концентрациях 80 мкМ (рис. 3, кривая 4) наблюдалась практический полный подавление окисления ЛНП. Пластилоин skQ1 в концентрации 80 мкМ оказывал более выраженное антиоксидантное действие (рис. 3, кривая 5) по сравнению с действием  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  (рис. 3, кривая 2).

Данные по действию различных концентраций исследованных антиоксидантов на продолжительность  $\tau$  при СРО частиц ЛНП представлены на рис. 4. Из этих результатов видно (рис. 4, кривая 1), что при введении 5 мкМ  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  в среду окисления происходит увеличение продолжительности  $\tau$  более чем в 2 раза (с 8 мин в контроле до 20 мин), однако значительно большее увеличение концентрации  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  не приводит к заметному увеличению антиоксидантного действия ( $\tau = 14$  мин при 80 мкМ  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ ). Вместе с тем повышение концентрации  $\alpha$ -ТОН при СРО частиц ЛНП от 5 до 80 мкМ вызывает весьма резкое увеличение продолжительности  $\tau$  с 36 до 160 мин соответственно (рис. 4, кривая 2). Следует отметить, что добавление к частицам ЛНП  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  в концентрациях 40 и 80 мкМ вместе с 10 мкМ



**Рис. 4.** Зависимость продолжительности периода индукции ( $\tau$ ) СРО частиц ЛНП (по накоплению диеновых конъюгатов) от концентрации добавленных фенольных липофильных антиоксидантов: убихинола  $\text{Q}_{10}$  (1),  $\alpha$ -токоферола (2), сочетания 10 мкМ  $\alpha$ -токоферола с различными концентрациями (5–80 мкМ) убихинола  $\text{Q}_{10}$  (3) и skQ1 (4). \*  $p < 0,05$  – статистически значимые различия групп 2, 3 и 4 по отношению к группе 2; #  $p < 0,05$  – статистически значимые различия групп 1 и 4 по отношению к группе 3 при концентрациях убихинола  $\text{Q}_{10}$  и skQ1, равных 40 и 80 мкМ



**Рис. 5.** Влияние различных концентраций экзогенных  $\alpha$ -токоферола, убихинола  $Q_{10}$  и skQ1 на начальную скорость  $Cu^{2+}$ -инициированного СРО липидов в частицах ЛНП; 1 – нативные ЛНП без добавления антиоксидантов (контроль); 2 – ЛНП + убихинол  $Q_{10}$ ; 3 – ЛНП +  $\alpha$ -ТОН; 4 – ЛНП +  $\alpha$ -ТОН + убихинол  $Q_{10}$  (антиоксиданты добавлялись в эквимолярных концентрациях); 5 – ЛНП + skQ1. \*  $p < 0,05$  – статистически значимые различия экспериментальных групп по отношению к контролю (начальная скорость накопления LOOH при отсутствии антиоксидантов)

$\alpha$ -ТОН приводит к заметному росту продолжительности  $\tau$  до 65 и 80 мин соответственно. Тем не менее при сочетании 10 мкМ  $\alpha$ -ТОН с  $CoQ_{10}H_2$  в низких концентрациях (5 и 10 мкМ) продолжительность  $\tau$  была практически такой же, что и в присутствии одного  $CoQ_{10}H_2$  (рис. 4, кривая 3). Пластохинон skQ1, который, как и  $CoQ_{10}H_2$ , является восстановленным хиноном, влиял на продолжительность  $\tau$  в меньшей степени, чем другие антиоксиданты, включая  $CoQ_{10}H_2$  (рис. 4, кривая 4).

В концентрации 5 мкМ  $CoQ_{10}H_2$  заметно не влиял на величину начальной скорости накопления LOOH при СРО частиц ЛНП, тогда как при увеличении концентрации  $CoQ_{10}H_2$  до 10–80 мкМ начальная скорость окисления ЛНП снижалась в 2–2,5 раза (рис. 5).

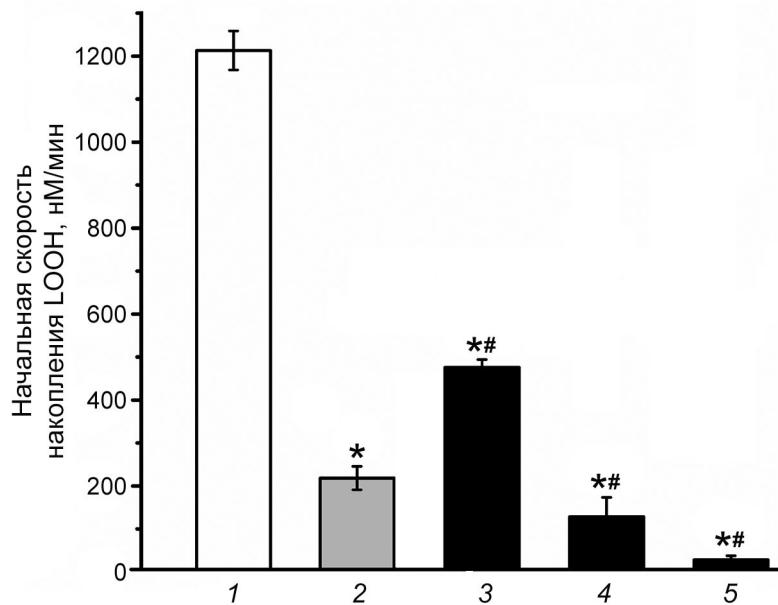
При введении в инкубационную среду 5 мкМ  $\alpha$ -ТОН, напротив, начальная скорость окисления ЛНП резко снижалась (более чем в 2 раза), а при концентрации  $\alpha$ -ТОН, равной 10 мкМ, начальная скорость накопления LOOH падала почти в 6 раз и прогрессивно уменьшалась при увеличении содержания антиоксиданта в среде СРО (рис. 5). При высоких концентрациях (40–80 мкМ)  $\alpha$ -ТОН намного более эффективно ингибиравал начальную скорость СРО частиц ЛНП, чем  $CoQ_{10}H_2$  и skQ1 (рис. 5). В то же время при одновременном добавлении в инкубационную среду равных концентраций  $CoQ_{10}H_2$  и  $\alpha$ -ТОН не наблюдалось их аддитивного действия во всём диапазоне использованных концентраций антиоксидантов (рис. 5). Начальная скорость накопления LOOH при введении этих антиоксидантов в среду окисле-

ния частиц ЛНП в концентрации 10 мкМ была лишь немного ниже, чем в присутствии только  $CoQ_{10}H_2$  (рис. 5). При использовании других концентраций сочетанное действие этих антиоксидантов практически совпадало с действием одного  $\alpha$ -токоферола (рис. 5).

Тем не менее внесение в среду окисления ЛНП  $CoQ_{10}H_2$  в концентрациях 40 или 80 мкМ вместе с 10 мкМ  $\alpha$ -ТОН усиливало антиоксидантное действие последнего почти в 2 и 9 раз соответственно (рис. 6, столбцы 4 и 5). Этот факт согласуется с данными по увеличению в аналогичных условиях продолжительности  $\tau$  на кинетических кривых СРО в ЛНП (рис. 4, кривая 3).

Как уже отмечалось выше, совместное введение  $CoQ_{10}H_2$  и  $\alpha$ -ТОН в концентрации 10 мкМ, напротив, оказывает прооксидантное действие (рис. 5 и 6). Таким образом, анализ кинетических характеристик СРО частиц ЛНП показал, что введение в среду окисления высоких концентраций  $CoQ_{10}H_2$ , по-видимому, приводит к восстановлению радикалов  $\alpha$ -ТОН, в результате чего низкие концентрации последнего более эффективно ингибируют процессы СРО в липид-белковых комплексах.

**Восстановление токофероксильного радикала под действием убихинола  $Q_{10}$  и аскорбата.** Взаимодействие  $CoQ_{10}H_2$  с  $\alpha$ -TO<sup>•</sup> исследовали с помощью спектроскопии ЭПР (рис. 7). Как видно из данных, представленных на рис. 7,  $CoQ_{10}H_2$  в водно-спиртовой среде количественно восстанавливает  $\alpha$ -TO<sup>•</sup> (рис. 7, a; спектры 1–4). Токофероксильный радикал достаточно стабилен,



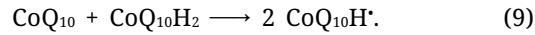
**Рис. 6.** Изменение начальной скорости Cu<sup>2+</sup>-инициированного СРО в частицах ЛНП при добавлении 10 мкМ а-токоферола и различных концентраций (10–80 мкМ) убихинола Q<sub>10</sub>; 1 – окисление ЛНП без добавления антиоксидантов (контроль); 2 – ЛНП + 10 мкМ а-ТОН; 3 – ЛНП + 10 мкМ убихинола Q<sub>10</sub> + 10 мкМ а-ТОН; 4 – ЛНП + 40 мкМ убихинола Q<sub>10</sub> + 10 мкМ а-ТОН; 5 – ЛНП + 80 мкМ убихинола Q<sub>10</sub> + 10 мкМ а-ТОН. \* p < 0,05 – статистически значимые различия групп 2–5 по отношению к группе 1 (контроль); # p < 0,05 – статистически значимые различия групп 3–5 по отношению к группе 2 (ЛНП + 10 мкМ а-ТОН)

что позволило оценить его концентрацию (рис. 7, б). Следует также отметить, что а-TO<sup>•</sup> восстанавливается аскорбатом натрия (рис. 7, а; спектры 5–7). При высоких концентрациях этого антиоксиданта регистрируется небольшой дублетный сигнал ЭПР, характерный для свободного радикала аскорбиновой кислоты (семидегидроаскорбата) (рис. 7, а; спектр 7). Вместе с тем установлено, что CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> восстанавливает феноксильный радикал синтетического гидрофобного антиоксиданта пробукола (рис. 7; спектры 8 и 9). Действие этого фенольного антиоксиданта часто сравнивают с а-ТОН, в том числе при ингибировании процессов СРО в ЛНП [22, 27, 28].

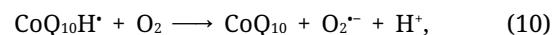
Восстановление токофероксильного радикала под действием CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> должно происходить в соответствии с реакцией (4), продуктами которой, наряду с а-ТОН, является CoQ<sub>10</sub>H<sup>•</sup>, причём нельзя исключить, что эта реакция является обратимой. Вместе с тем CoQ<sub>10</sub>H<sup>•</sup> может участвовать в регенерации а-ТОН по реакции:



Тем не менее нам не удалось зарегистрировать CoQ<sub>10</sub>H<sup>•</sup> в ходе восстановления а-TO<sup>•</sup>. С другой стороны, мы показали образование CoQ<sub>10</sub>H<sup>•</sup> при неполном восстановлении CoQ<sub>10</sub> боргидридом натрия. В этом случае CoQ<sub>10</sub>H<sup>•</sup>, по-видимому, является продуктом реакции конпропорционирования между CoQ<sub>10</sub> и CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> (рис. 7, в):



Снижение уровня CoQ<sub>10</sub>H<sup>•</sup> в реакционной среде (рис. 7, в) может быть связано с его одноэлектронным окислением молекулярным кислородом в процессе реакции:



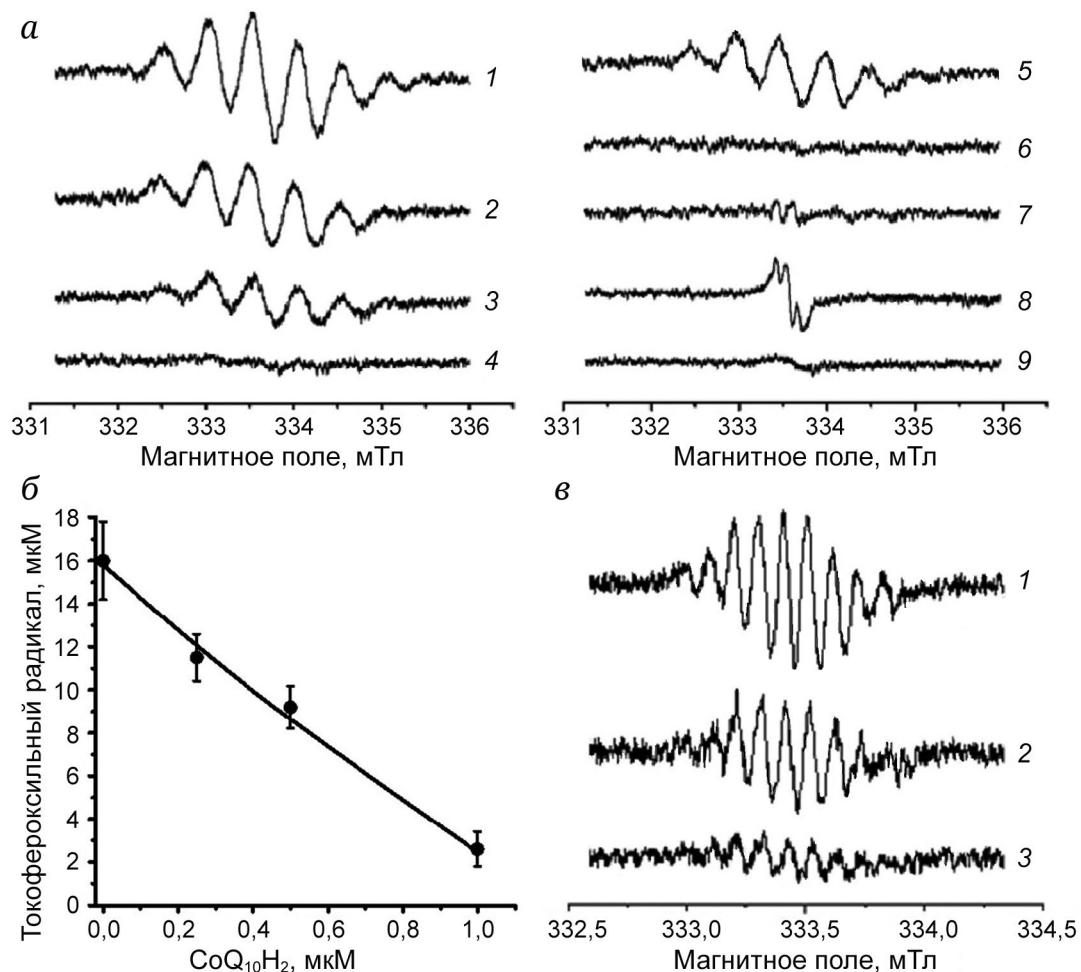
в результате чего образуется супероксидный анион-радикал (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) [19, 29, 30].

Таким образом, отсутствие CoQ<sub>10</sub>H<sup>•</sup> в концентрации, достаточной для регистрации этого радикала в модельной системе, содержащей а-TO<sup>•</sup> и CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>, вероятно, обусловлено протеканием реакций (8) и (10).

Тем не менее следует иметь в виду, что использованная нами система является гомогенной, в отличие от ЛНП – структурных образований, состоящих из фосфолипидного монослоя и гидрофобного ядра, содержащего эфиры холестерина и триглицериды.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В начале 90-х годов прошлого века были сформулированы представления о том, что окисленные ЛНП играют важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза [31–35]. На основании этих работ были предприняты многочисленные



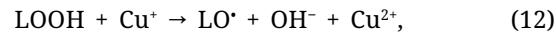
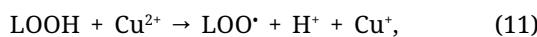
**Рис. 7.** Восстановление свободных радикалов  $\alpha$ -токоферола ( $\alpha$ -ТО') и пробукола. Спектры ЭПР свободных радикалов регистрировали в реакционной смеси, содержащей 320 мМ  $\alpha$ -ТОН или 160 мМ пробукола, которые были предварительно окислены  $\text{MnO}_2$ . *а* – Среда с  $\alpha$ -ТО' без добавок (1); среда с  $\alpha$ -ТО' после внесения  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  в концентрациях 0,25 (2), 0,5 (3) и 1 (4) мМ; среда с  $\alpha$ -ТО' после внесения 1 (5), 2 (6) и 5 (7) мМ аскорбата Na; среда, содержащая феноксильный радикал пробукола (8); среда, содержащая феноксильный радикал пробукола после внесения 0,5 мМ  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  (9). *б* – Концентрационная зависимость восстановления  $\alpha$ -ТО' убихинолом  $\text{Q}_{10}$ . *в* – Образование  $\text{CoQ}_{10}\text{H}^{\cdot}$  в реакционной смеси при неполном восстановлении  $\text{CoQ}_{10}$  боргидридом натрия. Реакционная среда содержала 100 мкМ  $\text{CoQ}_{10}$  и 50 мкМ  $\text{NaBH}_4$ . Спектры ЭПР записаны через 2 мин (1), 10 мин (2) и 30 мин (3) инкубации смеси

клинические исследования, в которых были сделаны попытки сдержать прогрессирование атеросклероза путём снижения окисляемости ЛНП у больных ИБС с помощью терапии высокими дозами витамина Е ( $\alpha$ -ТОН) [36–39]. Положительного эффекта в этих клинических трайлах достигнуто не было. Это вызвало большое разочарование исследователей и привело к тому, что некоторые авторы стали полностью отрицать возможность влияния окисленных ЛНП на атерогенез [36–39]. Тем не менее нами было установлено, что ключевым фактором атерогенеза являются не окисленные (содержащие LOOH) ЛНП, а частицы ЛНП, химически модифицированные вторичными продуктами СРО – низкомолекулярными диарбонилами (малоновым диальдегидом и др.) [39–41]. Кроме того, было высказано предположение, что

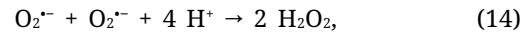
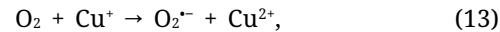
защиту частиц ЛНП от повреждения при их СРО осуществляет не  $\alpha$ -ТОН, а  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  [42]. Это мнение противоречит представлению о том, что  $\alpha$ -ТОН является более эффективным антиоксидантом, чем  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  [19]. Имеются данные, что в низких концентрациях  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  тормозит  $\text{Cu}^{2+}$ -инициированное СРО частиц ЛНП *in vitro* [43]. Введённый перорально  $\text{CoQ}_{10}$  после всасывания восстанавливается до  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  и транспортируется в печень, где он включается в частицы ЛНП, которые доставляют липиды в периферические ткани [44]. После перорального приёма  $\text{CoQ}_{10}$  максимальная концентрация  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  в плазме крови наблюдается уже через 6–8 ч, причём период полувыведения составляет более 30 ч [44]. Установлено, что введение  $\text{CoQ}_{10}$  *per os* способствует увеличению устойчивости частиц ЛНП к СРО [10–12, 45],

причём при длительной дотации его содержание в частицах ЛНП может возрастать почти в 3 раза [45]. Приведённые выше данные хорошо согласуются с полученными нами результатами, которые представлены на рис. 2, где видно, что уже через 30 дней после начала пероральной терапии с включением CoQ<sub>10</sub> исходное содержание LOOH в ЛНП снижается в 4 раза и достигает минимального уровня (в 8 раз ниже исходного) через 2 мес. после начала фармакотерапии, после чего в течение последующих 4 мес. концентрация LOOH в ЛНП больных ИБС практически не изменяется (достигает «насыщения») (рис. 2). Таким образом, наши результаты убедительно свидетельствуют о возможности эффективного восстановления CoQ<sub>10</sub> до CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> *in vivo*, хотя это восстановление может и не быть следствием биорегенерации CoQ<sub>10</sub> непосредственно в составе частиц ЛНП, а отражает возможность биотрансформации этого антиоксиданта в процессе всасывания и/или при сборке частиц ЛНП в печени [44]. Биосинтез CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> обеспечивает основную потребность организма в этом нутриенте, поскольку лишь около 40% CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> поступает с пищей [8]. В соответствии с этим использование холестерин-снижающей фармакотерапии с включением ингибиторов HMG-СоА-редуктазы (статины), которые одновременно с ингибированием синтеза холестерина подавляют и биосинтез CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>, приводит к развитию дефицита CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> [46–48]. Таким образом, терапия статинами способствует увеличению окисленности ЛНП больных [49]. Это тем более нежелательно, поскольку при заболеваниях сердечно-сосудистой системы отмечен дефицит CoQ<sub>10</sub> [50, 51], причём при атеросклерозе преимущественно снижается уровень его восстановленной формы [51]. Следует отметить, что дотация больным ИБС высоких пероральных доз витамина Е (α-токоферилсукцината) практически не влияет на окисляемость ЛНП [22]. Этот факт может свидетельствовать о том, что эфиры α-токоферола не полностью гидролизуются в организме больных ИБС с образованием активной антиоксидантной формы (свободного α-ТОН), хотя соответствующая арильгидролаза имеется в клетках стенки кишечника. С другой стороны, можно предположить, что *in vivo* влияние α-ТОН на окисляемость ЛНП зависит от его локализации в этих частицах [22].

Для исследования эффективности ингибирующего действия различных липофильных фенольных антиоксидантов мы использовали стандартную модель Cu<sup>2+</sup>-инициированного СРО частиц ЛНП [22–24]. Эта модель основана на образовании пероксильного (LOO<sup>·</sup>) и аллоксильного (LO<sup>·</sup>) радикалов липидов в следующих реакциях:



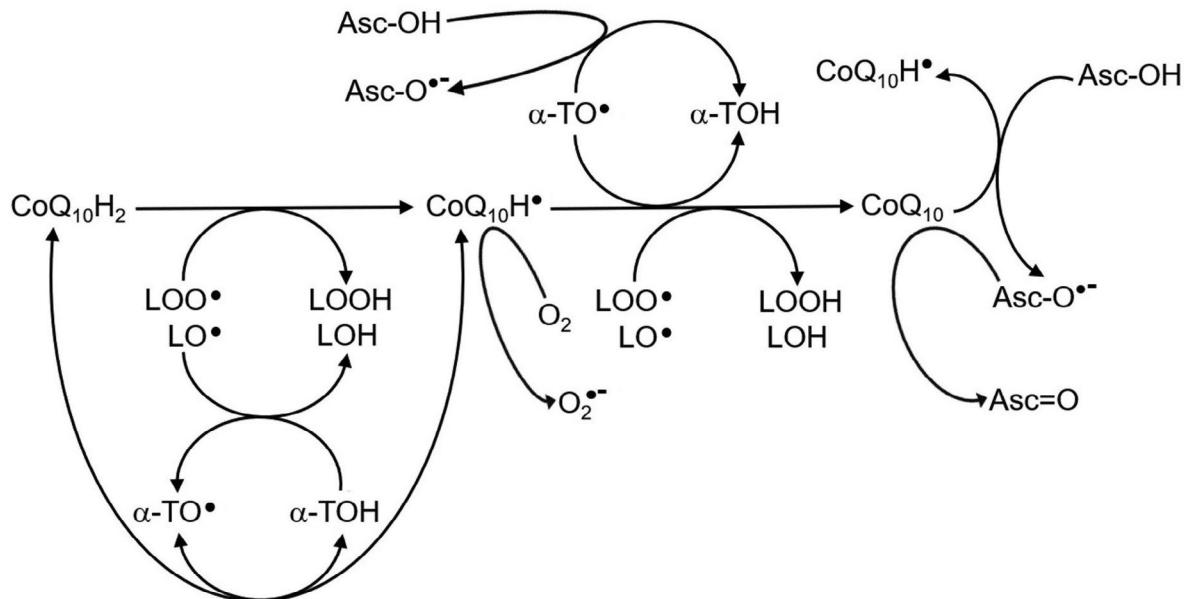
а также супероксидного анион-радикала (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и гидроксильного радикала (HO<sup>·</sup>). Эти АФК продуктируются в катализируемых ионами меди реакциях:



В свою очередь, HO<sup>·</sup>, LOO<sup>·</sup> и LO<sup>·</sup> взаимодействуют с ацилами ПНЖК (ЛН) фосфолипидов частиц ЛНП и тем самым участвуют в других цепных реакциях СРО.

Следовательно, использованная нами система окисления фактически моделирует процесс СРО частиц ЛНП, происходящий при окислительном стрессе под действием АФК *in vivo* и широко используется в работах по исследованию механизмов окислительных процессов в ЛНП *in vitro* [25, 52–54]. Результаты, полученные с использованием модели Cu<sup>2+</sup>-инициированного СРО частиц ЛНП, приведены на рис. 3–6. Анализ кинетических кривых СРО частиц ЛНП свидетельствует о том, что наиболее эффективным из исследуемых липофильных антиоксидантов является α-токоферол. Смесь эквимолярных концентраций CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и α-ТОН ингибирует СРО в основном так же, как один α-ТОН, хотя в присутствии 10 мкМ этих антиоксидантов наблюдается некоторый прооксидантный эффект в сравнении с той же концентрацией α-ТОН (рис. 5 и 6). Этот эффект CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> можно объяснить участием CoQ<sub>10</sub>H<sup>·</sup> в продукции O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (реакция (10)) и, как следствие, других АФК (реакции (14) и (15)). В высоких концентрациях (40 и 80 мкМ) α-ТОН и его сочетание с CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> вызывает практически полное ингибирование реакций перекисного окисления в ЛНП (рис. 3 и 5). Нужно отметить, что, в отличие от α-ТОН, увеличение уровня CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> почти не влияет на продолжительность периода индукции ( $\tau$ ) на кинетических кривых СРО (рис. 4). Такое действие CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> согласуется с данными работы Nohl et al. [29], где было показано, что  $\tau$  индуцированного азот-инициатором СРО липосом растёт при повышении концентрации CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> заметно меньше, чем в присутствии α-ТОН.

В то же время добавление к частицам ЛНП CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> в концентрации 80 мкМ вместе с 10 мкМ α-ТОН существенно усиливает антиоксидантное действие последнего (рис. 4 и 6). Эти результаты указывают на существование синергизма в механизме совместного антиоксидантного действия CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и α-ТОН. Объяснением такого



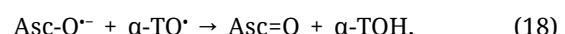
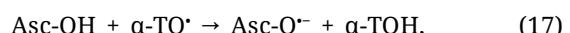
**Рис. 8.** Гипотетическая схема, иллюстрирующая возможные механизмы биорегенерации  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  и  $\alpha\text{-TOH}$  в процессе СРО частиц ЛНП. Принятые обозначения:  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ ,  $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$  и  $\text{CoQ}_{10}$  – убихинол  $\text{Q}_{10}$  (восстановленная форма коэнзима  $\text{Q}_{10}$ ), убисемихинон  $\text{Q}_{10}$  и убихинон  $\text{Q}_{10}$  (окисленная форма коэнзима  $\text{Q}_{10}$ ) соответственно;  $\alpha\text{-TOH}$  и  $\alpha\text{-TO}^\bullet$  –  $\alpha$ -токоферол и токофероксильный радикал; Asc-OH, Asc-O<sup>•-</sup> и Asc=O – аскорбиновая кислота, семидегидроаскорбат и дегидроаскорбат соответственно;  $\text{LOO}^\bullet$  и  $\text{LO}^\bullet$  – пероксильный и аллоксильный радикалы ПНЖК; LOOH и LOH – гидропероксид и гидроксид липидов

синергизма может быть восстановление в присутствии  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  (реакция (4)) токофероксильных радикалов, способных инициировать дальнейшие цепные реакции СРО в частицах ЛНП (реакция (5)) [19]. Действительно, в гомогенной модельной системе (водно-спиртовая смесь) нами было показано, что при молярном соотношении  $\alpha\text{-TO}^\bullet$  и  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ , равном 1/31, происходит восстановление приблизительно 45%  $\alpha\text{-TO}^\bullet$  (рис. 7, б). Важно отметить, что данный механизм биорегенерации  $\alpha\text{-TOH}$  может объяснить эффективное антиоксидантное действие препарата  $\text{CoQ}_{10}$  при его введении больным атеросклерозом (рис. 2). Поскольку *in vivo* содержание  $\alpha\text{-TOH}$  в частицах ЛНП значительно выше, чем  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ , не исключено, что реакция (4) является обратимой. Таким образом, можно предположить участие  $\alpha\text{-TOH}$  в биорегенерации (восстановлении) убисемихинона  $\text{Q}_{10}$  в частицах ЛНП в ходе реакции:



Действительно, ранее было показано, что добавление  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  стимулирует образование феноксильного радикала пробукола в частицах ЛНП при их интенсивном окислении [28]. Полагают, что пробукол, как, возможно, и  $\alpha\text{-TOH}$ , окисляется образующимся в этих условиях  $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$ . Однако в используемой нами гомогенной модельной системе феноксильный радикал пробукола, так же как  $\alpha\text{-TO}^\bullet$ , восстанавливается  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  (рис. 7, а).

Вместе с тем известно, что свободные радикалы пробукола и  $\alpha$ -токоферола, но не  $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$ , восстанавливаются аскорбиновой кислотой (Asc-OH) [27, 28, 55–57]. Этот механизм регенерации  $\alpha\text{-TOH}$  согласуется с полученными нами результатами (рис. 7, а; спектры 5–7) и предполагает протекание следующих реакций:



где  $\text{Asc-O}^{\bullet-}$  – семидегидроаскорбат (свободный радикал аскорбата);  $\text{Asc=O}$  – дегидроаскорбиновая кислота.

Тем не менее роль аскорбиновой кислоты в процессе защиты частиц ЛНП от СРО не до конца выяснена. Очевидно, что высокая концентрация аскорбата в плазме крови и наличие редуктазы семидегидроаскорбата ( $\text{Asc-O}^{\bullet-}$ ) в мемbrane эритроцитов [55] нужны, прежде всего, для подавления взаимодействия образующихся при окислительном стрессе АФК (таких как  $\text{O}_2^\bullet$  и  $\text{HO}^\bullet$ ) с частицами ЛНП. Как уже отмечалось, Asc-OH не регенерирует  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  из  $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$ , однако, по имеющимся в литературе данным, аналоги  $\text{CoQ}_{10}$  с короткой цепью восстанавливаются до соответствующих убисемихинонов в реакциях с аскорбатом и семидегидроаскорбатом [30, 58]. Исходя из вышесказанного, можно полагать, что аскорбат восстанавливает  $\alpha\text{-TO}^\bullet$  до  $\alpha\text{-TOH}$  и  $\text{CoQ}_{10}$  до  $\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$ .

Возможное участие различных природных антиоксидантов в сопряжённых процессах защиты частиц ЛНП от цепных процессов СРО показано на нижеследующей схеме (рис. 8).

По всей видимости, система сопряжённых реакций липофильных и гидрофильных антиоксидантов функционирует как своеобразный редокс-буфер, обеспечивающий наиболее эффективную антиоксидантную защиту частиц ЛНП в условиях окислительного стресса.

Важно отметить, что характер действия CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и синтетического антиоксиданта skQ1 на Cu<sup>2+</sup>-индуцированное СРО в частицах ЛНП имеет сходный характер (рис. 3–5), несмотря на существенное различие небензохиноновой части их молекул (рис. 1). Предложенные нами механизмы биорегенерации коэнзима Q<sub>10</sub> и α-токоферола обсуждаются и другими авторами [16, 19]. На возможность протекания таких реакций указывают существующие представления о близости расположения CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и α-ТОН в частицах ЛНП, при котором бензохиноновая или хромановая части молекул этих антиоксидантов прымыкают к гидрофильным фосфатным группировкам фосфолипидов, а гидрофобные «хвосты» находятся вблизи ацилов ПНЖК фосфолипидов [19].

Необходимо учитывать, что в каждой частице ЛНП на 1 молекулу CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> приходится до 12 молекул α-ТОН [13, 17], причём количество субстрата СРО – ацилов ПНЖК, в фосфолипидах ЛНП в молярном отношении составляет около 20–30 на 1 моль α-ТОН [59]. Если исходить из округлённых молярных соотношений между CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>/α-ТОН/ПНЖК = 1/10/300, становится понятно, что с учётом предполагаемых механизмов биорегенерации липофильных антиоксидантов ингибирование СРО в частицах ЛНП должно быть весьма эффективным. В действительности эта эффективность

может быть ещё выше, поскольку одна молекула восстановленного коэнзима Q<sub>10</sub> способна утилизировать два свободных радикала, действуя сначала как CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>, а затем – как CoQ<sub>10</sub>H<sup>·</sup> (реакции (2) и (3)). Тем не менее конкретные механизмы антиоксидантной защиты частиц ЛНП и участия различных природных антиоксидантов в регуляции процессов СРО в частицах ЛНП нуждаются в дополнительном экспериментальном обосновании.

**Вклад авторов.** Ланкин В.З. – концепция исследования, написание варианта статьи и обсуждения результатов; Шумаев К.Б. – проведение ЭПР-спектрометрических исследований, обсчёт результатов, изготовление рисунков, написание варианта статьи и обсуждения результатов; Медведева В.А. – проведение кинетических исследований; Тихазе А.К. – подготовка списка литературы, участие в написании обсуждения статьи; Коновалова Г.Г. – проведение клинического исследования.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00013).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Клиническая часть исследования проводилась в соответствии с этическими стандартами национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменением или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Экспериментальные протоколы были одобрены Этическим комитетом Института клинической кардиологии НМИЦК Минздрава России 29 января 2018 года (идентификационный код проекта 233).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Hydroperoxide reducing enzymes in the regulation of free radical processes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1256-1274, <https://doi.org/10.1134/S0006297921100084>.
- Shen, B. W., Scanu, A. M., and Kezdy, F. J. (1977) Structure of human serum lipoproteins inferred from compositional analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 837-841, <https://doi.org/10.1073/pnas.74.3.837>.
- Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Kosach, V. Ya. (2022) Comparative susceptibility to oxidation of different classes of blood plasma lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1335-1341, <https://doi.org/10.1134/S0006297922110128>.
- Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Role of glutathione peroxidases and peroxiredoxins in free radical induced pathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1418-1433, <https://doi.org/10.1134/S0006297921110067>.
- Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, <https://doi.org/10.2174/187460980966160926142640>.
- Mellors, A., and Tappel, A. L. (1966) The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol, *J. Biol. Chem.*, **241**, 4353-4356, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99728-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99728-0).
- Witting, L. A. (1980) Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical-initiated reactions, *Free Radic. Biol.*, **4**, 295-319, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-566504-9.50016-7>.

8. Bliznakov, E. G., and Wilkins, D. J. (1998) Biochemical and clinical consequences of inhibiting coenzyme Q10 biosynthesis by lipid-lowering HMG-CoA reductase inhibitors (statins): a critical overview, *Adv. Ther.*, **15**, 218-228.
9. Hevonenja, T., Pentikäinen, M. O., Hyvönen, M. T., Kovánen, P. T., and Ala-Korpela, M. (2000) Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL, *Biochim. Biophys. Acta.*, **15**, 189-210, [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00123-2](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00123-2).
10. Thomas, S. R., Neuzil, J., and Stocker, R. (1997) Inhibition of LDL oxidation by ubiquinol-10. A protective mechanism for coenzyme Q in atherosclerosis? *Mol. Aspects Med.*, **18**, 85-103, [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(97\)00031-9](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(97)00031-9).
11. Thomas, S. R., Witting, P. K., and Stocker, R. (1999) A role for reduced coenzyme Q in atherosclerosis? *Biofactors*, **9**, 207-224, <https://doi.org/10.1002/biof.5520090216>.
12. Littarru, G. P., Battino, M., Tomasetti, M., Mordente, A., Santini, S., Oradei, A., Manto, A., and Ghirlanda, G. (1994) Metabolic implications of coenzyme Q<sub>10</sub> in red blood cells and plasma lipoproteins, *Mol. Aspects Med.*, **15**, 67-72, [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0098-2997(94)90014-0).
13. Stocker, R. (1993) Natural antioxidants and atherosclerosis, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **2**, 15-20.
14. Niki, E. (2014) Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: *in vitro* and *in vivo* evidence, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 3-12, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022>.
15. Frei, B., Kim, M. C., and Ames, B. N. (1990) Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4879-4883, <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4879>.
16. Kagan, V. E., Fabisiak, J. E., and Quinn, E. J. (2000) Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants, *Protoplasma*, **214**, 11-18, <https://doi.org/10.1007/BF02524257>.
17. Bowry, V. W., Stocker, R. (1993) Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6029-6044, <https://doi.org/10.1021/ja00067a019>.
18. Witting, P. K., Upston, J. M., and Stocker, R. (1997) Role of alpha-tocopheroyl radical in the initiation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein exposed to horse radish peroxidase, *Biochemistry*, **36**, 1251-1258, <https://doi.org/10.1021/bi962493j>.
19. Fong, C. W. (2023) Coenzyme Q 10 and Vitamin E synergy, electron transfer, antioxidation in cell membranes, and interaction with cholesterol, hal-03976270.
20. Lindgren, F. T. (1975) Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis, in *Analysis of Lipids and Lipoproteins* (Perkins, E. G., ed) Champaign: Amer. Oil. Chemists Soc., pp. 204-224.
21. Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., and Wolf, S. P. (1994) Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine, *Anal. Biochem.*, **220**, 403-409, <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1357>.
22. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Tikhaze, A. K., Shumaev, K. B., Kumskova, E. M., and Viigimaa, M. (2014) The initiation of the free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injuries in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.*, **395**, 241-252, <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2131-2>.
23. Mark, J., and Burkitt, A. (2001) Critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, α-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **394**, 117-135, <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2509>.
24. Patel, R. P., and Darley-Usmar, V. (1999) Molecular mechanisms of the copper dependent oxidation of low-density lipoprotein, *Free Radic. Res.*, **30**, 1-9, <https://doi.org/10.1080/10715769900300011>.
25. Kontush, A., Hubner, C., Finckh, B., Kohlschutter, A., and Beisiegel, U. (1994) Low density lipoprotein oxidizability by copper correlates to its initial ubiquinol-10 and polyunsaturated fatty acid content, *FEBS Lett.*, **341**, 69-73, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80242-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80242-4).
26. Эмануэль Н. М., Денисов Е. Т., Майзус З. К. (1965) Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе, Москва, Наука, 375 с.
27. Kagan, V. E., Freisleben, H. J., Tsuchiya, M., Forte, T., and Packer, L. (1991) Generation of probucol radicals and their reduction by ascorbate and dihydrolipoic acid in human low density lipoproteins, *Free Radic. Res. Commun.*, **15**, 265-276, <https://doi.org/10.3109/10715769109105222>.
28. Shumaev, K. B., Ruuge, E. K., Dmitrovsky, A. A., Bykhovsky, V. Ya., and Kukharchuk, V. V. (1997) Effect of lipid peroxidation products and antioxidants on the formation of probucol radical in low density lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **62**, 657-660.
29. Nohl, H., Gille, L., and Kozlov, A. V. (1998) Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol, *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 666-675, [doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00105-1).
30. Roginsky, V. A., Mohr, D., and Stocker, R. (1996) Reduction of ubiquinone-1 by ascorbic acid is a catalytic and reversible process controlled by the concentration of molecular oxygen, *Redox Rep.*, **2**, 55-62, <https://doi.org/10.1080/13510002.1996.11747027>.

31. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity, *New Eng. J. Med.*, **320**, 915-924, <https://doi.org/10.1056/NEJM198904063201407>.
32. Kita, T., Ishii, K., Yokode, M., Kume, N., Nagano, Y., Arai, H., Arai, H., and Kawai, C. (1990) The role of oxidized low density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis, *Eur. Heart J.*, **11**, 122-127, [https://doi.org/10.1093/eurheartj/11.suppl\\_e.122](https://doi.org/10.1093/eurheartj/11.suppl_e.122).
33. Witztum, J. L. (1994) The oxidation hypothesis of atherosclerosis, *Lancet*, **344**, 793-795, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92346-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92346-9).
34. Yla-Herttula, S. (1994) Role of lipid and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis, *Drugs Today*, **30**, 507-514.
35. Steinberg, D. (1995) Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **369**, 39-48, [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1957-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1957-7_5).
36. Lakin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, <https://doi.org/10.2174/1874609809666160926142640>.
37. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2022) Dicarbonyl-dependent modification of LDL as a key factor of endothelial dysfunction and atherosclerotic vascular wall damage, *Antioxidants*, **11**, 1565, <https://doi.org/10.3390/antiox11081565>.
38. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2022) Malondialdehyde as an important key factor of molecular mechanisms of vascular wall damage under heart diseases development, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 128, <https://doi.org/10.3390/ijms24010128>.
39. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., Sharapov, M. G., and Konovalova, G. G. (2024) The role of natural low molecular weight dicarbonyls in atherogenesis and diabetogenesis, *Rev. Cardiovasc. Med.*, **25**, 295, <https://doi.org/10.31083/j.rcm2508295>.
40. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Konovalova, G. G. (2023) Differences in structural changes and pathophysiological effects of low-density lipoprotein particles upon accumulation of acylhydroperoxy derivatives in their outer phospholipid monolayer or upon modification of apoprotein B-100 by natural dicarbonyls, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1910-1919, <https://doi.org/10.1134/S0006297923110196>.
41. Lakin, V. Z., Sharapov, M. G., Tikhaze, A. K., Goncharov, R. G., Antonova, O. A., Konovalova, G. G., and Novoselov, V. I. (2023) Dicarbonyl-modified low-density lipoproteins are key inducers of LOX-1 and NOX1 gene expression in the cultured human umbilical vein endothelial cells, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 2125-2136, <https://doi.org/10.1134/S0006297923120143>.
42. Stocker, R., Bowry, V. W., and Frei, B. (1991) Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does  $\alpha$ -tocopherol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1646-1650, <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1646>.
43. Ahmadvand, H., Mabuchi, H., Nohara, A., Kobayahi, J., and Kawashiri, M. A. (2013) Effects of coenzyme Q(10) on LDL oxidation *in vitro*, *Acta Med. Iran.*, **51**, 12-18.
44. Raizner, A. E. (2019) Coenzyme Q<sub>10</sub>, *Methodist Debakey Cardiovasc. J.*, **15**, 185-191, <https://doi.org/10.14797/mdcj-15-3-185>.
45. Mohr, D., Bowry, V. W., and Stocker, R. (1992) Dietary supplementation with coenzyme Q<sub>10</sub> results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1126**, 247-254, [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90237-P](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90237-P).
46. Bargossi, A. M., Grossi, G., Fiorella, P. L., Gaddi, A., Di Giulio, R., and Battino, M. (1994) Exogenous CoQ<sub>10</sub> supplementation prevents plasma ubiquinone reduction induced by HMG-CoA reductase inhibitors, *Mol. Aspects Med.*, **15**, 187-193, [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0098-2997(94)90028-0).
47. Garrido-Maraver, J., Cordero, M. D., Oropesa-Avila, M., Vega, A.F., de la Mata, M., Pavon A. D., Alcocer-Gomez, E., Calero, C. P., Paz, M. V., Alanis, M., de Lavera, I., Cotan, D., and Sanchez-Alcazar, J. A. (2014) Clinical applications of coenzyme Q<sub>10</sub>, *Front. Biosci.*, **19**, 619-633, <https://doi.org/10.2741/4231>.
48. Gutierrez-Mariscal, F. M., de la Cruz-Ares, S., Torres-Peña, J. D., Alcalá-Díaz, J. F., Yubero-Serrano, E. M., and López-Miranda, J. (2021) Coenzyme Q<sub>10</sub> and Cardiovascular diseases, *Antioxidants*, **10**, 906, <https://doi.org/10.3390/antiox10060906>.
49. Lakin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2003) Atherosclerosis as a free radical pathology and antioxidant therapy of this disease, *Free Radic.*, **344**, 218-231.
50. Lakin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kapel'ko, V. I., Shepel'kova, G. S., Shumaev, K. B., Panasenko, O. M., Konovalova, G. G., and Belenkov, Y. N. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1081-1090, <https://doi.org/10.1134/S0006297907100069>.

51. Kontush, A., Reich, A., Baum, K., Spranger, T., Finckh, B., Kohlschütter, A., and Beisiegel, U. (1997) Plasma ubiquinol-10 is decreased in patients with hyperlipidaemia, *Atherosclerosis*, **129**, 119-126, [https://doi.org/10.1016/s0002-9150\(96\)06021-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9150(96)06021-2).
52. Miura, S., Watanabe, J., Tomita, T., Sano, M., and Tomita, I. (1994) The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidative modification of low density lipoprotein, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1567-1572, <https://doi.org/10.1248/bpb.17.1567>.
53. Yeomans, V. C., Linseisen, J., and Wolfram, G. (2005) Interactive effects of polyphenols, tocopherol and ascorbic acid on the Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidative modification of human low density lipoproteins, *Eur. J. Nutr.*, **44**, 422-428, <https://doi.org/10.1007/s00394-005-0546-y>.
54. Jayaraman, S., Gantz, D. L., Gursky, O. (2007) Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein, *Biochemistry*, **46**, 5790-5797, <https://doi.org/10.1021/bi700225a>.
55. Beyer, R. E. (1994) The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **26**, 349-358, <https://doi.org/10.1007/BF00762775>.
56. Neuzil, J., Thomas, S. R., and Stocker, R. (1997) Requirement for, promotion, or inhibition by alpha-tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation, *Free Radic Biol. Med.*, **22**, 57-71, [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00224-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00224-9).
57. Carr, A. C., Zhu, B. Z., and Frei, B. (2000) Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E), *Circ. Res.*, **87**, 349-354, <https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.349>.
58. Guo, Q., and Packer, L. (1999) ESR studies of ascorbic acid-dependent recycling of the vitamin E homologue Trolox by coenzyme Q<sub>0</sub> in murine skin homogenates, *Redox Rep.*, **4**, 105-111, <https://doi.org/10.1179/135100099101534783>.
59. Chancharme, L., Thérond, P., Nigon, F., Zarev, S., Mallet, A., Bruckert, E., and Chapman, M. J. (2002) LDL particle subclasses in hypercholesterolemia. Molecular determinants of reduced lipid hydroperoxide stability, *J. Lipid Res.*, **43**, 453-462, [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(02\)30152-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(02)30152-8).

## MECHANISMS OF ANTIOXIDANT PROTECTION OF LOW-DENSITY LIPOPROTEIN PARTICLES AGAINST FREE RADICAL OXIDATION

**V. Z. Lankin<sup>1\*</sup>, K. B. Shumaev<sup>1,2</sup>, V. A. Medvedeva<sup>1</sup>,  
A. K. Tikhaze<sup>1</sup>, and G. G. Konovalova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> National Medical Research Center of Cardiology Named after Academician E. I. Chazov,  
Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia; e-mail: lankin0309@mail.ru

<sup>2</sup> Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,  
119071 Moscow, Russia

It was found that when patients with atherosclerosis are orally administered ubiquinon Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>), the oxidation (lipohydroperoxide content) of low-density lipoprotein (LDL) particles sharply decreases, which confirms the important role of this natural antioxidant in protecting LDL particles from free radical oxidation *in vivo*. The influence of lipophilic natural antioxidants ubiquinol Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) and α-tocopherol (α-TOH) on the kinetic parameters of Cu<sup>2+</sup>-initiated free radical oxidation of LDL particles was investigated. In this model system, the possible synergism of the antioxidant action of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> and α-TOH is shown. The probable mechanisms of bioregeneration of the lipophilic antioxidants in LDL particles, including regeneration of α-TOH from the tocopheroxyl radical (α-TO<sup>·</sup>) with the participation of CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> and/or ascorbate, are discussed.

**Keywords:** low-density lipoproteins, free radical oxidation, antioxidants, ubiquinol Q<sub>10</sub>, α-tocopherol, antioxidant bioregeneration

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛАВНОЙ ПРОТЕАЗЫ SARS-CoV-2 ( $M^{pro}$ ) ПУТЬМ ЭЛЕКТРООКИСЛЕНИЯ ОСТАТКА ТИРОЗИНА В МОДЕЛЬНОМ ПЕПТИДЕ

© 2025 Т.А. Филиппова<sup>1,2</sup>, Р.А. Масамрех<sup>1,2</sup>, Т.Е. Фарафонова<sup>1</sup>,  
Ю.Ю. Худоклинова<sup>2</sup>, В.В. Шумянцева<sup>1,2</sup>, С.А. Мошковский<sup>2,3</sup>, А.В. Кузиков<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,

119121 Москва, Россия; электронная почта: alexeykuzikov@gmail.com

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет),  
117513 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт междисциплинарных исследований Общества Макса Планка,  
37077 Гёттинген, Германия

Поступила в редакцию 23.10.2024

После доработки 06.12.2024

Принята к публикации 10.12.2024

Разработан подход для определения каталитической активности главной протеазы SARS-CoV-2 ( $M^{pro}$ ), основанный на регистрации площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельного пептидного субстрата CGGGAVLQSGY, иммобилизованного на поверхности печатного графитового электрода (ПГЭ), модифицированного наночастицами золота (AuНЧ). AuНЧ были получены методом электросинтеза. Определены параметры стационарной кинетики  $M^{pro}$  по отношению к модельному пептиду: константа каталитическая ( $k_{cat}$ ) –  $(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ; константа Михаэлиса ( $K_m$ ) –  $(358 \pm 32) \cdot 10^{-9} \text{ М}$ ; эффективность катализа ( $k_{cat}/K_m$ ) –  $8659 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ . Предел обнаружения (LOD) для  $M^{pro}$  с помощью разработанной электрохимической системы был определён как 44 нМ. Разработанный подход перспективен для поиска новых ингибиторов  $M^{pro}$  в качестве лекарственных препаратов для лечения коронавирусных инфекций.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** протеаза  $M^{pro}$ , электроокисление тирозина, модифицированные электроды, наночастицы золота, модельный пептид.

DOI: 10.31857/S0320972525010095 EDN: CPGXII

### ВВЕДЕНИЕ

Главные протеазы коронавирусов ( $M^{pro}$ ), также известные как 3C-подобные протеазы (3CL<sup>pro</sup>) или неструктурные белки 5 (Nsp5), являются высококонсервативными ферментами группы цистеиновых протеаз, играющих важную роль в жизненном цикле β-коронавирусов, в том числе коронавируса, вызывающего тяжёлый острый респираторный синдром 2 (SARS-CoV-2) [1, 2]. Функция данной группы ферментов состоит в посттрансляционном процессинге белков pp1a и pp1b, необходимых для процессов инвазии, репликации и транскрипции вирусов [1, 3, 4].  $M^{pro}$  SARS-CoV-2 (EC 3.4.22.69) – гомодимерный фермент, на 96% идентичный  $M^{pro}$

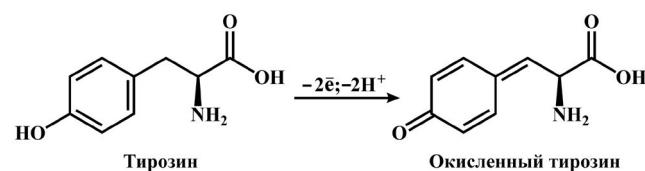
коронавируса тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) [5]. Этот фермент является перспективной мишенью для действия лекарственных препаратов для лечения коронавирусных инфекций [6].  $M^{pro}$  обладает рядом уникальных свойств, что может быть использовано для разработки эффективных и селективных препаратов для лечения коронавирусных инфекций, в том числе коронавирусного инфекционного заболевания 2019 года (COVID-19), не оказывающих побочного эффекта на протеазы хозяина [2, 7–9]. Так, например, в связи с отсутствием гомологов  $M^{pro}$  среди протеаз в клетках человека, обладающих специфичностью, схожей с таковой для коронавирусной протеазы, перспективными соеди-

Принятые сокращения: ПГЭ – печатный графитовый электрод; AuНЧ – наночастицы золота; DABCYL – 4-((4-(диметиламино)фенил)азо)бензоевая кислота; EDANS – 5-((2-аминоэтил)амино)нафтален-1-сульфоновая кислота; FRET – фёрстеровский резонансный перенос энергии.

\* Адресат для корреспонденции.

нениями для лечения коронавирусных инфекций являются пептидомиметики [6]. Предполагается, что использование  $M^{pro}$ , имеющей высокую консервативность аминокислотной последовательности и структуры, в качестве мишени для терапии коронавирусных инфекций может позволить снизить риск устойчивости к терапии новых вариантов коронавирусов [10, 11]. В связи с необходимостью быстрого поиска эффективной стратегии фармакотерапии коронавирусных инфекций в условиях пандемии, ряд препаратов, ингибирующих  $M^{pro}$ , был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для применения в клинической практике. Однако многие из одобренных препаратов не соответствуют оптимальным параметрам биодоступности, токсичности и эффективности [12]. Более того, появление новых штаммов вирусов, в том числе имеющих мутантные формы  $M^{pro}$ , обусловливает их резистентность к одобренным препаратам и делает необходимым поиск новых противовирусных препаратов для лечения коронавирусных инфекций [12, 13].

Представленные в литературе значения кинетических параметров  $M^{pro}$  находятся в широком диапазоне. Отсутствие консенсуса о кинетических параметрах данного фермента усложняет объективную и точную оценку ингибиторных свойств новых соединений [7]. На данный момент существуют различные подходы к изучению свойств протеаз, основанные на использовании в качестве субстратов меченых пептидов [14]. Ранее для изучения кинетики  $M^{pro}$  были использованы методы, основанные на фёрстеровском резонансном переносе энергии (FRET) и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS), при этом последний подход характеризуется высокой трудоёмкостью [7]. Подходы с использованием FRET также имеют ряд недостатков, таких как искажение реальных значений кинетических параметров фермента из-за снижения фактической интенсивности флуоресценции вследствие межмолекулярных взаимодействий молекулы гасителя, 4-((4-(диметиламино)фенил)азо)бензоевой кислоты (DABCYL), и флуорофора, 5-((2-аминоэтил)амино)нафтален-1-сульфоновой кислоты (EDANS) [1, 7]. Кроме того, использование субстратов, меченых парами гаситель-флуорофор, сопряжено с трудоёмким процессом их синтеза и низкой стабильностью при длительном хранении [1, 7, 15, 16]. В связи с этим представляется актуальной разработка новых, высокоэффективных и удобных в практическом использовании систем для определения протеазной активности  $M^{pro}$ , позволяющих охарактеризовать кинетические параметры данного фермента и проводить



**Схема 1.** Предполагаемый механизм электрохимического окисления тирозина

анализ ингибиторной активности новых соединений, перспективных для лечения COVID-19 [1, 16, 17].

Электрохимические системы, основанные на использовании модельных пептидов для определения каталитической активности протеаз, имеют особое значение, поскольку обладают высокой чувствительностью и малым объёмом используемого анализа [16, 18, 19]. Распространённым принципом электрохимических систем для определения протеазной активности является подход «Signal-off», позволяющий регистрировать активность протеаз по снижению сигнала (тока и/или площади пика) электрохимического окисления или восстановления дополнительных редоксметок, включённых в состав иммобилизованных на поверхности электрода пептидов. Несмотря на то что подобный подход широко применяется на практике, введение дополнительных меток в состав пептидов усложняет процесс их синтеза, а также может влиять на кинетические параметры ферментов и снижать стабильность аналитической системы [20–22]. Таким образом, актуальной задачей является разработка и повышение стабильности электрохимических систем без использования синтетических меток для определения активности протеаз.

Известно, что ряд аминокислот обладает способностью к необратимому электрохимическому окислению [23–27], что может быть использовано для регистрации каталитической активности протеаз электрохимическими методами. Так, тирозин подвергается электрохимическому окислению в соответствии со схемой 1.

Ранее мы разработали электрохимическую систему для определения активности и специфичности трипсина, основанную на регистрации уменьшения площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельных пептидов, иммобилизованных на поверхности печатного графитового электрода (ПГЭ), после их протеолитического расщепления [28]. Преимуществом такого подхода является отсутствие необходимости введения дополнительной синтетической редокс-метки в процессе получения пептидов. Мы предположили, что аналогичный подход может быть применён для создания электрохимической системы для определения

активности M<sup>pro</sup>. Таким образом, целью настоящей работы явилась разработка электрохимической системы для определения активности M<sup>pro</sup>, основанной на регистрации площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельного пептида, иммобилизованного на поверхности ПГЭ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы.** В данной работе были использованы следующие реагенты: золотохлористоводородной (III) кислоты тригидрат от «Alfa Aesar» (Германия); дигидрофосфат калия ( $\geq 99\%$ ), гидрофосфат калия тригидрат ( $\geq 99\%$ ), хлорид натрия (99,5%) от «Acros Organics» (США); глицерин ( $\geq 99\%$ ) от «PanReac AppliChem» (Испания); соляная кислота (30%) от «Sigma-Aldrich» (США); N-9-фторенилметоксикарбонил (Fmoc)-аминокислоты ( $\geq 99\%$ ), O-(1Н-6-хлорбензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфат (HCTU) ( $\geq 98\%$ ), 2,4,6-триметилпиридин (TMP) ( $\geq 99\%$ ), 4-метил-пиперидин (Mpip) ( $\geq 98\%$ ) от «Novabiochem» (Германия); трифтормукусная кислота (99%), ацетонитрил ( $\geq 99,9\%$ ) и анизол (99%) от «Sigma-Aldrich» (Германия); 3,6-диоксо-1,8-октанандитиол (95%) от «Sigma-Aldrich» (США); триизопропилсилан (98%) от «Merck» (Германия); N,N-диметилформамид (DMF) ( $\geq 99,9\%$ ), метил-трет-бутиловый эфир ( $\geq 98\%$ ) и петролейный эфир 70-100 ( $\geq 95\%$ ) от «ЭКОС-1» (Россия); M<sup>pro</sup> коронавируса SARS-CoV-2 (рекомбинантный белок, лиофилизованный порошок, чистота по SDS-PAGE  $\geq 90\%$ ) от «Sigma-Aldrich» (США), кат. # SAE0172. Лиофилизированную M<sup>pro</sup> разводили, в соответствии с рекомендацией производителя, в 100 мкл дистиллированной воды, содержащей 10% глицерина. Полученный раствор M<sup>pro</sup> с концентрацией белка 59,2 мкМ разделяли на аликовты и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Синтез модельного пептида.** Пептид с аминокислотной последовательностью CGGGAVLQSGY был получен методом твердофазного синтеза с использованием Fmoc-защищённых аминокислот в DMF, HCTU/TMP и Mpip на системе Overture («Protein Technologies», США), как было описано ранее [29]. Снятие защиты и отщепление пептида проводились путём инкубации с кислотным коктейлем (91,5% трифтормукусной кислоты, 2,5% анизола, 2,5% воды, 2,5% 3,6-диоксо-1,8-октанандиоила, 1% триизопропилсилана) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем в раствор пептида добавляли восемикратный объём смеси метил-трет-бутилового эфира и петролейного эфира (1 : 2 по объёму), полученную суспензию инкубировали в течение 30 мин при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Далее суспензию пептида центрифуги-

ровали при  $4^{\circ}\text{C}$  и 4000 g в течение 10 мин, а затем удаляли супернатант и растворяли пептид в смеси вода-ацетонитрил (1 : 1 по объёму). Полученный раствор пептида анализировали с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с электроспрейной ионизацией на хроматографе Agilent ChemStation 1200 Series с масс-спектрометром Agilent 1100 Series LC/MSD Trap XCT Ultra. Полученный пептид очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя хроматограф Agilent ChemStation 1200 Series с масс-спектрометром Agilent 6100 Series Quadrupole LC/MS.

**Электроды и электрохимическое оборудование.** В данной работе были использованы ПГЭ с графитовым рабочим (геометрическая площадь 0,0314 см<sup>2</sup>) и вспомогательным электродами, а также хлоридсеребряным (Ag/AgCl) электродом сравнения, полученные от «КолорЭлектроникс» (Москва, Россия).

Электрохимические измерения проводились с использованием потенциостата/гальваностата μStat 400 («Metrohm Autolab BV», Нидерланды) с программным обеспечением DropView 8400.

Все потенциалы в работе приведены относительно Ag/AgCl электрода сравнения.

**Модификация ПГЭ наночастицами золота (AuНЧ) и иммобилизация модельного пептида.** AuНЧ для модификации рабочих ПГЭ были получены методом электросинтеза по методике, описанной ранее [30]. Кратко: в горизонтальном режиме на поверхность ПГЭ наносили 60 мкл 5 мМ HAuCl<sub>4</sub> в 0,1 М HCl. Электросинтез проводился при потенциале рабочего электрода  $-0,5$  В в течение 180 с. После проведения электросинтеза раствор смывался с поверхности электрода дистиллированной водой. Иммобилизация модельного пептида с аминокислотной последовательностью CGGGAVLQSGY на поверхности модифицированных AuНЧ рабочих электродов осуществлялась за счёт образования химических связей между меркаптогруппами N-концевых остатков цистеина молекул модельного пептида и AuНЧ. Для этого на поверхность модифицированных AuНЧ рабочих электродов наносили 50 мкл водного раствора пептида с концентрацией 0,5–6 мМ. Электроды с нанесённым раствором пептида инкубировались в течение 2 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ . После инкубации электроды отмывались от несвязанного модельного пептида дистиллированной водой.

**Определение протеазной активности M<sup>pro</sup>.** Определение протеазной активности M<sup>pro</sup> проводилось по регистрации уменьшения площади пика электроокисления остатка тирозина в модельном пептиде CGGGAVLQSGY, иммобилизованном на поверхности ПГЭ, модифицированных AuНЧ (ПГЭ/AuНЧ), вследствие протеолитического

расщепления пептидной связи, образованной карбонильной группой остатка глутамина и аминогруппой остатка серина. Для этого на поверхность ПГЭ/AuНЧ с иммобилизованным пептидом наносили 25 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 20% глицерина (по объёму) и различные концентрации  $M^{pro}$  (0–1500 нМ). ПГЭ/AuНЧ инкубировались при 37 °C в диапазоне 300–1200 с. После инкубации раствор смывался с поверхности ПГЭ/AuНЧ дистиллированной водой. Далее, на ПГЭ/AuНЧ с иммобилизованным пептидом наносили 60 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 mM NaCl, с последующей регистрацией методом циклической вольтамперометрии площади пика окисления остатков тирозина в области 0,55 В. Циклические вольтамперограммы регистрировались в диапазоне потенциалов от 0,35 до 0,7 В и скорости сканирования 50 мВ/с. Площади пиков, соответствующих окислению остатка тирозина иммобилизованного пептида, рассчитывались после приведения вольтамперометрической кривой к базовой линии с помощью программного обеспечения DropView 8400 к потенциостату/гальваностату. Все электрохимические измерения проводились при комнатной температуре ( $22 \pm 3$  °C).

Поверхностная концентрация электроактивного модельного пептида рассчитывалась по уравнению 1 [31]:

$$\Gamma_0 = \frac{Q}{nFA}, \quad (1)$$

где  $\Gamma_0$  – поверхностная концентрация электроактивного модельного пептида на поверхности электрода (моль/см<sup>2</sup>);  $Q$  – заряд, рассчитанный путём интегрирования окислительного пика остатка тирозина модельного пептида (Кл);  $n$  – количество электронов, участвующих в электрохимическом процессе (для остатка тирозина равно 2);  $F$  – постоянная Фарадея (96 485 Кл/моль);  $A$  – площадь поверхности электрода (см<sup>2</sup>).

Расчёт  $\Gamma_0$  проводился в начальный момент времени и после время-зависимой инкубации иммобилизованного модельного пептида на ПГЭ/AuНЧ с ферментом ( $\Gamma_{0,t}$ ).

Доля нерасщеплённого модельного пептида, иммобилизованного на поверхности ПГЭ/AuНЧ, выражалась как отношение  $\Gamma_{0,t}$  к значению  $\Gamma_0$ , умноженное на 100%, в соответствии с уравнением 2:

$$\text{Нерасщеплённый пептид, \%} = \frac{\Gamma_{0,t}}{\Gamma_0} \times 100\%, \quad (2)$$

где  $\Gamma_{0,t}$  – поверхностная концентрация электроактивного пептида на поверхности ПГЭ/AuНЧ после время-зависимой инкубации с  $M^{pro}$  (моль/см<sup>2</sup>).

Доля расщеплённого модельного пептида после инкубации с  $M^{pro}$  ( $\theta$ ) рассчитывалась по уравнению 3 [32]:

$$\theta = 1 - \frac{\Gamma_{0,t}}{\Gamma_0}, \quad (3)$$

где  $\theta$  – доля расщеплённого модельного пептида.

Зависимости  $\theta$  от времени инкубации ( $t$ ) иммобилизованного на ПГЭ/AuНЧ модельного пептида с различными концентрациями  $M^{pro}$  были аппроксимированы экспоненциальной функцией в соответствии с уравнением 4 [33]:

$$\theta = a[1 - e^{-tk_{eff}}], \quad (4)$$

где  $a$  – предельное значение доли расщеплённого пептида при индивидуальной концентрации  $M^{pro}$ , представляющее собой горизонтальную асимптоту, к которой стремится график зависимости  $\theta$  от  $t$  при неполном расщеплении модельного пептида;  $e$  – экспонента (2,718);  $t$  – время инкубации (с);  $k_{eff}$  – эффективная константа скорости (с<sup>-1</sup>).

Тангенсы начальных линейных участков зависимостей  $\theta$  от  $t$  при каждой концентрации  $M^{pro}$  соответствовали значениям  $k_{eff}$ . Далее из зависимости  $k_{eff}$  от концентрации  $M^{pro}$ , аппроксимированной гиперболической функцией, были определены значения константы каталитической ( $k_{cat}$ ) и константы Михаэлиса ( $K_m$ ) в соответствии с уравнением 5 [32, 33]:

$$k_{eff} = \frac{k_{cat}}{1 + (K_m / [E])}, \quad (5)$$

где  $k_{cat}$  – константа каталитическая (с<sup>-1</sup>),  $K_m$  – константа Михаэлиса (М),  $[E]$  – концентрация фермента (М).

**Математическая и статистическая обработка данных.** Построение и анализ кривых выполнены с помощью программы OriginPro (версия 8.1). Статистическая обработка данных была произведена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2019. Все измерения проводили не менее трёх раз. Представлены средние значения ± стандартные отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Дизайн электрохимической системы для определения активности  $M^{pro}$ .** Для разработки электрохимической системы были выбраны ПГЭ, модифицированные AuНЧ (ПГЭ/AuНЧ). ПГЭ позволяют проводить анализ ферментативной активности, не требующий трудоёмкой предподготовки и позволяющий использовать небольшие объёмы аналита [34]. Возможность модификации ПГЭ на наноматериалами позволяет создавать поверхность,



**Схема 2.** Фрагмент пептида, расщепляемого M<sup>pro</sup>, где P<sub>1</sub> – остаток глутамина; P<sub>1'</sub> – остаток аминокислоты, имеющей небольшой радикал (серин, аланин или глицин); P<sub>2</sub> – гидрофобный аминокислотный остаток (лейцин, фенилаланин или валин). Стрелкой показан сайт расщепления под действием M<sup>pro</sup>

подходящую для иммобилизации биологических молекул, в том числе ферментов, миниатюризовать аналитическую систему, а также повысить её чувствительность и селективность [34]. AuНЧ обладают оптимальным набором физико-химических свойств, таких как электропроводимость, биосовместимость, а также удобство синтеза и функционализации путём формирования стабильных и прочных связей с тиольными группами биологических молекул [35–38]. В данной работе AuНЧ были получены методом электросинтеза на рабочем электроде при восстановлении AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> до Au<sup>0</sup> + 4Cl<sup>-</sup> из 60 мкл 5 mM HAuCl<sub>4</sub> в 0,1 M HCl при потенциале -0,5 В в течение 180 с. Размер полученных AuНЧ на поверхности ПГЭ составлял 100–700 нм, что было показано нами ранее с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [28].

Нами была смоделирована последовательность пептида в качестве субстрата M<sup>pro</sup> для последующей иммобилизации на поверхности ПГЭ/AuНЧ. В ряде работ была исследована субстратная специфичность M<sup>pro</sup> и было показано, что фермент расщепляет пептидную связь, образованную карбонильной группой глутамина, при этом аминогруппа должна принадлежать остатку аминокислоты, имеющей небольшой радикал (серин, аланин или глицин), и, кроме того, до остатка глутамина должен располагаться гидрофобный аминокислотный остаток (лейцин, фенилаланин или валин) [39–42] (схема 2). Остатки глутамина и аминокислот в положении P<sub>1'</sub> и P<sub>2</sub> имеют наиболее важное значение для протеазной активно-

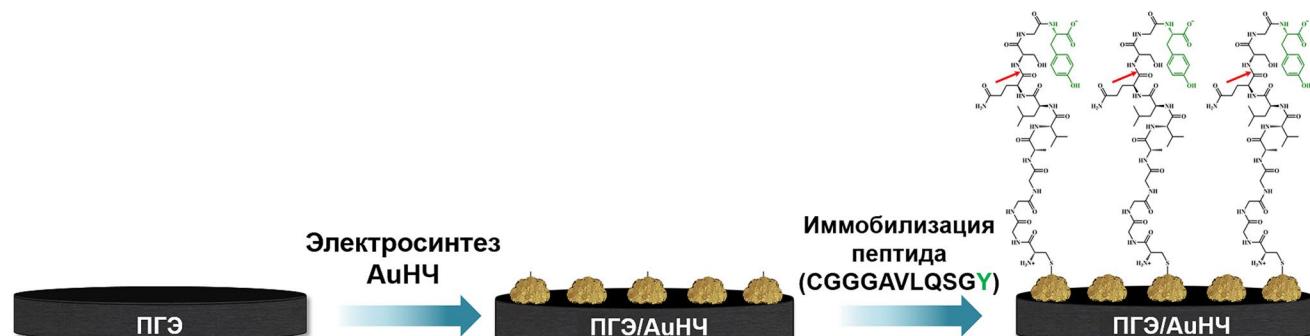
сти M<sup>pro</sup>. Аминокислотные остатки, окружающие описанную консенсусную последовательность, менее консервативны и необходимы для распознавания и стабильного связывания субстрата. Показано, что последовательность AVLQS наиболее эффективно расщепляется M<sup>pro</sup> в условиях *in vitro* [3, 43, 44].

Для иммобилизации пептида на поверхности ПГЭ/AuНЧ в аминокислотную последовательность смоделированного пептида был включён N-концевой остаток цистеина, таким образом, меркаптогруппа цистеина формировалась химическую связь с AuНЧ [45, 46]. Последовательность аминокислот, выступающая в качестве природного спейсера, придаёт пептиду большую подвижность и обеспечивает более высокую плотность пептида, иммобилизованного на поверхности электрода [18, 47, 48], в связи с этим в модельный пептид были включены три остатка глицина. В качестве природной редокс-метки был выбран остаток тирозина, обладающий способностью подвергаться необратимому электрохимическому окислению, что может быть зарегистрировано электрохимическими методами [27, 49, 50]. Таким образом, был смоделирован и получен методом твердофазного синтеза пептид с аминокислотной последовательностью CGGGAVLQSGY, способный расщепляться под действием M<sup>pro</sup> с образованием октапептида CGGGAVLQ и трипептида SGY.

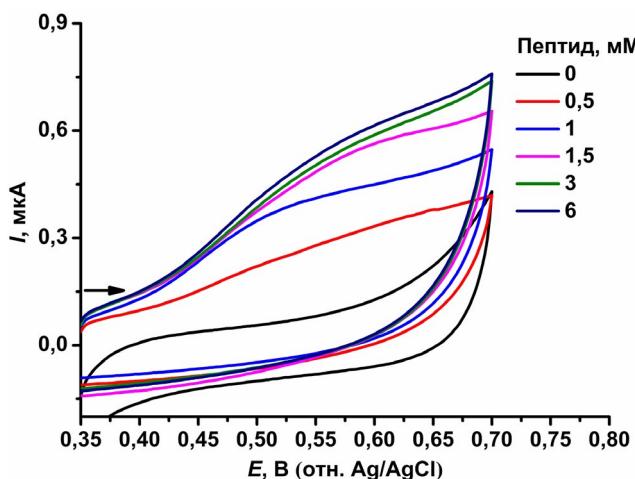
Дизайн модификации электродов AuНЧ и иммобилизации пептида представлен на рис. 1.

После инкубации ПГЭ/AuНЧ с различными концентрациями пептида (0–6 мМ) и отмычки неиммобилизовавшихся молекул был зарегистрирован пик в области 0,55 В методом циклической вольтамперометрии, соответствующий электрохимическому окислению остатков тирозина молекул модельного пептида (рис. 2).

Известно, что высокая плотность пептида на поверхности электрода может приводить к стерическим ограничениям протеазного расщепления пептида, а также снижать соотношение



**Рис. 1.** Модификация ПГЭ AuНЧ, полученными электросинтезом, и иммобилизация модельного пептида CGGGAVLQSGY за счёт образования химической связи между меркаптогруппой цистеина и AuНЧ. Стрелкой показан сайт расщепления пептида под действием M<sup>pro</sup>

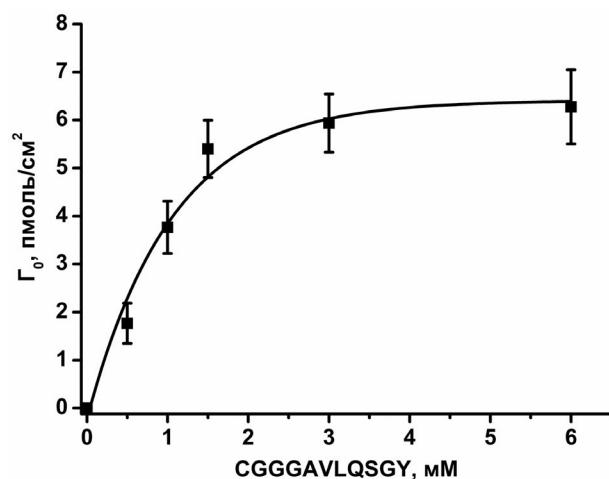


**Рис. 2.** Циклические вольтамперограммы ПГЭ/AuHЧ после инкубации с различными концентрациями модельного пептида CGGGAVLQSGY (0–6 мМ) в течение 2 ч при 4 °C. Измерения проводились в 60 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 50 мВ/с. Стрелка показывает направление сканирования

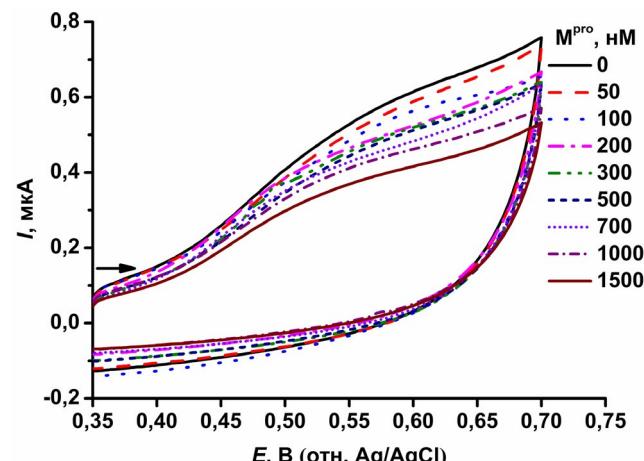
сигнал/шум при электрохимических измерениях [51]. В работе Anne et al. при иммобилизации модельных пептидов на поверхности электродов Ultra-Flat TS-Gold Rotating Disc Electrodes для исследования активности трипсина и тромбина было показано, что при  $\Gamma_0 < 10$  пмоль/см<sup>2</sup> достигается плотность пептида на поверхности электрода, способствующая эффективному протеолизу за счёт снижения вероятности межмолекулярных взаимодействий пептидов [32]. В связи с этим нами была проанализирована зависимость  $\Gamma_0$  от концентрации пептида, наносимого на поверхность ПГЭ/AuHЧ для иммобилизации (рис. 3).

На основании зависимости, представленной на рис. 3, мы предположили, что 1,5 мМ концентрация пептида, наносимого на ПГЭ/AuHЧ, при которой достигается значение  $\Gamma_0$ , равное  $5,4 \pm 0,1$  пмоль/см<sup>2</sup>, является оптимальной, поскольку при больших значениях  $\Gamma_0$  плотность пептида на поверхности электрода может препятствовать эффективному протеазному расщеплению, а меньшей концентрации может быть недостаточно для регистрации кинетики ферментативной реакции из-за более быстрого исчерпания пептида. Таким образом, для дальнейшего исследования протеолитической активности  $M^{pro}$  была выбрана концентрация пептида, наносимого на ПГЭ/AuHЧ для его иммобилизации, равная 1,5 мМ.

Для оценки возможности электрохимической регистрации протеолитической активности  $M^{pro}$  мы провели инкубацию ПГЭ/AuHЧ с иммобилизованным пептидом в присутствии различных концентраций  $M^{pro}$  (0–1500 нМ) во временном



**Рис. 3.** Зависимость поверхностной концентрации ( $\Gamma_0$ ) электроактивного пептида CGGGAVLQSGY от его концентрации в растворе, наносимом на ПГЭ/AuHЧ с последующей инкубацией в течение 2 ч при 4 °C. Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов  $\pm$  стандартные отклонения



**Рис. 4.** Циклические вольтамперограммы ПГЭ/AuHЧ с иммобилизованным модельным пептидом CGGGAVLQSGY после инкубации с различными концентрациями  $M^{pro}$  (0–1500 нМ) в течение 1200 с при 37 °C. Измерения проводились в 60 мкл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl. Скорость сканирования 50 мВ/с. Стрелка показывает направление сканирования

диапазоне 300–1200 с при 37 °C. Как видно на рис. 4, при увеличении концентрации фермента после инкубации в течение 1200 с регистрируется уменьшение тока и площади пика электрохимического окисления остатка тирозина в области 0,55 В, что свидетельствует о протеолитическом расщеплении пептида с высвобождением тирозин-содержащего фрагмента (SGY).

В соответствии с уравнением 2 мы определили значение доли нерасщеплённого пептида (%) при его инкубации с различными концентрация-

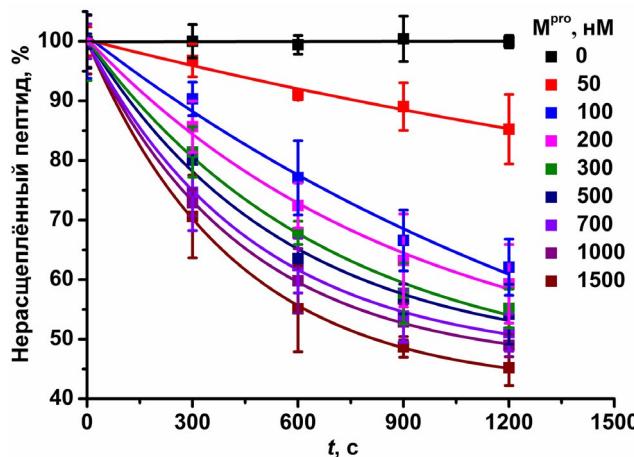


Рис. 5. Зависимости доли нерасщеплённого пептида (%) от времени его инкубации ( $t$ ) с различными концентрациями  $M^{pro}$  (0–1500 нМ). Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов  $\pm$  стандартные отклонения

ми  $M^{pro}$  (0–1500 нМ) в диапазоне 300–1200 с при 37 °C (рис. 5).

Из представленной зависимости доли нерасщеплённого пептида от  $t$  видно, что при увеличении концентрации  $M^{pro}$  увеличивается доля расщеплённого пептида ( $\theta$ ). При этом после инкубации ПГЭ/АиНЧ с иммобилизованным пептидом с раствором без  $M^{pro}$  практически не наблюдается снижения площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельного пептида в заданном диапазоне времени. Выбранный диапазон концентраций  $M^{pro}$ , при котором регистрируется время-зависимое расщепление пептида, был использован для дальнейшего определения кинетических параметров  $M^{pro}$ .

Таким образом, была показана возможность регистрации активности  $M^{pro}$  с помощью разработанной электрохимической системы.

Мы определили аналитические характеристики разработанной электрохимической системы. Зависимость доли нерасщеплённого пептида (%) от логарифма концентраций  $M^{pro}$  имела линейный характер и описывалась уравнением вида:  $y = -(17,752 \pm 1,827)x + (101,19 \pm 4,69)$  со значением  $R^2 = 0,9303$  (рис. 6). Из данного уравнения был рассчитан предел обнаружения (LOD) для  $M^{pro}$  с учётом трёхкратного стандартного отклонения среднего значения площади пика окисления тирозина (Зб) как 44 нМ. Коэффициент вариации (CV) был рассчитан как 7% ( $n = 3$ ) для концентрации  $M^{pro}$ , равной 1500 нМ. Для сравнения, в работе Sondag et al. LOD для люминесцентного анализа с пептидным образцом, содержащим сайт специфического расщепления  $M^{pro}$ , находился в диапазоне 4–80 нМ [52], а в работе Xu et al. значение LOD составило 35 нМ для титрования с саморасщеп-

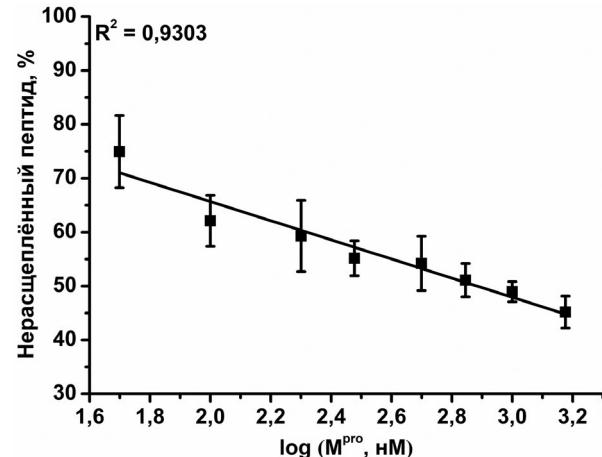


Рис. 6. Зависимость доли нерасщеплённого пептида (%) от логарифма концентраций  $M^{pro}$ . Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов  $\pm$  стандартные отклонения

ляющимся флуоресцентным субстратом для обнаружения  $M^{pro}$  [53].

**Кинетический анализ протеазной активности  $M^{pro}$ .** Для определения параметров стационарной кинетики  $M^{pro}$  по отношению к модельному пептиду CGGGAVLQSGY с помощью разработанной электрохимической системы применялась математическая модель для квазинасыщенных ферментных систем, в которых концентрация  $M^{pro}$  превышала значение концентрации иммобилизованного пептида [54]. Зависимость  $\theta$  от  $t$  в подобных гетерогенных ферментных системах является экспоненциальной и описывается уравнением 6 [32]:

$$\theta = 1 - e^{-tk_{eff}}. \quad (6)$$

Однако для соответствия экспериментально полученных данных этому уравнению значение  $\theta$  должно достигать 1, что соответствовало бы полному расщеплению иммобилизованного пептида. Поскольку в таких системах чаще всего не происходит полного расщепления иммобилизованного пептида, для аппроксимации зависимости  $\theta$  от  $t$  было использовано уравнение 4, содержащее дополнительную переменную  $a$ , соответствующую максимально возможному значению доли расщеплённого пептида при заданной концентрации  $M^{pro}$ . Для иммобилизованного модельного пептида при различных концентрациях  $M^{pro}$  были получены зависимости  $\theta$  от  $t$ , представленные на рис. 7.

Значение  $a$  после инкубации иммобилизованного на поверхности ПГЭ/АиНЧ модельного пептида в течение 1200 с при максимальной концентрации  $M^{pro}$ , равной 1500 нМ, было рассчитано как 0,582, что согласуется с предположением

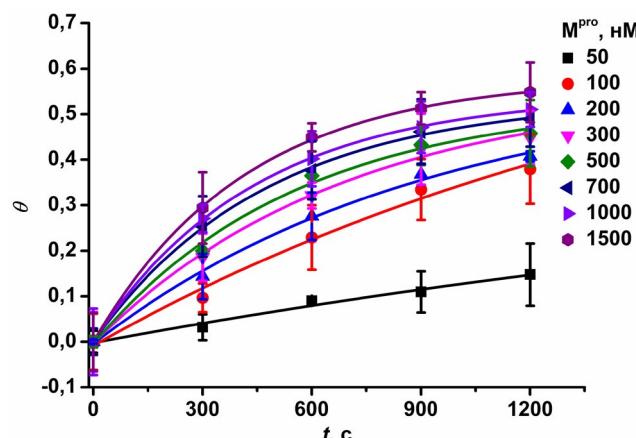


Рис. 7. Зависимости доли расщеплённого модельного пептида CGGGAVLQSGY под действием  $M^{pro}$  ( $\theta$ ) от времени инкубации ( $t$ ) с различными концентрациями фермента (50–1500 нМ). Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов  $\pm$  стандартные отклонения

о неполном расщеплении пептида. Неполное расщепление иммобилизованного пептида под действием фермента может объясняться стерическими ограничениями, возникающими из-за неравномерного покрытия пептидом структурно неоднородной поверхности рабочего электрода, а также наличия электрохимически инертных компонентов в составе рабочего электрода, способных влиять на кинетику гетерогенных электрохимических процессов [55]. Кроме того, известно, что протеазной активностью обладает димерная форма  $M^{pro}$ , тогда как мономерная форма обладает более низкой катализитической активностью или неактивна [56–58]. Таким образом, соотношение димерной и мономерной формы  $M^{pro}$  в растворе также может оказывать влияние на кинетику протеазного расщепления пептида в электрохимической системе.

Из полученных зависимостей  $\theta$  от  $t$  были рассчитаны значения  $k_{eff}$ . Зависимость  $k_{eff}$  от концентрации  $M^{pro}$  имела гиперболический характер ( $R^2 = 0,9948$ ) и подчинялась уравнению 5, что характерно для гетерогенных систем (рис. 8).

Из полученной зависимости, представленной на рис. 8, были рассчитаны  $k_{cat}$ ,  $K_m$  и эффективность катализа, выраженная как  $k_{cat}/K_m$ , которые соответствовали значениям  $(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ,  $(358 \pm 32) \cdot 10^{-9} \text{ М}$  и  $8659 \text{ с}^{-1}/\text{М}$  соответственно. Мы сравнили кинетические параметры  $M^{pro}$ , полученные с помощью разработанной электрохимической системы, с аналогичными параметрами, полученными с помощью альтернативных систем для определения активности  $M^{pro}$ , основанных на использовании флуоресцентных методов и LC-MS. Так, в работе Sacco et al. с помощью метода FRET были получены кинетические параметры  $M^{pro}$ ,

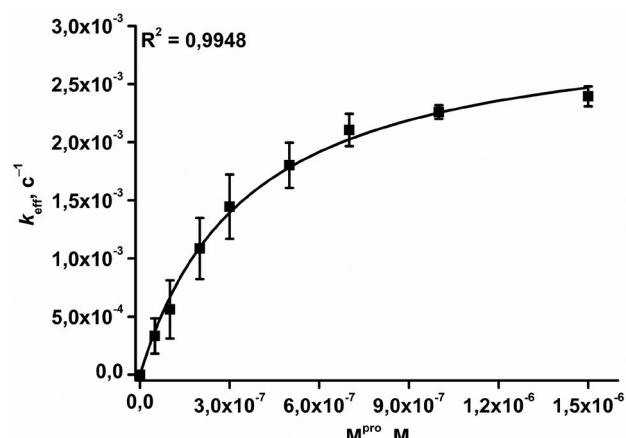


Рис. 8. Зависимость константы эффективной ( $k_{eff}$ ) от концентрации  $M^{pro}$ , наносимой на поверхность ПГЭ/АуНЧ с иммобилизованным пептидом CGGGAVLQSGY. Представлены средние значения из не менее трёх повторов экспериментов  $\pm$  стандартные отклонения

$M^{pro}$  с гистидиновой меткой и  $M^{pro}$ , содержащей дополнительные  $N$ -концевые остатки гистидина и метионина, по отношению к пептидному субстрату DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS) [59]. Значения  $k_{cat}$  для этих ферментов находились в диапазоне от  $0,01 \text{ с}^{-1}$  до  $0,21 \text{ с}^{-1}$ , значения  $K_m$  – от  $27,8 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  до  $53,1 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ , значения  $k_{cat}/K_m$  – от  $214 \text{ с}^{-1}/\text{М}$  до  $6689 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ . В работе Rut et al. аналогичные параметры были получены для  $M^{pro}$  по отношению к различным пептидам с флуоресцентными метками, в том числе содержащим непротеиногенные аминокислоты (Ac-Abu-Tle-LQ-ACC, Ac-Thz-Tle-LQ-ACC, Ac-VKLQ-ACC) [40]. Значения  $k_{cat}$  находились в диапазоне от  $0,050 \text{ с}^{-1}$  до  $0,178 \text{ с}^{-1}$ , значения  $K_m$  – от  $189,5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  до  $228,4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ , значения  $k_{cat}/K_m$  – от  $219 \text{ с}^{-1}/\text{М}$  до  $859 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ . Поскольку в данной работе  $M^{pro}$  обладала низкой активностью по отношению к тетрапептидам, авторы синтезировали более длинные пептидные субстраты ACC-G-Abu-Tle-LQSGFRK(DNP)-K-NH<sub>2</sub>, ACC-G-Thz-Tle-LQSGFRK(DNP)-K-NH<sub>2</sub> и ACC-GVKLQSGFRK(DNP)-K-NH<sub>2</sub>, содержащие пары гаситель-флуорофор. Для соответствующих субстратов были рассчитаны значения  $k_{cat}/K_m$ , находящиеся в диапазоне от  $6755 \text{ с}^{-1}/\text{М}$  до  $19\,424 \text{ с}^{-1}/\text{М}$ . В работе Li et al. для определения кинетических параметров  $M^{pro}$  и меченой  $M^{pro}$  были применены методы FRET и LC-MS. При этом значения  $k_{cat}$ ,  $K_m$  и  $k_{cat}/K_m$ , полученные с использованием FRET по отношению к FRET-субстрату DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS), были рассчитаны как  $0,23 \pm 0,01 \text{ с}^{-1}$ ,  $(34,2 \pm 4,8) \cdot 10^{-6} \text{ М}$  и  $6800 \pm 976 \text{ с}^{-1}/\text{М}$  для немеченого фермента соответственно и  $0,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ ,  $(139 \pm 22,2) \cdot 10^{-6} \text{ М}$  и  $67,5 \pm 11,8 \text{ с}^{-1}/\text{М}$  для меченого фермента соответственно [7]. Значения аналогичных параметров, полученных в данной работе для немеченой  $M^{pro}$  по отношению

**Таблица 1.** Параметры стационарной кинетики M<sup>pro</sup>, полученные с помощью различных аналитических подходов

Фермент	$k_{\text{cat}}$ , с <sup>-1</sup>	$K_M$ , М	$k_{\text{cat}}/K_M$ , с <sup>-1</sup> /М	Субстрат	Ссылка
Флуоресцентные методы					
M <sup>pro</sup>	0,16	(27,8 ± 5,2) · 10 <sup>-6</sup>	5748	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	[59]
	0,178 ± 0,016	(207,3 ± 12) · 10 <sup>-6</sup>	859 ± 57	Ac-Abu-Tle-LQ-ACC	[40]
	0,144 ± 0,006	(189,5 ± 2,7) · 10 <sup>-6</sup>	760 ± 50	Ac-Thz-Tle-LQ-ACC	
	0,050 ± 0,002	(228,4 ± 9,9) · 10 <sup>-6</sup>	219 ± 3	Ac-VKLQ-ACC	
	не приведены	не приведены	14 748 ± 684	ACC-G-Abu-Tle-LQSGFRK(DNP)K-NH <sub>2</sub>	
	не приведены	не приведены	19 424 ± 1176	ACC-G-Thz-Tle-LQSGFRK(DNP)K-NH <sub>2</sub>	
	не приведены	не приведены	6755 ± 208	ACC-GVKLQSGFRK(DNP)K-NH <sub>2</sub>	
	0,23 ± 0,01	(34,2 ± 4,8) · 10 <sup>-6</sup>	6800 ± 976	DABCYL-KTSAVLQSFRKME(EDANS)	[7]
Меченая M <sup>pro</sup>	(0,9 ± 0,1) · 10 <sup>-2</sup>	(139 ± 22,2) · 10 <sup>-6</sup>	67,5 ± 11,8	DABCYL-KTSAVLQSFRKME(EDANS)	[7]
	0,21	(30,9 ± 3,8) · 10 <sup>-6</sup>	6689	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	[59]
	0,01	(53,1 ± 8,1) · 10 <sup>-6</sup>	214	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	
	0,040	11 · 10 <sup>-6</sup>	3640	DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS)	[60]
LC-MS					
M <sup>pro</sup>	2,2 ± 0,07	(903,5 ± 86,9) · 10 <sup>-6</sup>	2444 ± 248	TSAVLQSGFR	[7]
Электрохимические системы					
M <sup>pro</sup>	(3,1 ± 0,1) · 10 <sup>-3</sup>	(358 ± 32) · 10 <sup>-9</sup>	8659	CGGGAVLQSGY	данная работа

Примечание. Abu – аминомасляная кислота; ACC – 7-амино-4-карбамоилметилкумарин; DNP – 2,4-динитротифенил; Thz – тиазолидин-4-карбоновая кислота; Tle – 2-амино-3,3-диметилмасляная кислота.

к пептиду TSAVLQSGFR с применением метода LC-MS, были рассчитаны как  $2,2 \pm 0,07$  с<sup>-1</sup>,  $(903,5 \pm 86,9) \cdot 10^{-6}$  М и  $2444 \pm 248$  с<sup>-1</sup>/М соответственно. В работе Abian et al. значения  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_M$  и  $k_{\text{cat}}/K_M$  M<sup>pro</sup> с гистидиновой меткой по отношению к FRET-субстрату DABCYL-KTSAVLQSGFRKME(EDANS) были рассчитаны как  $0,040$  с<sup>-1</sup>,  $11 \cdot 10^{-6}$  М и  $3640$  с<sup>-1</sup>/М соответственно [60]. В табл. 1 суммированы параметры стационарной кинетики, полученные с помощью альтернативных аналитических методов и электрохимической системы, разработанной нами.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Коронавирусные протеазы, в частности, главная протеаза коронавирусов M<sup>pro</sup>, являются потенциальной мишенью для терапии вирусных забо-

леваний, что обуславливает важность изучения свойств и поиска новых высокоэффективных ингибиторов этих ферментов. Существующие на сегодняшний день методы определения активности M<sup>pro</sup> имеют ряд недостатков, среди которых необходимость использования меченых пептидных субстратов и высокая трудоёмкость аналитического процесса. В связи с этим разработка новых аналитических подходов к определению активности M<sup>pro</sup> является актуальной задачей. Нами была разработана электрохимическая система для определения активности M<sup>pro</sup>, основанная на регистрации методом циклической вольтамперометрии площади пика электрохимического окисления остатка тирозина модельного пептида, иммобилизованного на поверхности ПГЭ/АиНЧ и использующегося в качестве субстрата. Смоделированный пептид содержал N-концевой остаток цистеина для его ковалентной иммобилизации

на поверхности ПГЭ/AuНЧ, три остатка глицина в качестве спейсера, последовательность AVLQS (наиболее эффективно расщепляемую под действием  $M^{pro}$  по пептидной связи, образованной карбонильной группой остатка глутамина и аминогруппой остатка серина) и C-концевой дипептид, состоящий из остатков глицина и тирозина. Уменьшение площади пика электрохимического окисления остатка тирозина служило аналитическим сигналом каталитической активности  $M^{pro}$ . LOD в разработанной системе был сопоставим с аналогичным параметром других систем для определения активности  $M^{pro}$ . С помощью разработанного подхода нами были определены параметры стационарной кинетики  $M^{pro}$  по отношению к модельному пептиду CGGGAVLQSGY. Полученные нами значения  $k_{cat}$  и  $K_m$  для  $M^{pro}$  по отношению к модельному пептиду CGGGAVLQSGY отличались от аналогичных параметров, полученных с помощью других аналитических подходов. По-видимому, это связано с различной аминокислотной последовательностью пептидных субстратов, которые использовались в настоящей и вышеуказанных работах. Кроме того, в электрохимической системе пептидный субстрат находится в иммобилизованном на поверхности электрода состоянии. Однако значение  $k_{cat}/K_m$  для  $M^{pro}$ , которое было определено с помощью разработанной нами электрохимической системы, находится в диапазоне значений данного параметра, полученного с помощью вышеуказанных

альтернативных систем для определения активности  $M^{pro}$  ( $67,5\text{--}19\ 424\text{ c}^{-1}/M$ ). Достоинством разработанного подхода является отсутствие необходимости включения дополнительной химической метки в пептидный субстрат. Мы полагаем, что разработанная электрохимическая система может быть использована для поиска новых ингибиторов  $M^{pro}$ , перспективных для лечения коронавирусных инфекций.

**Вклад авторов.** В.В. Шумянцева, С.А. Мошковский, А.В. Кузиков – концепция и руководство исследованием; Т.А. Филиппова, Р.А. Масарех, Т.Е. Фарафонова, Ю.Ю. Худоклинова – проведение экспериментов; Т.А. Филиппова, Р.А. Масарех, А.В. Кузиков – написание текста статьи; Т.А. Филиппова, Р.А. Масарех, Т.Е. Фарафонова, Ю.Ю. Худоклинова, В.В. Шумянцева, С.А. Мошковский, А.В. Кузиков – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период, 2021–2030 гг. (№ 122030100168-2).

**Благодарности.** В работе использовали оборудование ЦКП «Протеом человека» ИБМХ.

**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. Yan, H., Zhang, R., Yan, G., Liu, Z., Liu, X., Liu, X., and Chen, Y. (2023) Production of a versatile SARS-CoV-2 main protease biosensor based on a dimerization-dependent red fluorescent protein, *J. Med. Virol.*, **95**, e28342, <https://doi.org/10.1002/jmv.28342>.
2. Hu, Q., Xiong, Y., Zhu, G.-H., Zhang, Y.-N., Zhang, Y.-W., Huang, P., and Ge, G.-B. (2022) The SARS-CoV-2 main protease ( $M^{pro}$ ): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19, *MedComm*, **3**, e151, <https://doi.org/10.1002/mco.2022.151>.
3. Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X., Zhang, L., Peng, C., Duan, Y., Yu, J., Wang, L., Yang, K., Liu, F., Jiang, R., Yang, X., You, T., Liu, X., Yang, X., and Yang, H. (2020), Structure of  $M^{pro}$  from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors, *Nature*, **582**, 289–293, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.
4. Jin, Z., Mantri, Y., Retout, M., Cheng, Y., Zhou, J., Jorns, A., Fajtova, P., Yim, W., Moore, C., Xu, M., Creyer, M. N., Borum, R. M., Zhou, J., Wu, Z., He, T., Penny, W. F., O'Donoghue, A. J., and Jokerst, J. V. (2022) A charge-switchable zwitterionic peptide for rapid detection of SARS-CoV-2 main protease, *Angew. Chem.*, **134**, e202112995, <https://doi.org/10.1002/anie.202112995>.
5. Chan, H. T. H., Moesser, M. A., Walters, R. K., Malla, T. R., Twidale, R. M., John, T., Deeks, H. M., Johnston-Wood, T., Mikhailov, V., Sessions, R. B., Dawson, W., Salah, E., Lukacik, P., Strain-Damerell, C., Owen, C. D., Nakajima, T., Świderek, K., Lodziola, A., Moliner, V., et al. (2021) Discovery of SARS-CoV-2  $M^{pro}$  peptide inhibitors from modelling substrate and ligand binding, *Chem. Sci.*, **12**, 13686–13703, <https://doi.org/10.1039/d1sc03628a>.
6. Ullrich, S., and Nitsche, C. (2020) The SARS-CoV-2 main protease as drug target, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 127377, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127377>.
7. Li, F., Fang, T., Guo, F., Zhao, Z., and Zhang, J. (2023) Comprehensive understanding of the kinetic behaviors of main protease from SARS-CoV-2 and SARS-CoV: new data and comparison to published parameters, *Molecules*, **28**, 4605, <https://doi.org/10.3390/molecules28124605>.

8. Antonopoulou, I., Sapountzaki, E., Rova, U., and Christakopoulos, P. (2022) Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (M<sup>pro</sup>) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature's toolbox of bioactive compounds, *Comput. Struct. Biotechnol.*, **20**, 1306-1344, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.009>.
9. Zhu, W., Xu, M., Chen, C. Z., Guo, H., Shen, M., Hu, X., Shinn, P., Klumpp-Thomas, C., Michael, S. G., and Zheng, W. (2020) Identification of SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors by a quantitative high-throughput screening, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **3**, 1008-1016, <https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00108>.
10. Parigger, L., Krassnigg, A., Schopper, T., Singh, A., Tappler, K., Köchl, K., Hetmann, M., Gruber, K., Steinkellner, G., and Gruber, C. C. (2022) Recent changes in the mutational dynamics of the SARS-CoV-2 main protease substantiate the danger of emerging resistance to antiviral drugs, *Front. Med.*, **9**, 1061142, <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1061142>.
11. Eberle, R. J., Sevenich, M., Gering, I., Scharbert, L., Strodel, B., Lakomek, N. A., Santur, K., Mohrlüder, J., Coronado, M. A., and Willbold, D. (2023) Discovery of all-d-peptide inhibitors of SARS-CoV-2 3C-like protease, *ACS Chem. Biol.*, **18**, 315-330, <https://doi.org/10.1021/acschembio.2c00735>.
12. Huang, C., Shuai, H., Qiao, J., Hou, Y., Zeng, R., Xia, A., Xie, L., Fang, Z., Li, Y., Yoon, C., Huang, Q., Hu, B., You, J., Quan, B., Zhao, X., Guo, N., Zhang, S., Ma, R., Zhang, J., Wang, Y., and Yang, S. (2023) A new generation M<sup>pro</sup> inhibitor with potent activity against SARS-CoV-2 Omicron variants, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **8**, 128, <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01392-w>.
13. Chatterjee, S., Bhattacharya, M., Dhama, K., Lee, S.-S., and Chakraborty, C. (2023) Resistance to nirmatrelvir due to mutations in the M<sup>pro</sup> in the subvariants of SARS-CoV-2 Omicron: another concern? *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **32**, 263-266, <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.03.013>.
14. Rodriguez-Rios, M., Megia-Fernandez, A., Norman, D. J., and Bradley, M. (2022) Peptide probes for proteases – innovations and applications for monitoring proteolytic activity, *Chem. Soc. Rev.*, **51**, 2081-2120, <https://doi.org/10.1039/d1cs00798j>.
15. Feng, Y., Liu, G., La, M., and Liu, L. (2022) Colorimetric and electrochemical methods for the detection of SARS-CoV-2 main protease by peptide-triggered assembly of gold nanoparticles, *Molecules*, **27**, 615, <https://doi.org/10.3390/molecules27030615>.
16. Zhang, Q., Liu, G., and Ou, L. (2022) Electrochemical biosensor for the detection of SARS-CoV-2 main protease and its inhibitor ebselen, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **17**, 220421, <https://doi.org/10.20964/2022.04.19>.
17. Legare, S., Heide, F., Bailey-Elkin, B. A., and Stetefeld, J. (2022) Improved SARS-CoV-2 main protease high-throughput screening assay using a 5-carboxyfluorescein substrate, *J. Biol. Chem.*, **298**, 101739, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101739>.
18. Escobar, V., Scaramozzino, N., Vidic, J., Buhot, A., Mathey, R., Chaix, C., and Hou, Y. (2023) Recent advances on peptide-based biosensors and electronic noses for foodborne pathogen detection, *Biosensors*, **13**, 258, <https://doi.org/10.3390/bios13020258>.
19. Filippova, T. A., Masamreh, R. A., Khudoklinova, Y. Y., Shumyantseva, V. V., and Kuzikov, A. V. (2024) The multifaceted role of proteases and modern analytical methods for investigation of their catalytic activity, *Biochimie*, **222**, 169-194, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.03.006>.
20. Zambry, N. S., Obande, G. A., Khalid, M. F., Bustami, Y., Hamzah, H. H., Awang, M. S., Aziah, I., and Manaf, A. A. (2022) Utilizing electrochemical-based sensing approaches for the detection of SARS-CoV-2 in clinical samples: a review, *Biosensors*, **12**, 473, <https://doi.org/10.3390/bios12070473>.
21. Lipińska, W., Grochowska, K., and Siuzdak, K. (2021) Enzyme immobilization on gold nanoparticles for electrochemical glucose biosensors, *Nanomaterials*, **11**, 1156, <https://doi.org/10.3390/nano11051156>.
22. Sanko, V., and Kuralay, F. (2023) Label-free electrochemical biosensor platforms for cancer diagnosis: recent achievements and challenges, *Biosensors*, **13**, 333, <https://doi.org/10.3390/bios13030333>.
23. Brabec, V., and Mornstein, V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.*, **625**, 43-50, [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90106-3).
24. Brabec, V., and Mornstein, V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. II. Electrooxidation of amino acids, *Biophys. Chem.*, **12**, 159-165, [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(80\)80048-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(80)80048-2).
25. Reynaud, J. A., Malfoy, B., and Bere, A. (1980) The electrochemical oxidation of three proteins: RNAase A, bovine serum albumin and concanavalin A at solid electrodes, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **116**, 595-606, [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80281-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80281-6).
26. Reynaud, J. A., Malfoy, B., and Canesson, P. (1980) Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **114**, 195-211, [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(80\)80447-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(80)80447-5).
27. Shumyantseva, V. V., Suprun, E. V., Bulko, T. V., and Archakov, A. I. (2014) Electrochemical methods for detection of post-translational modifications of proteins, *Biosens. Bioelectron.*, **61**, 131-139, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.001>.

28. Filippova, T. A., Masamrehk, R. A., Shumyantseva, V. V., Latsis, I. A., Farafonova, T. E., Ilina, I. Y., Kanashenko, S. L., Moshkovskii, S. A., and Kuzikov, A. V. (2023) Electrochemical biosensor for trypsin activity assay based on cleavage of immobilized tyrosine-containing peptide, *Talanta*, **257**, 124341, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124341>.
29. Hood, C. A., Fuentes, G., Patel, H., Page, K., Menakuru, M., and Park, J. H. (2008) Fast conventional Fmoc solid-phase peptide synthesis with HCTU, *J. Pept. Sci.*, **14**, 97-101, <https://doi.org/10.1002/psc.921>.
30. Shumkov, A. A., Suprun, E. V., Shatinina, S. Z., Lisitsa, A. V., Shumyantseva, V. V., and Archakov, A. I. (2013) Gold and silver nanoparticles for electrochemical detection of cardiac troponin I based on stripping voltammetry, *Bionanoscience*, **3**, 216-222, <https://doi.org/10.1007/s12668-013-0090-9>.
31. Rusling, J. E., Wang, B., and Yun, S. (2008) Electrochemistry of redox enzymes, in *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*, Wiley, pp. 39-85, <https://doi.org/10.1002/9780470753842.ch2>.
32. Anne, A., Chovin, A., and Demaille, C. (2012) Optimizing electrode-attached redox-peptide systems for kinetic characterization of protease action on immobilized substrates. Observation of dissimilar behavior of trypsin and thrombin enzymes, *Langmuir*, **28**, 8804-8813, <https://doi.org/10.1021/la301316r>.
33. Ucar, A., González-Fernández, E., Staderini, M., Avlonitis, N., Murray, A. F., Bradley, M., and Mount, A. R. (2020) Miniaturisation of a peptide-based electrochemical protease activity sensor using platinum microelectrodes, *Analyst*, **145**, 975-982, <https://doi.org/10.1039/c9an02321f>.
34. Paimard, G., Ghasali, E., and Baeza, M. (2023) Screen-printed electrodes: fabrication, modification, and biosensing applications, *Chemosensors*, **11**, 113, <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020113>.
35. Icimoto, M. Y., Brito, A. M. M., Ramos, M. P. C., Oliveira, V., and Nantes-Cardoso, I. L. (2020) Increased stability of oligopeptidases immobilized on gold nanoparticles, *Catalysts*, **10**, 78, <https://doi.org/10.3390/catal10010078>.
36. Kamal, N. N. A., Anuar, N. S., Noordin, R., Rahumatullah, A., and Hamzah, H. H. (2022) Electrodeposited gold nanoparticle (AuNP)-film as a nanoplatform for a label-free electrochemical strongyloidiasis immunosensor, *J. Electrochem. Soc.*, **169**, 106514, <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac9434>.
37. Soldatkin, O. O., Soldatkina, O. V., Piliponskiy, I. I., Rieznichenko, L. S., Gruzina, T. G., Dybkova, S. M., Dzyadevych, S. V., and Soldatkin, A. P. (2022) Application of gold nanoparticles for improvement of analytical characteristics of conductometric enzyme biosensors, *Appl. Nanosci.*, **12**, 995-1003, <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01807-6>.
38. Kilic, N. M., Singh, S., Keles, G., Cinti, S., Kurbanoglu, S., and Odaci, D. (2023) Novel approaches to enzyme-based electrochemical nanobiosensors, *Biosensors*, **13**, 622, <https://doi.org/10.3390/bios13060622>.
39. Zakhарова, М. Ю., Кузнецова, А. А., Уварова, В. И., Фомина, А. Д., Козловская, Л. И., Калиберда, Е. Н., Курбатская, И. Н., Смирнов, И. В., Булыгин, А. А., Кнорре, В. Д., Федорова, О. С., Варнек, А., Осолодкин, Д. И., Исхаков, А. А., et al. (2021) Pre-steady-state kinetics of the SARS-CoV-2 main protease as a powerful tool for antiviral drug discovery, *Front. Pharmacol.*, **12**, 773198, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.773198>.
40. Rut, W., Groborz, K., Zhang, L., Sun, X., Zmudzinski, M., Pawlik, B., Wang, X., Jochmans, D., Neyts, J., Mlynarski, W., Hilgenfeld, R., and Drag, M. (2021) SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging, *Nat. Chem. Biol.*, **17**, 222-228, <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00689-z>.
41. Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K., and Hilgenfeld, R. (2020) Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α-ketoamide inhibitors, *Science*, **368**, 409-412, <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>.
42. Melano, I., Lo, Y.-C., and Su, W.-C. (2023) Characterization of host substrates of SARS-CoV-2 main protease, *Front. Microbiol.*, **14**, 1251705, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1251705>.
43. Dey-Rao, R., Smith, G. R., Timilsina, U., Falls, Z., Samudrala, R., Stavrou, S., and Melendy, T. (2021) A fluorescence-based, gain-of-signal, live cell system to evaluate SARS-CoV-2 main protease inhibition, *Antiviral Res.*, **195**, 105183, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105183>.
44. Hartini, Y., Saputra, B., Wahono, B., Auw, Z., Indayani, F., Adelya, L., Namba, G., and Hariono, M. (2021) Biflavonoid as potential 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro) inhibitor of SARS-CoV-2, *Results Chem.*, **3**, 100087, <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100087>.
45. Park, J., and Kim, M. (2015) Strategies in protein immobilization on a gold surface, *Appl. Sci. Converg. Technol.*, **24**, 1-8, <https://doi.org/10.5757/ASCT.2015.24.1.1>.
46. Gatto, E., and Venanzi, M. (2013) Self-assembled monolayers formed by helical peptide building blocks: a new tool for bioinspired nanotechnology, *Polym. J.*, **45**, 468-480, <https://doi.org/10.1038/pj.2013.27>.
47. Snir, E., Amit, E., Friedler, A., and Yitzchaik, S. (2015) A highly sensitive square wave voltammetry based biosensor for kinase activity measurements, *Biopolymers*, **104**, 515-520, <https://doi.org/10.1002/bip.22653>.
48. Taraballi, F., Natalello, A., Campione, M., Villa, O., Doglia, S. M., Paleari, A., and Gelain, F. (2010) Glycine-spacers influence functional motifs exposure and self-assembling propensity of functionalized substrates tailored for neural stem cell cultures, *Front. Neuroeng.*, **3**, 1161, <https://doi.org/10.3389/neuro.16.001.2010>.
49. Suprun, E. V., Shumyantseva, V. V., and Archakov, A. I. (2014) Protein electrochemistry: application in medicine. A review, *Electrochim. Acta*, **140**, 72-82, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.089>.

50. Moulae, K., and Neri, G. (2021) Electrochemical amino acid sensing: a review on challenges and achievements, *Biosensors*, **11**, 502, <https://doi.org/10.3390/bios11120502>.
51. Anderson, M. J., Song, Y., Fan, H., Wright, J. G., Ren, Z., Hua, D. H., Koehne, J. E., Meyyappan, M., and Li, J. (2020) Simultaneous, multiplex quantification of protease activities using a gold microelectrode array, *Biosens. Bioelectron.*, **165**, 112330, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112330>.
52. Sondag, D., Merx, J., Rossing, E., Boltje, T. J., Löwik, D. W. P. M., Nelissen, F. H. T. M. van Geffen, van't Veer, C., van Heerde, W. L., and Rutjes, F. P. J. T. (2022) Luminescent assay for the screening of SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> inhibitors, *Chembiochem*, **23**, e202200190, <https://doi.org/10.1002/cbic.202200190>.
53. Xu, M., Zhou, J., Cheng, Y., Jin, Z., Clark, A. E., He, T., Yim, W., Li, Y., Chang, Y.-C., Wu, Z., Fajtová, P., O'Donoghue, A. J., Carlin, A. F., Todd, M. D., and Jokerst, J. V. (2022) A self-immolative fluorescent probe for selective detection of SARS-CoV-2 main protease, *Anal. Chem.*, **94**, 11728-11733, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02381>.
54. Gutiérrez, O. A., Salas, E., Hernández, Y., Lissi, E. A., Castrillo, G., Reyes, O., Garay, H., Aguilar, A., García, B., Otero, A., Chavez, M. A., and Duarte, C. A. (2002) An immunoenzymatic solid-phase assay for quantitative determination of HIV-1 protease activity, *Anal. Biochem.*, **307**, 18-24, [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00009-x](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00009-x).
55. Lee, J., Arrigan, D. W. M., and Silvester, D. S. (2016) Mechanical polishing as an improved surface treatment for platinum screen-printed electrodes, *Sensing BioSensing Res.*, **9**, 38-44, <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.05.006>.
56. Nashed, N. T., Aniana, A., Ghirlando, R., Chiliveri, S. C., and Louis, J. M. (2022) Modulation of the monomer-dimer equilibrium and catalytic activity of SARS-CoV-2 main protease by a transition-state analog inhibitor, *Commun. Biol.*, **5**, 160, <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03084-7>.
57. Rebetez, T. (2022) SARS-CoV-2 main protease: a kinetic approach, *J. Phys. Chem. Biophys.*, **12**, 331, <https://doi.org/10.35248/2161-0398.22.12.331>.
58. Davis, D. A., Bulut, H., Shrestha, P., Yaparla, A., Jaeger, H. K., Hattori, S.-I., Wingfield, P. T., Mieyal, J. J., Mitsuya, H., and Yarchoan, R. (2021) Regulation of the dimerization and activity of SARS-CoV-2 main protease through reversible glutathionylation of cysteine 300, *MBio*, **12**, e0209421, <https://doi.org/10.1128/mBio.02094-21>.
59. Sacco, M. D., Ma, C., Lagarias, P., Gao, A., Townsend, J. A., Meng, X., Dube, P., Zhang, X., Hu, Y., Kitamura, N., Hurst, B., et al. (2020) Structure and inhibition of the SARS-CoV-2 main protease reveals strategy for developing dual inhibitors against M<sup>pro</sup> and cathepsin L, *Sci. Adv.*, **6**, eabe0751, <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe0751>.
60. Abian, O., Ortega-Alarcon, D., Jimenez-Alesanco, A., Ceballos-Laita, L., Vega, S., Reyburn, H. T., Rizzuti, B., and Velazquez-Campoy, A. (2020) Structural stability of SARS-CoV-2 3CLpro and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening, *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 1693-1703, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.235>.

## DETERMINATION OF SARS-CoV-2 MAIN PROTEASE (M<sup>pro</sup>) ACTIVITY BASED ON ELECTROOXIDATION OF THE TYROSINE RESIDUE OF A MODEL PEPTIDE

**T. A. Filippova<sup>1,2</sup>, R. A. Masamrehk<sup>1,2</sup>, T. E. Farafonova<sup>1</sup>, Yu. Yu. Khudoklinova<sup>2</sup>,  
V. V. Shumyantseva<sup>1,2</sup>, S. A. Moshkovskii<sup>2,3</sup>, and A. V. Kuzikov<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia; e-mail: alexeykuzikov@gmail.com*

<sup>2</sup>*N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, 117513 Moscow, Russia*

<sup>3</sup>*Max Planck Institute for Multidisciplinary Sciences, 37077 Göttingen, Germany*

The proposed approach for determining the catalytic activity of SARS-CoV-2 main protease (M<sup>pro</sup>) is based on the registration of the peak area of the electrochemical oxidation of the tyrosine residue of the model peptide substrate CGGGAVLQSGY immobilized on the surface of a graphite screen-printed electrode (SPE) modified with gold nanoparticles (AuNP). The AuNP were obtained by electrosynthesis. The steady state kinetic parameters of M<sup>pro</sup> towards the model peptide were determined: catalytic constant ( $k_{cat}$ ) was  $(3.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; Michaelis constant ( $K_M$ ) was  $(358 \pm 32) \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ; catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_M$ ) was  $8659 \text{ s}^{-1}/\text{M}$ . The limit of detection (LOD) determined for M<sup>pro</sup> using the proposed electrochemical system was 44 nM. The proposed approach is a promising tool to search for new M<sup>pro</sup> inhibitors as drugs for the treatment of coronavirus infections.

**Keywords:** M<sup>pro</sup> protease, tyrosine electrooxidation, screen-printed electrodes, gold nanoparticles, model peptide

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИПРОТЕИНОВЫХ ЧАСТИЦ ЗАПУСКАЮТ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВАЦИЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И МОНОЦИТОВ

© 2025 Д.К. Шишкова, В.Е. Маркова, Ю.О. Маркова, М.Ю. Синицкий,  
А.В. Синицкая, В.Г. Матвеева, Е.А. Торгунакова, А.И. Лазебная,  
А.Д. Степанов, А.Г. Кутихин\*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
(НИИ КПССЗ), отдел экспериментальной медицины,  
650002 Кемерово, Россия; электронная почта: kyttag@kemcardio.ru

Поступила в редакцию 13.11.2024  
После доработки 03.12.2024  
Принята к публикации 05.12.2024

Супрафизиологические концентрации кальципротеиновых частиц (КПЧ), нейтрализующих избыточные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$  в крови, индуцируют провоспалительную активацию эндотелиальных клеток (ЭК) и моноцитов. В настоящей работе мы определили физиологические уровни КПЧ (10 мкг/мл кальция, что соответствует увеличению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в сыворотке или культуральной среде на 10%) и изучили, зависят ли патологические эффекты кальциевого стресса от формы доставки кальция (ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , альбуминовые или фетуиновые кальципротеиновые мономеры (КПМ-А/КПМ-Ф) и альбуминовые или фетуиновые кальципротеиновые частицы (КПЧ-А/КПЧ-Ф)). Добавление КПЧ-А или КПЧ-Ф к культурам ЭК приводило к повышению транскрипции провоспалительных генов (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*) и стимулировало секрецию провоспалительных цитокинов (*IL-6*, *IL-8*, *MCP-1/CCL2* и *MIP-3α/CCL20*) и про- и антигемоболических молекул (PAI-1 и uPAR) в человеческих артериальных ЭК и моноцитах, хотя эти эффекты зависели от типа клеток и формы КПЧ. Свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и КПМ-А/КПМ-Ф вызывали менее выраженные и стохастические патологические эффекты. Внутривенное введение  $\text{CaCl}_2$ , КПМ-А или КПЧ-А крысам линии Wistar увеличивало продукцию хемокинов (*CX3CL1*, *MCP-1/CCL2*, *CXCL7*, *CCL11*, *CCL17*), гепатокинов (гепассоцин, фетуин-А, FGF-21, GDF-15), протеаз (MMP-2, MMP-3) и ингибиторов протеаз (PAI-1) в системный кровоток. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что молекулярные последствия кальциевого стресса для ЭК и моноцитов в значительной степени определяются формой доставки кальция внутрь клетки, при этом патологические последствия минерального стресса возникают даже при физиологических концентрациях КПЧ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** кальципротеиновые частицы, кальципротеиновые мономеры, ионы кальция, кальциевый стресс, минеральный стресс, эндотелиальные клетки, моноциты, дисфункция эндотелия, провоспалительная активация эндотелия, системный воспалительный ответ.

DOI: 10.31857/S0320972525010104 EDN: CPGOFV

### ВВЕДЕНИЕ

Кальципротеиновые частицы (КПЧ) и кальципротеиновые мономеры (КПМ) формируются в результате взаимодействия молекул фетуина-А

с новообразованными кластерами фосфата кальция. Формирование КПЧ, нейтрализующих избыточные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$ , представляет собой один из основных механизмов регуляции минерального гомеостаза [1–6]. Альбумин, являющийся

Принятые сокращения: БСФ – фетуин-А из бычьей сыворотки; КПМ – кальципротеиновые мономеры; КПМ-А – альбуминовые КПМ; КПМ-Ф – фетуиновые КПМ; КПЧ – кальципротеиновые частицы; КПЧ-А – альбуминовые КПЧ; КПЧ-Ф – фетуиновые КПЧ; ФИТЦ – изотиоцианат флюоресцеина; ФСБД – фосфатно-солевой буфер по Дульбекко; ЭК – эндотелиальные клетки.

\* Адресат для корреспонденции.

наиболее распространённым белком сыворотки, ответственен за выведение циркулирующих ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [5, 7], тогда как фетуин-А действует как минеральный шаперон, стабилизируя фосфат кальция в виде коллоидных КПМ или способствуя их агрегации в корпскулярные КПЧ [5, 7]. После своего формирования КПЧ удаляются из кровотока эндотелиальными клетками (ЭК) [8–15], моноцитами [13], а также макрофагами печени и селезёнки [16–19]. Формирование КПМ и КПЧ является эволюционным механизмом, предотвращающим перенасыщение крови ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$  (например, в результате костной резорбции) и препятствующим вне скелетной кальцификации – патологическому состоянию, часто встречающемуся у пациентов на поздних стадиях хронической болезни почек [20–22]. В то же время интернализация КПЧ ЭК и моноцитами/макрофагами и их растворение в лизосомах запускают цепь патологических процессов, включающих увеличение концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , митохондриальный и эндоплазматический стресс, активацию сигнальных путей транскрипционного фактора NF-кБ и высвобождение провоспалительных цитокинов (к примеру, IL-6, IL-8 и MCP-1/CCL2), что в конечном итоге способствует развитию хронического стерильного воспаления низкой интенсивности [8–19, 23–26]. Лечение селективным ингибитором фактора некроза опухоли (TNF)- $\alpha$  инфликсимабом снижало количество КПМ и КПЧ в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями [27], что свидетельствует об эффективности противовоспалительной терапии в подавлении провоспалительной активации эндотелия и моноцитов/макрофагов, связанной с воздействием КПЧ.

В экспериментальных исследованиях применяют различные концентрации КПЧ: от 25 мкг/мл [13, 15] до 100–200 мкг/мл кальция [16–18, 25, 28] в зависимости от типа клеток и продолжительности воздействия. Повышенная молярная концентрация ионизированного кальция в сыворотке крови ( $\text{Ca}^{2+}$ ) является фактором риска инфаркта миокарда, ишемического инсульта и смерти от болезней системы кровообращения [11, 29, 30]. Причиной инфаркта миокарда и ишемического инсульта является развитие атеросклероза, которое инициируется активацией эндотелия и нарушением его целостности [31–35]. Средний межквартильный интервал между рисковыми (верхними) и протективными (нижними) уровнями ионизированного кальция составляет 0,12 ммоль/л (приблизительно 10% от среднего референсного значения или 4,8 мкг/мл) [11]; таким образом, для получения клинически значимых результатов количество кальция, добавляемого к клеточным культурам или вводимого экспериментальным животным,

не должно превышать этих значений. Адекватная количественная оценка физиологических доз КПЧ и КПМ должна учитывать их перерасчёты с учётом соответствующей массы ионизированного кальция (например, добавленного в виде  $\text{CaCl}_2$ ), чтобы обеспечить 10%-ное увеличение содержания ионизированного кальция в культуральной среде.

Хотя неблагоприятные последствия кальциевого стресса достаточно хорошо описаны в литературе [36–38], остаётся неясным, определяются ли его патологические эффекты источником кальция (свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , коллоидные КПМ или корпскулярные КПЧ) или исключительно количеством кальция в микроокружении. Ранее сообщалось, что стимуляция кальций-чувствительного рецептора путём увеличения концентрации внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  способствует интернализации КПЧ, что приводит к активации инфламмасомы NLRP3 и сигнального пути IL-1 $\beta$  [39]. Патологические эффекты КПЧ во многом зависят от их кристалличности (аморфные первичные КПЧ и кристаллические вторичные КПЧ) и плотности (КПЧ высокой плотности, осаждающиеся при центрифугировании  $\leq 16\,000\text{ g}$ , и КПЧ низкой плотности, не осаждающиеся при этих параметрах центрифугирования) [40]. Уровни КПЧ высокой плотности в сыворотке крови положительно коррелируют с высоким содержанием провоспалительного цитокина эотаксина, тогда как уровни КПЧ низкой плотности отрицательно коррелируют с концентрацией другого провоспалительного цитокина IL-8 [40]. Увеличенный гидродинамический радиус КПЧ, который коррелирует с нарушением функции почек и возраст-зависимым сосудистым ремоделированием, связан со смертью от болезней системы кровообращения у пациентов с заболеваниями периферических артерий [41], а также с кальцификацией сосудов [42] и с общей смертностью у пациентов с терминалльной хронической почечной недостаточностью [43]. Воздействие КПЧ активирует ремоделирование сосудистой стенки, в том числе коллагеногенез, формирование внеклеточного матрикса [44] и остеохондрогенную дифференцировку сосудистых гладкомышечных клеток, что в значительной степени зависит от распределения размеров частиц, минерального состава и кристалличности КПЧ [45]. Недавние исследования продемонстрировали связь между увеличением концентрации КПЧ и ускоренной кристаллизацией КПЧ с хронической болезнью почек [44], инфарктом миокарда с подъёмом сегмента ST [46] и смертью от болезней системы кровообращения у пациентов с терминалльной хронической почечной недостаточностью [47] или сахарным диабетом 2 типа [48]. Удаление КПЧ из крови приводило к снижению активности хрони-

ческого воспаления, дисфункции эндотелия, гипертрофии левого желудочка и сосудистой кальцификации [49]. Ингибиование кристаллизации КПЧ предотвращало кальцификацию аорты крыс, вызванную гиперfosфатемией [50].

Количественная оценка КПЧ в основном основывается на определении концентрации кальция на единицу объёма [12, 14, 16]. Искусственно синтезированные магний-протеиновые частицы (МПЧ), не содержащие кальция, не показали существенной токсичности при их добавлении к культурам ЭК или внутривенном введении лабораторным животным [11]. Это указывает на то, что именно концентрация кальция является основным фактором, определяющим последствия минерального стресса. Однако внутриклеточное распределение кальция может варьировать в зависимости от способа его доставки – от стабильного и контролируемого поступления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через мембрану клетки [51, 52] до резкого и неконтролируемого повышения концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле после частичного растворения КПЧ в лизосомах [11]. Данные особенности метаболизма кальция могут существенно модулировать транскрипцию генов ЭК при различных видах кальциевого стресса. По этой причине изучение патофизиологии нарушений минерально-го гомеостаза требует понимания молекулярного ответа ЭК на различные формы доставки кальция (циркулирующие ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ и КПЧ).

В настоящем исследовании мы изучили, определяет ли форма доставки кальция реакцию ЭК и моноцитов на физиологически значимый минеральный стресс, который был достигнут добавлением 10 мкг/мл кальция (количество, достаточное для 10%-ного увеличения уровня ионизированного кальция) в культуральную среду или внутривенным введением данной концентрации кальция крысам Wistar. Мы обнаружили, что инкубация первичных артериальных ЭК человека с альбуминовыми КПЧ (КПЧ-А) инициировала их провоспалительную активацию, которая проявлялась повышенным выделением провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, MCP-1/CCL2, MIP-3 $\alpha$ , PAI-1, uPAR) и подтверждалась увеличением экспрессии генов, кодирующих провоспалительные молекулы клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*) и провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2* и *CXCL1*). Инкубация с фетуиновыми КПЧ (КПЧ-Ф) также способствовала высвобождению IL-6, IL-8 и MCP-1/CCL2 и повышала экспрессию генов, кодирующих вышеуказанные молекулы клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP*) и провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL1* и *MIF*). Аналогичным образом инкубация моноцитов с КПЧ-А в условиях пульсирующего потока способствовала высвобождению IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ /1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ , CXCL1,

*CXCL5*, PAI-1, uPAR, NGAL и MMP-9. Добавление свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и альбуминовых КПМ (КПМ-А) вызывало лишь незначительные изменения генной экспрессии и выделения цитокинов первичными артериальными ЭК и моноцитами. Внутривенное введение избытка ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (в виде  $\text{CaCl}_2$ ), КПМ-А или КПЧ-А крысам линии Wistar вызывало системный воспалительный ответ, включавший повышение содержания цитокинов, гепатокинов и протеаз. Мы предполагаем, что патологические эффекты КПЧ *in vitro* определяются локальным кальциевым стрессом после их растворения в лизосомах, в то время как воспалительный ответ на внутривенное болюсное введение кальция в меньшей степени зависит от формы его доставки. Тем не менее даже физиологические дозы КПЧ индуцировали провоспалительную активацию ЭК и моноцитов, а также системный воспалительный ответ *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Синтез и количественный анализ КПМ и КПЧ.** Для приготовления смеси для синтеза КПМ и КПЧ 340 мг бычьего сывороточного альбумина (БСА, «Sigma-Aldrich», США) или 8 мг фетуина-А из бычьей сыворотки (БСФ, «Sigma-Aldrich») растворяли в 4 мл физиологического раствора с последующим добавлением 2 мл  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (24 ммоль/л, «Sigma-Aldrich») и 2 мл  $\text{CaCl}_2$  (40 ммоль/л, «Sigma-Aldrich»). Смесь ресуспензировали после добавления каждого реагента. Конечные концентрации компонентов в смеси составляли 42 мг/мл для БСА и 1 мг/мл для БСФ (что эквивалентно медианному уровню в сыворотке крови человека [11]), 10 ммоль/л для  $\text{CaCl}_2$  (3,2 мг кальция) и 6 ммоль/л для  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Затем супензию аликвотировали в 8 микропробирок (по 1 мл на пробирку), которые помещали в предварительно нагретый (37 °C) нагревательный блок (Термит, «ДНК-Технология», Россия) и инкубировали в течение 10 мин. После этой процедуры смесь содержала три источника кальция: свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ (КПМ-А или КПМ-Ф, фетуиновые КПМ) и КПЧ (КПЧ-А или КПЧ-Ф).

Полученную супензию распределяли по четырём ультрацентрифужным пробиркам (по 2 мл на пробирку, «Beckman Coulter», США) и центрифугировали при 200 000  $g$  (OPTIMA MAX-XR, «Beckman Coulter») в течение 1 ч для осаждения КПЧ-А/КПЧ-Ф, которые затем ресуспензировали в стерильной деионизированной воде в разведении 1 : 200 и визуализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии (S-3400N, «Hitachi», Япония) при ускоряющем напряжении 10 или 30 кВ. КПЧ из атеросклеротических

бляшек и сыворотки крови человека инкубировали в культуральных флааконах («Wuxi NEST Biotechnology», КНР) в течение 6 недель после добавления 3 мл гомогената бляшек или 3 мл сыворотки, 1 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 1 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  к 7 мл среды Игла, модифицированной по Дульбекко (ДМЕМ, «ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, «Capricorn Scientific», Германия), 1% раствора L-глутамина, пенициллина и стрептомицина («Thermo Fisher Scientific», США) и 0,4% амфотерицина В («Thermo Fisher Scientific»). Бляшки гомогенизировали в соответствии с описанной ранее методикой [8]. После инкубации в течение 6 недель КПЧ осаждали и визуализировали при помощи сканирующей электронной микроскопии, в соответствии с описанной ранее методикой [8]. Надосадок с КПМ-А/КПМ-Ф и свободными ионами  $\text{Ca}^{2+}$  переносили в центрифужные концентраторы с порогом молекулярной массы 30 кДа («Guangzhou Jet Bio-Filtration», КНР) и центрифугировали при 1800  $g$  в течение 25 мин для разделения КПМ-А/КПМ-Ф (ретентат) и свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (фильтрат).

Концентрацию кальция в КПЧ-А/КПЧ-Ф, КПМ-А/КПМ-Ф и в виде свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  измеряли посредством колориметрического анализа с использованием ортокрезолфталеинкомплексона и диэтаноламина (CalciScore, «AppScience Products», Россия) после разведения образца 1 : 30, 1 : 10 и 1 : 10 соответственно. Концентрацию альбумина измеряли с использованием набора BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific») после разведения 1 : 200 ретентата, содержащего КПМ (фильтрат, содержащий свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , не разбавляли). Спектрофотометрию (Multiskan Sky, «Thermo Fisher Scientific») проводили на длине волн 575 нм (кальций) и 562 нм (альбумин). Все процедуры проводили в стерильных условиях.

**Оценка дозы.** Количество кальция, необходимое для 10%-ного увеличения содержания ионизированного кальция в среде, оценивали путём добавления 5, 10, 15 или 20 мкг кальция (в форме  $\text{CaCl}_2$ ), растворённого в водном растворе БСА (300 мг/мл, средняя концентрация альбумина в ретентате) или БСФ (28 мг/мл, средняя концентрация фетуина-А в ретентате) на 1 мл бессывороточной культуральной среды (EndoLife, «AppScience Products») или путём добавления 10, 15, 20 или 40 мкг кальция, растворённого в водном растворе БСА (300 мкг/мл), на 1 мл сыворотки крыс. Смесь ресуспендировали и инкубировали в течение 1 ч, после чего измеряли концентрацию ионизированного кальция  $\text{Ca}^{2+}$  (Konelab 70i, «Thermo Fisher Scientific»). В качестве отрицательного контроля использовали среду EndoLife и сыворотку крыс без добавления  $\text{CaCl}_2$ . Согласно нашему предыдущему

исследованию, 10%-ное увеличение содержания ионизированного кальция (0,10–0,14 ммоль/л (от 4,0 до 5,6 мкг/мл); в среднем 0,12 ммоль/л (4,8 мкг/мл) для сыворотки человека) соответствует межквартильному интервалу между верхним (рисковым) и нижним (протективным) квартилями.

**Культивирование клеток.** Первичные ЭК коронарной артерии человека (НСАЕС, «Cell Applications», США) и ЭК внутренней грудной артерии человека (НИТАЕС, «Cell Applications») культивировали во флааконах T-75, согласно протоколу производителя, в среде EndoBoost (EB1, «AppScience Products»), используя для пересева клеток 0,25%-ный раствор трипсина-ЭДТА («ПанЭко») и 10%-ный ФБС для ингибирования трипсина. Непосредственно перед экспериментами среду EndoBoost заменяли на бессывороточную среду EndoLife, в промежутке дважды промывая клеточные культуры тёплым (37 °C) раствором фосфатно-солевого буфера по Дульбекко без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (ФСБД, «БиоЛот», Россия) для удаления остаточных компонентов сыворотки. НСАЕС и НИТАЕС культивировали параллельно в проточных камерах («Ibidi», Германия) или 6-лучочных планшетах («Wuxi NEST Biotechnology») до достижения конфлюэнтности.

Моноциты получали из крови 5 здоровых добровольцев (авторов исследования) путём последовательного выделения мононуклеарных клеток периферической крови в градиенте фиколла (1077 г/см<sup>3</sup>, «ПанЭко») с последующей положительной магнитной сепарацией  $\text{CD14}^+$  клеток с использованием набора EasySep Magnet («STEMCELL Technologies», США) и набора для выделения моноцитов («STEMCELL Technologies»), в соответствии с инструкциями производителя, в стерильных условиях. Количество моноцитов определяли с помощью автоматического счётчика клеток Countess II («Thermo Fisher Scientific») и камер для подсчёта клеток («Thermo Fisher Scientific»).

**Анализ интернализации.** Для анализа интернализации КПМ и КПЧ ЭК использовали КПМ-А и КПЧ-А, меченные флюоресцеинизотиоцианатомеченым БСА (ФИТЦ-БСА, «Thermo Fisher Scientific») либо во время синтеза (путём добавления 750 мкг ФИТЦ-БСА в концентрации 5 мкг/мкл), либо после синтеза путём инкубации осаждённых КПЧ-А с 125 мкг (25 мкл) ФИТЦ-БСА в течение 1 ч при 4 °C и инкубации 500 мкл ретентата (КПМ-А) с 250 мкг (50 мкл) ФИТЦ-БСА в течение 1 ч при 4 °C после перемешивания. Синтез КПМ-А и КПЧ-А проводили в темноте менее чем за 24 ч до эксперимента. После мечения осаждённые КПЧ-А ресуспендировали в ФСБД, центрифугировали при 13 000  $g$  (Microfuge 20R, «Beckman Coulter») в течение 10 мин для удаления несвязавшегося ФИТЦ-БСА и далее ресуспендировали в 400 мкл ФСБД.

Ламинарный поток создавали с использованием системы Ibidi Pump System Quad («Ibidi») с четырьмя отдельными проточными модулями (по одной камере на модуль) и набором Perfusion Set Yellow/Green («Ibidi»). Перед началом эксперимента НСАЕС и НИТАЕС культивировали до достижения конфлюэнтности в проточных камерах (350 000 клеток на камеру) и подвергали воздействию ламинарного потока (15 дин/см<sup>2</sup>) в бессывороточной среде EndoLife в течение 24 ч. Затем меченные ФИТЦ КПМ-А и КПЧ-А добавляли в систему (10 мкг кальция на 1 мл среды; 150 мкг кальция на камеру). Всего было проведено три последовательных эксперимента: 1) с использованием КПМ-А и КПЧ-А, меченных ФИТЦ во время их синтеза; 2) с использованием КПМ-А и КПЧ-А, меченных ФИТЦ после их синтеза; 3) с использованием немеченых КПМ-А и КПЧ-А. ЭК инкубировали с КПМ-А и КПЧ-А в течение 1 ч; ядра окрашивали красителем Hoechst 33342 (2 мкг/мл, «Thermo Fisher Scientific») в течение 5 мин. После тщательной промывки меченные ФИТЦ КПМ-А и КПЧ-А визуализировали с использованием конфокальной микроскопии (LSM 700, «Carl Zeiss», Германия).

Для изучения колокализации лизосом и меченных ФИТЦ КПМ и КПЧ использовали КПМ-А, КПМ-Ф, КПЧ-А и КПЧ-Ф, меченные ФИТЦ, как описано выше. ФИТЦ-меченные КПМ-А, КПМ-Ф, КПЧ-А и КПЧ-Ф (10 мкг кальция на 1 мл среды, 4 мкг кальция на лунку) добавляли к конфлюэнтным культурам НСАЕС и НИТАЕС в 8-луночных камерах («Ibidi») на 3 ч. Затем культуральную среду заменили на свежую, содержащую pH-сенсор Lysotracker Red (1 мкмоль/л, «Thermo Fisher Scientific»), и инкубировали в течение 1 ч. В качестве контроля использовали свободный ФИТЦ-БСА (60 мкг); ядра окрашивали Hoechst 33342 в течение 10 мин. После тщательной промывки меченные ФИТЦ КПМ-А, КПМ-Ф, КПЧ-А и КПЧ-Ф визуализировали с использованием конфокальной микроскопии.

**Добавление свободных ионов Ca<sup>2+</sup>, КПМ и КПЧ к ЭК и моноцитам.** Для исследования реакции ЭК на одинаковые концентрации кальция в различных формах к конфлюэнтным культурам НСАЕС и НИТАЕС на 24 ч добавляли ФСБД (контроль), свободные ионы Ca<sup>2+</sup> (в форме CaCl<sub>2</sub>), КПМ (КПМ-А или КПМ-Ф) или КПЧ (КПЧ-А или КПЧ-Ф) (10 мкг кальция на 1 мл среды; 20 мкг кальция на лунку 6-луночного планшета; n = 18 лунок на группу). Для нивелирования потенциальных защитных эффектов белков во все лунки в соответствующих экспериментах также добавляли БСА (12 мг; средняя масса альбумина в добавленных КПМ-А) или БСФ (0,33 мг; средняя масса фетуина-А в КПМ-Ф). Среду EndoBoost заменили на бессывороточную среду EndoLife

непосредственно перед началом эксперимента. После инкубации в течение 24 ч клетки визуализировали при помощи фазово-контрастной микроскопии. После удаления среды клетки промывали холодным (4 °C) ФСБД и лизировали в реагенте TRIzol («Thermo Fisher Scientific») для выделения РНК, согласно протоколу производителя. Культуральную среду центрифугировали при 2000 g (MiniSpin Plus, «Eppendorf», США) для удаления клеточного детрита, переносили в новые пробирки и замораживали при -80 °C.

Для оценки цитотоксичности различных форм кальциевого стресса проводили микропланшетный колориметрический анализ с использованием водорастворимой соли тетразолия (WST-8) и окрашивание аннексином V/пропидия йодидом с последующей проточной цитометрией. Для оценки интенсивности клеточного метаболизма НСАЕС и НИТАЕС культивировали в 96-луночных планшетах («Wuxi NEST Biotechnology») до достижения конфлюэнтности в среде EndoBoost с последующей её заменой на бессывороточную среду EndoLife и добавлением ФСБД (контроль), свободных ионов Ca<sup>2+</sup> (в форме CaCl<sub>2</sub>), КПМ (КПМ-А или КПМ-Ф) или КПЧ (КПЧ-А или КПЧ-Ф) (10 мкг кальция на 1 мл среды; 2 мкг кальция на лунку 96-луночного планшета; n = 12 лунок на группу). После инкубации в течение 24 ч среду заменили на 100 мкл свежей бессывороточной среды EndoLife и добавляли 10 мкл реагента WST-8 («Wuhan Servicebio Technology», КНР) на 2 ч. Продукты реакции детектировали посредством спектрофотометрии при длине волны 450 нм.

Для окрашивания аннексином V/пропидия йодидом НСАЕС и НИТАЕС культивировали в 6-луночных планшетах («Wuxi NEST Biotechnology») до состояния конфлюэнтности в среде EndoBoost с последующей её заменой на бессывороточную среду EndoLife и добавлением на 24 ч ФСБД (контроль), свободных ионов Ca<sup>2+</sup> (в форме CaCl<sub>2</sub>), КПМ (КПМ-А или КПМ-Ф) или КПЧ (КПЧ-А или КПЧ-Ф) (10 мкг кальция на 1 мл среды, 20 мкг кальция на лунку 6-луночного планшета). Затем ЭК отделяли от культурального пластика с использованием раствора Accutase («Capricorn Scientific») и анализировали с помощью набора для окрашивания аннексином V/пропидия йодидом (ab14085, «Abcam», Великобритания), в соответствии с протоколом производителя. Проточную цитометрию выполняли с использованием прибора CytoFlex и программного обеспечения CytExpert («Beckman Coulter»).

Для анализа реакции моноцитов 350 000 клеток в каждой камере инкубировали в бессывороточной среде EndoLife с равными концентрациями свободных ионов Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub>), КПМ-А или КПЧ-А (10 мкг кальция на 1 мл среды; 150 мкг

кальция на камеру;  $n = 5$  доноров/проведений эксперимента на группу) в системе пульсирующего потока с использованием вышеупомянутого набора для перфузии на 24 ч. В качестве контроля использовали ФСБД; также во все камеры добавляли БСА (87 мг, средняя масса альбумина в добавленных КПМ-А) для нивелирования потенциальных защитных эффектов альбумина. Четыре экспериментальные группы (ФСБД, свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А и КПЧ-А) распределяли по четырём модулям системы пульсирующего потока. Эксперименты выполнялись в стерильных условиях. После 24 ч инкубации культуральную среду центрифugировали при 220  $g$  (5804R, «Eppendorf») для осаждения моноцитов и при 2000  $g$  для удаления клеточного детрита с последующим замораживанием при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Анализ генной экспрессии.** Экспрессию генов в ЭК после добавления свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А/КПМ-Ф или КПЧ-А/КПЧ-Ф анализировали методом количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (OT-кПЦР). кДНК синтезировали с использованием набора M-MuLV-RH First Strand cDNA Synthesis Kit (R01-250, «Евроген», Россия) и обратной транскриптазы M-MuLV-RH (R03-50, «Евроген»). OT-кПЦР проводили с использованием праймеров (500 нмоль/л каждый, «Евроген», табл. П1 Приложения), 20 нг кДНК и набора BioMaster HS-qPCR Lo-ROX SYBR Master Mix (MHR031-2040, «Биолабмикс», Россия), в соответствии с протоколом производителя. Количественный анализ уровней мРНК (генов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *NOS3*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* и *ZEB1*) проводили с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  и нормировали относительно средней экспрессии трёх генов домашнего хозяйства (*GAPDH*, *ACTB* и *B2M*), а также группы ФСБД (контроль).

**Введение свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ и КПЧ крысам линии Wistar.** Протокол исследования на животных был одобрен Локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (код протокола: 042/2023; дата утверждения: 4 апреля 2023 года). Эксперименты на животных проводились в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях. Самцам крыс линии Wistar (масса тела  $\sim 300$  г; объём крови  $\sim 20$  мл, что составляет около 6,5% массы тела) вводили ФСБД (контроль), свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ), КПМ-А или КПЧ-А (10 мкг кальция на 1 мл крови крысы; 200 мкг кальция на крысу;  $n = 5$  крыс на группу, всего  $n = 20$  крыс)

через хвостовую вену. Во все инъекции добавляли БСА (120 мг, средняя масса альбумина, добавленного в КПМ-А) для контроля возможного иммунного ответа на чужеродный альбумин. Через 1 ч всех крыс подвергали эвтаназии путём внутрибрюшинного введения раствора пентобарбитала натрия (100 мг/кг массы тела). Сыворотку выделяли центрифугированием крови при 1700  $g$  в течение 15 мин.

**Дот-блоттинг и иммуноферментный анализ (ИФА).** Уровни белков в культуральной среде измеряли методом дот-блоттинга и ИФА. Дот-блоттинг проводили с использованием набора Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (ARY022B, «R&D Systems», США) и Proteome Profiler Rat XL Cytokine Array (ARY030, «R&D Systems»), в соответствии с инструкциями производителя; визуализацию белков проводили с использованием системы детекции хемилюминесценции Odyssey XF («LI-COR Biosciences», США). Для повышения чувствительности дот-блоттинга образцы культуральной среды концентрировали с помощью вакуумного центрифужного концентратора HyperVAC-LITE («Gyrozen», Республика Корея) перед измерениями. Сыворотку крыс анализировали без предварительной концентрации. Образцы культуральной среды концентрировали до одинакового уровня между экспериментальными группами (для моноцитов – в 7 раз, с 14 мл до 2 мл; для ЭК – в 3 раза, с 3 мл до 1 мл). Для дот-блоттинга использовали по 1 мл концентрированной среды или неконцентрированной сыворотки крыс. Содержание IL-6, IL-8 и MCP-1/CCL2 определяли методом ИФА с использованием соответствующих наборов (A-8768, A-8762 и A-8782, «Вектор-Бест», Россия), в соответствии с протоколами производителя. Колориметрическое определение результатов ИФА проводили посредством спектрофотометрии при длине волны 450 нм. Для ИФА использовали по 100 мкл неконцентрированной культуральной среды на образец.

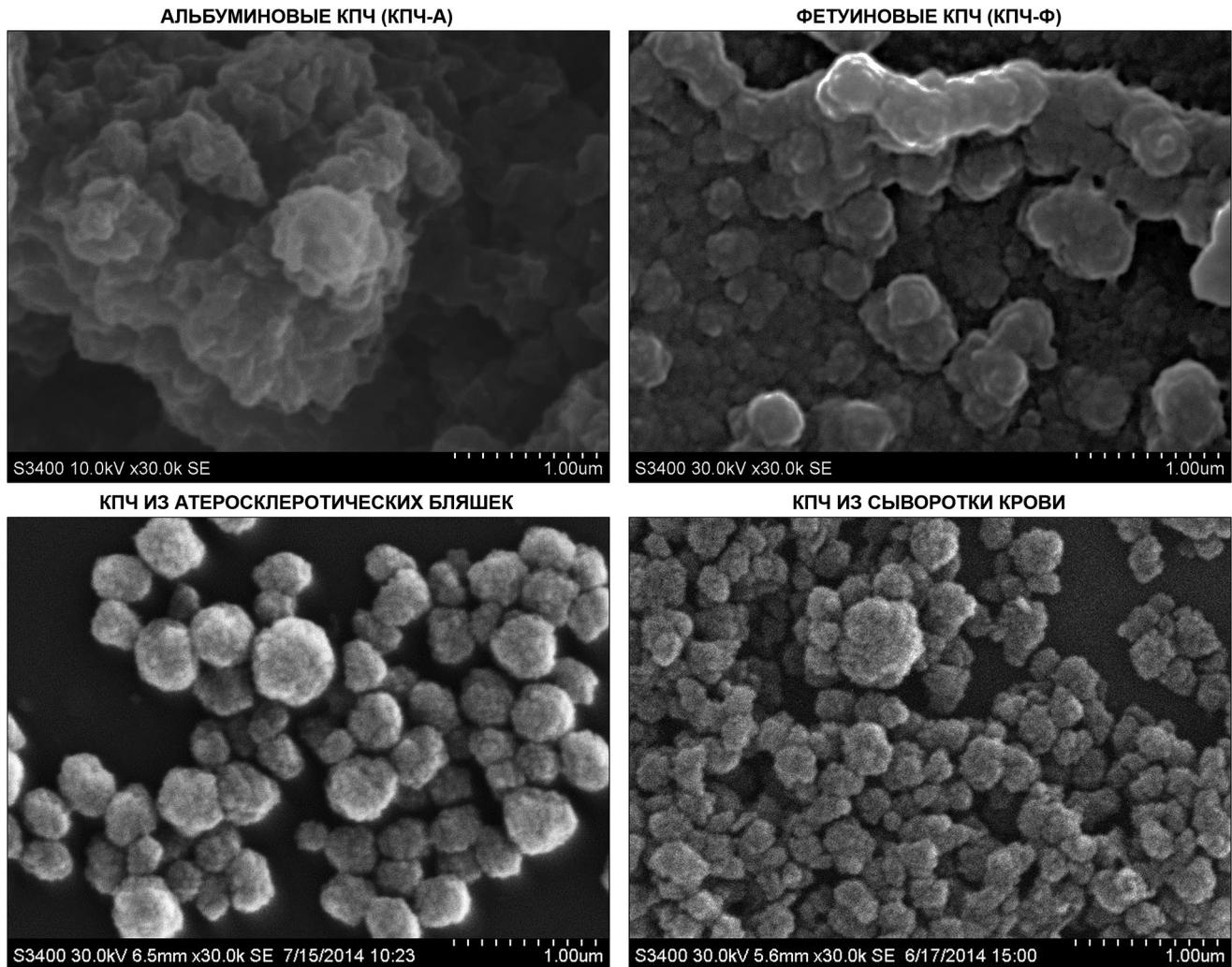
**Статистический анализ** проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 («GraphPad Software», США). Данные для OT-кПЦР представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение. Сравнение четырёх независимых групп проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ОДА) с последующей поправкой на множественные сравнения по критерию Даннета. Результаты ИФА представлены в виде медианы, 25-го и 75-го процентилей и диапазона. Сравнение четырёх независимых групп проводили с использованием теста Краскела–Уоллиса с последующей поправкой на множественные сравнения по критерию Данна. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

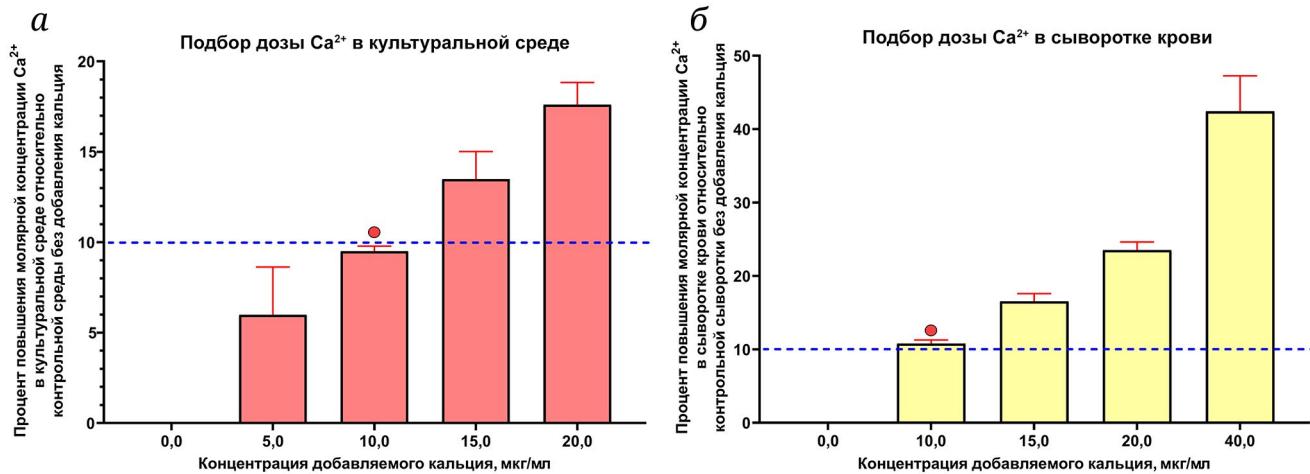
**Физиологическая значимость синтеза КПМ и КПЧ в условиях минерального стресса.** Для изучения влияния различных форм доставки кальция в ЭК и моноциты была синтезирована реакционная смесь, содержащая физиологическую концентрацию БСА либо БСФ, физиологический раствор (NaCl) и супрафизиологические уровни Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и CaCl<sub>2</sub> для одновременного получения КПМ-А/КПМ-Ф и КПЧ-А/КПЧ-Ф. Для выделения КПЧ использовали ультрацентрифугирование, после чего проводили ультрафильтрацию для отделения КПМ (жёлтый ретентат) от свободных ионов и солей (прозрачный фильтрат). Таким образом, кальций был представлен в виде (i) свободных ионов Ca<sup>2+</sup>, (ii) КПМ (коллоидная форма) и (iii) КПЧ (корпускулярная форма). Для синтеза КПМ (КПМ-А) и КПЧ (КПЧ-А) были выбраны и БСФ, и БСА, поскольку ранее было доказано, что

низкий уровень альбумина в сыворотке крови является независимым фактором риска ишемической болезни сердца и ишемического инсульта (в сочетании с повышенными уровнями Ca<sup>2+</sup> в сыворотке) [11]. Низкий уровень альбумина в сыворотке коррелировал с большей склонностью к кальцификации (выражаемой преципитацией КПЧ), а концентрация альбумина положительно коррелировала с молярной концентрацией общего кальция [11]. Поскольку фетуин-А играет ключевую роль как минеральный шаперон и регулирует образование КПМ и КПЧ в крови человека, в большинстве экспериментов использовались также КПМ-Ф и КПЧ-Ф, синтезированные с использованием описанного протокола.

Сканирующая электронная микроскопия КПЧ-А показала их губчатую структуру и неправильную форму, которая отличалась от сферической и игольчатой формы первичных и вторичных КПЧ, полученных из крови (рис. 1).



**Рис. 1.** Микрофотографии альбуминовых КПЧ (КПЧ-А), фетуиновых КПЧ (КПЧ-Ф), КПЧ из атеросклеротических бляшек (КПЧ-Б) и сыворотки (КПЧ-С), полученные методом сканирующей электронной микроскопии. Режим вторичных электронов; ускоряющее напряжение – 10 кВ (КПЧ-А) или 30 кВ (остальные типы КПЧ); увеличение ×30 000; шкала масштаба – 1 мкм



**Рис. 2.** Увеличение концентрации ионизированного кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) в культуральной среде (а) и сыворотке крови крыс (б) при добавлении увеличивающихся количеств  $\text{CaCl}_2$ . Ось абсцисс – концентрация добавленного кальция; ось ординат – увеличение молярной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  относительно контрольной среды или сыворотки без добавления кальция. 10%-ное увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (синяя пунктирная линия) достигалось добавлением 10 мкг кальция на 1 мл среды или сыворотки (красный круг)

КПЧ-Ф имели сферическую форму и губчатую структуру, что делало их схожими с первичными КПЧ, выделенными из атеросклеротических бляшек и сыворотки крови [11]. Эти наблюдения согласуются с ранее полученными данными по сравнению альбуминовых, фетуиновых, бляшечных и сывороточных КПЧ [8] и могут быть объяснены различными взаимодействиями кислых сывороточных белков при образовании КПЧ в крови.

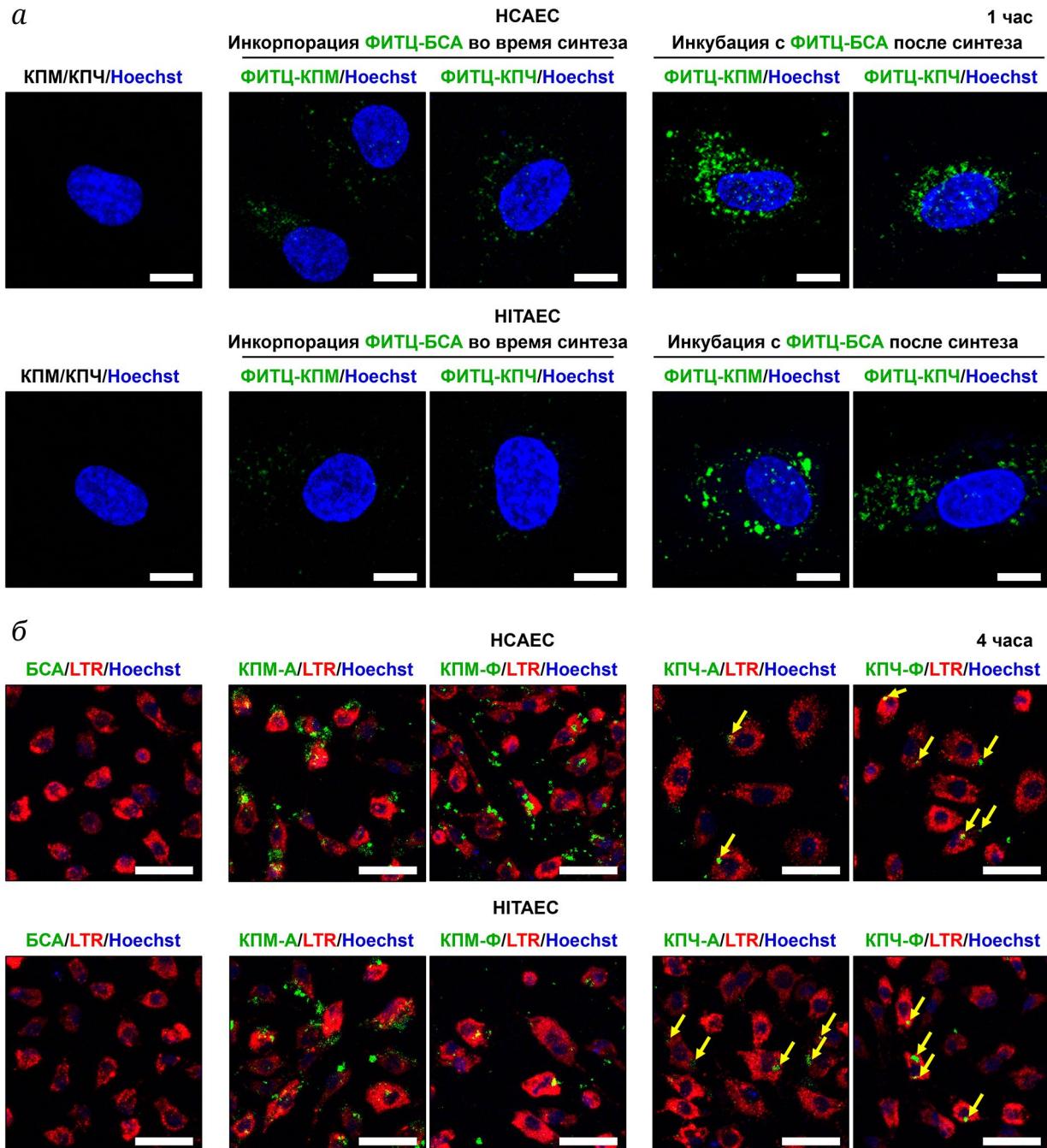
На формирование КПЧ и КПМ уходило 30% и 20% кальция соответственно, тогда как 50% кальция оставалось в растворе в виде свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Это распределение соответствует физиологическому соотношению между ионизированным кальцием ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и кальцием, связанным с белками и фосфором, в сыворотке человека (1 : 1). КПЧ содержали от 11 до 17% общего альбумина, тогда как 83–89% альбумина оставалось в удержанном растворе, сохраняя способность связывать  $\text{Ca}^{2+}$ . Эффективность ультрафильтрации была подтверждена отсутствием в фильтрате БСА или БСФ. Эти данные подтверждают физиологическую значимость разработанной процедуры искусственного синтеза КПМ и КПЧ в условиях минерального стресса.

**Физиологические концентрации КПЧ вызывают провоспалительную активацию ЭК и моноцитов.** Для определения количества кальция, необходимого для обеспечения физиологического увеличения молярной концентрации ионизированного кальция, была построена кривая «доза-ответ». Добавление 10 мкг кальция на 1 мл бессывороточной культуральной среды (рис. 2, а) или сыворотки крыс (рис. 2, б) оказалось достаточным для 10%-ного увеличения концентрации ионизированного кальция (межквартильный интервал

между рисковым и протективным уровнем в популяции). Таким образом, концентрация кальция в 10 мкг/мл была выбрана в качестве оптимальной для моделирования клинически значимого минерального стресса. Дальнейшие эксперименты включали четыре группы: 1) контроль (ФСБД); 2) свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , добавленные в виде  $\text{CaCl}_2$ ; 3) КПМ (КПМ-А или КПМ-Ф); 4) КПЧ (КПЧ-А или КПЧ-Ф).

Для проверки способности интернализации КПМ и КПЧ при культивировании в условиях пульсирующего потока использовали КПМ-А и КПЧ-А, меченные изотиоцианатом флюoresцеина (ФИТЦ-БСА) либо в процессе их синтеза, либо после инкубации осаждённых КПЧ-А и ретентата (КПМ-А) с ФИТЦ-БСА. Интенсивная зелёная флюoresценция наблюдалась в ЭК уже через 1 ч после добавления ФИТЦ-мечёных КПМ-А и КПЧ-А в систему пульсирующего потока (рис. 3, а). КПМ-А и КПЧ-А, инкубированные с ФИТЦ-БСА после синтеза, демонстрировали значительно более высокий уровень флюoresценции по сравнению с образцами, мечеными в процессе синтеза (рис. 3, а). Обнаружение ФИТЦ-мечёных КПМ/КПЧ в лизосомах, окрашенных с помощью pH-сенсора Lysotracker Red, подтвердило интернализацию КПМ-А, КПМ-Ф, КПЧ-А и КПЧ-Ф НСАЕС и НИАЕС после 4 ч инкубации, в то время как свободный ФИТЦ-БСА не проникал в клетки (рис. 3, б).

Для сравнения патологических эффектов различных форм доставки кальция к НСАЕС и НИАЕС добавляли  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А/КПМ-Ф или КПЧ-А/КПЧ-Ф (10 мкг/мл). При помощи светопольной и фазово-контрастной микроскопии наблюдали патологические изменения морфологии ЭК (потеря межклеточных контактов, типичной вытянутой

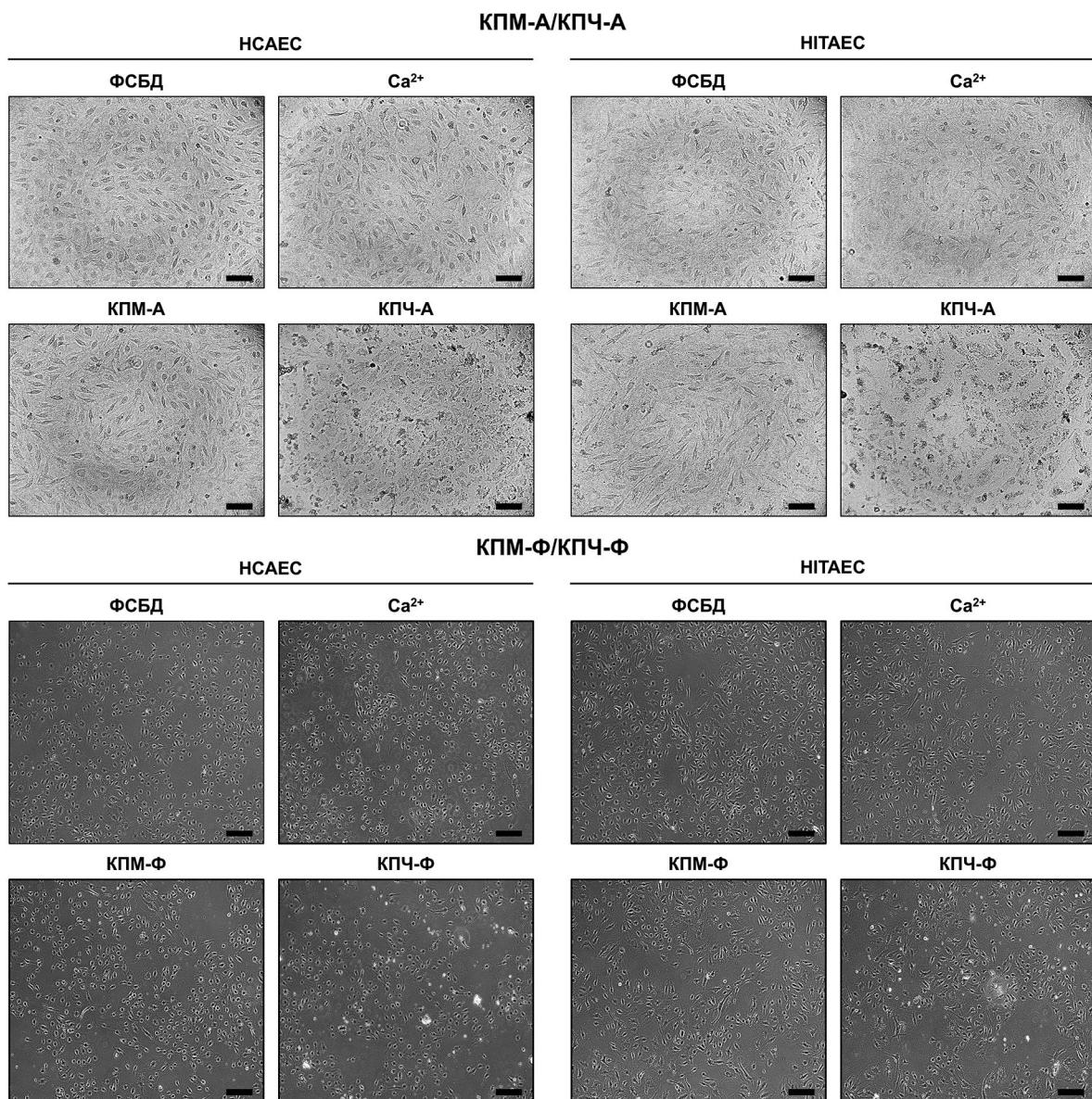


**Рис. 3.** Интернализация ФИТЦ-меченых КПМ (ФИТЦ-КПМ) и КПЧ (ФИТЦ-КПЧ) НСАЕС и НТАЕС. *а* – Сравнение интенсивности сигнала ФИТЦ, интерниализированного ЭК после инкубации с немечеными КПМ и КПЧ (слева), КПМ и КПЧ, меченными ФИТЦ-БСА во время их синтеза (по центру), и КПМ и КПЧ, меченными после их синтеза (справа). Ядра окрашены Hoechst 33342. Конфокальная микроскопия; увеличение  $\times 630$ ; масштабная линейка – 5 мкм. *б* – Лизосомы, окрашенные LysoTracker Red, в ЭК, инкубированных с КПМ (ФИТЦ-КПМ-А и ФИТЦ-КПМ-Ф) или КПЧ (ФИТЦ-КПЧ-А и ФИТЦ-КПЧ-Ф) в течение 4 ч. Слева – свободный ФИТЦ-БСА; центр – КПМ-А и КПМ-Ф, меченные во время синтеза; справа – КПЧ-А и КПЧ-Ф, меченные после синтеза. Жёлтые стрелки указывают на КПЧ внутри клеток. Ядра окрашены Hoechst 33342. Конфокальная микроскопия; увеличение  $\times 200$ ; шкала масштаба – 50 мкм

формы ЭК и их открепление от культурального пластика) после инкубации с КПЧ-А/КПЧ-Ф, но не с  $\text{Ca}^{2+}$  или КПМ-А/КПМ-Ф (рис. 4).

Для оценки цитотоксичности различных форм кальциевого стресса проводили колориметриче-

ский анализ жизнеспособности клеток и метаболической активности с использованием водорастворимой соли тетразолия WST-8. После 24-часовой инкубации с КПЧ-А или КПЧ-Ф интенсивность метаболической активности клеток

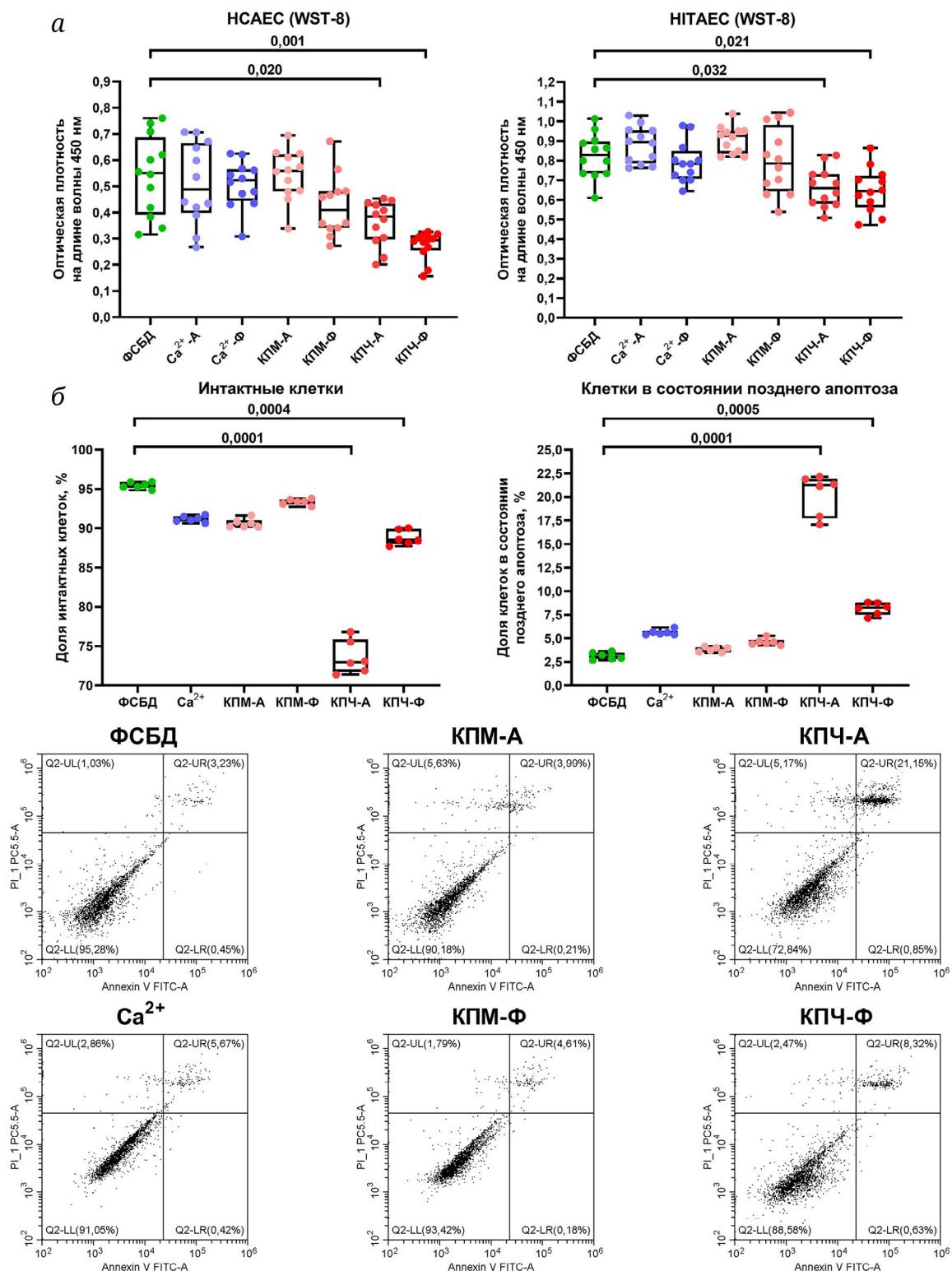


**Рис. 4.** Светлопольная микроскопия (КПМ-А/КПЧ-А, сверху) и фазово-контрастная микроскопия (КПМ-Ф/КПЧ-Ф, снизу) НСАЕС (слева) и НИТАЕС (справа), инкубированных с ФСБД (контроль), свободными ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ (КПМ-А, сверху; КПМ-Ф, снизу) или КПЧ (КПЧ-А, сверху; КПЧ-Ф, снизу) (10 мкг кальция на 1 мл бессывороточной культуральной среды) в течение 24 ч; увеличение  $\times 200$ ; шкала масштаба – 100 мкм

НСАЕС и НИТАЕС существенно снижалась (рис. 5, а). Проточно-цитометрический анализ гибели клеток после окрашивания аннексином V и пропидиум йодидом показал, что значительная доля ЭК подвергалась апоптозу после 24 ч воздействия КПЧ-А или КПЧ-Ф (рис. 5, б).

Посредством ОТ-кПЦР было показано значительное увеличение экспрессии генов, кодирующих провоспалительные молекулы клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1* и *SELE*) и провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2* и *CXCL1*) в НСАЕС, инкубированных с КПЧ-А (табл. 1). Воздействие КПЧ-Ф вызывало аналогичный ответ, включающий повышение экспрессии генов *VCAM1*, *SELP*, *IL6* и *MIF*, а также тенденцию к увеличе-

нию экспрессии генов *ICAM1* и *SELE* (табл. 2). Аналогичный профиль генной экспрессии наблюдался для НИТАЕС, включая индукцию экспрессии генов *VCAM1*, *IL6* и *CXCL8* при воздействии КПЧ-А (табл. 1), в то время как инкубация с КПЧ-Ф повышала экспрессию генов *SELE*, *SELP*, *CXCL1* и *MIF* (табл. 2). Данные результаты указывали на развитие провоспалительной активации эндотелия и свидетельствовали об увеличении содержания провоспалительных цитокинов в культуральной среде. В отличие от КПЧ-А/КПЧ-Ф, свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и КПМ-А/КПМ-Ф вызывали скорее случайные, чем систематические изменения, которые не были связаны с дисфункцией эндотелия.



**Рис. 5.** Тест на цитотоксичность после инкубации НСАЕС (левые панели) и НИТАЕС (правые панели) с ФСБД (контроль), свободными ионами Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup>-A или Ca<sup>2+</sup>-Ф), КПМ (КПМ-А или КПМ-Ф) или КПЧ (КПЧ-А или КПЧ-Ф) (10 мкг кальция на 1 мл бессывороточной культуральной среды) в течение 24 ч. *а* – Колориметрический тест WST-8 (оценка восстановления WST-8 внутриклеточными дегидрогеназами до водорастворимого оранжево-жёлтого фурмазана, максимальная абсорбция которого наблюдается при 450 нм). *б* – Тест с аннексином V и пропидием йодидом (нижний левый квадрант Q2-LL – нормальные клетки; нижний правый квадрант Q2-LR – клетки в состоянии раннего апоптоза; верхний правый квадрант Q2-UR – клетки в состоянии позднего апоптоза; верхний левый квадрант Q2-UL – клетки в состоянии некроза). Верхняя панель – статистический анализ содержания интактных клеток и клеток в состоянии позднего апоптоза. Нижняя панель – репрезентативные проточечно-цитометрические графики. Значения вероятности отклонить верную нулевую гипотезу (*p*) при межгрупповом сравнении указаны над графиками

**Таблица 1.** Относительная экспрессия генов ( $\Delta Ct$ ; кратность изменения; значение  $p$ ) в НСАЕС и НИАЕС, инкубированных с ФСБД (контроль), свободными ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А или КПЧ-А (10 мкг кальция на 1 мл бессывороточной культуральной среды) в течение 24 ч

Ген	Метрика	НСАЕС				НИАЕС			
		ФСБД	$\text{Ca}^{2+}$	КПМ-А	КПЧ-А	ФСБД	$\text{Ca}^{2+}$	КПМ-А	КПЧ-А
<i>VCAM1</i>	$\Delta Ct$	0,0003 ± 0,0006	0,0001 ± 0,0001	0,0002 ± 0,0001	0,0015 ± 0,0010	0,0003 ± 0,0002	0,0011 ± 0,0011	0,0006 ± 0,0004	0,0010 ± 0,0008
	Кратн. изм.	1	0,52	0,76	<b>6,00</b>	1	<b>3,67</b>	2,00	<b>3,33</b>
	$p$	1,00	0,904	0,985	<b>0,001</b>	1,00	<b>0,009</b>	0,463	<b>0,029</b>
<i>ICAM1</i>	$\Delta Ct$	0,0148 ± 0,0066	0,0372 ± 0,0210	0,0118 ± 0,0034	0,1169 ± 0,0837	0,0338 ± 0,0213	0,0503 ± 0,0339	0,0404 ± 0,0244	0,0432 ± 0,0201
	Кратн. изм.	1	2,52	0,80	<b>7,90</b>	1	1,49	1,20	1,28
	$p$	1,00	0,320	0,994	<b>0,001</b>	1,00	0,148	0,782	0,559
<i>SELE</i>	$\Delta Ct$	0,0056 ± 0,0026	0,0089 ± 0,0036	0,0020 ± 0,0009	0,0134 ± 0,0065	0,0595 ± 0,0351	0,1049 ± 0,1387	0,0909 ± 0,1203	0,0943 ± 0,0872
	Кратн. изм.	1	<b>1,59</b>	<b>0,36</b>	<b>2,39</b>	1	1,76	1,53	1,58
	$p$	1,00	<b>0,041</b>	<b>0,026</b>	<b>0,001</b>	1,00	0,415	0,687	0,619
<i>SELP</i>	$\Delta Ct$	0,0077 ± 0,0067	0,0027 ± 0,0008	0,0015 ± 0,0009	0,0026 ± 0,0023	0,0009 ± 0,0006	0,0054 ± 0,0058	0,0056 ± 0,0055	0,0025 ± 0,0030
	Кратн. изм.	1	<b>0,35</b>	<b>0,19</b>	<b>0,34</b>	1	<b>6,00</b>	<b>6,22</b>	2,78
	$p$	1,00	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	1,00	<b>0,008</b>	<b>0,005</b>	0,567
<i>IL6</i>	$\Delta Ct$	0,0182 ± 0,0131	0,0058 ± 0,0023	0,0072 ± 0,0045	0,1197 ± 0,0837	0,0085 ± 0,0043	0,0132 ± 0,0155	0,0197 ± 0,0214	0,0247 ± 0,0272
	Кратн. изм.	1	0,32	0,40	<b>6,58</b>	1	1,55	2,32	<b>2,91</b>
	$p$	1,00	0,729	0,796	<b>0,001</b>	1,00	0,803	0,196	<b>0,035</b>
<i>CXCL8</i>	$\Delta Ct$	0,0371 ± 0,0260	0,0441 ± 0,0152	0,0250 ± 0,0105	2,1412 ± 1,5287	0,1396 ± 0,0561	0,1801 ± 0,2005	0,1825 ± 0,1871	0,3279 ± 0,3681
	Кратн. изм.	1	1,19	0,67	<b>57,71</b>	1	1,29	1,31	<b>2,35</b>
	$p$	1,00	0,999	0,999	<b>0,001</b>	1,00	0,914	0,901	<b>0,045</b>
<i>CCL2</i>	$\Delta Ct$	0,7514 ± 0,6502	0,4398 ± 0,4293	0,6965 ± 0,6669	1,3616 ± 1,0636	0,8908 ± 0,4072	1,2866 ± 1,5286	1,4987 ± 1,6929	1,6162 ± 1,9876
	Кратн. изм.	1	0,59	0,93	<b>1,81</b>	1	1,44	1,68	1,81
	$p$	1,00	0,448	0,992	<b>0,042</b>	1,00	0,777	0,494	0,353
<i>CXCL1</i>	$\Delta Ct$	0,1267 ± 0,0562	0,0436 ± 0,0408	0,0444 ± 0,0343	0,3486 ± 0,1551	0,0647 ± 0,0279	0,1520 ± 0,1842	0,0944 ± 0,0885	0,0983 ± 0,1052
	Кратн. изм.	1	<b>0,34</b>	<b>0,35</b>	<b>2,75</b>	1	2,35	1,46	1,52
	$p$	1,00	<b>0,017</b>	<b>0,018</b>	<b>0,001</b>	1,00	0,069	0,782	0,715
<i>MIF</i>	$\Delta Ct$	0,3853 ± 0,1660	0,2309 ± 0,1040	0,2731 ± 0,0839	0,4170 ± 0,2857	0,2753 ± 0,1576	0,7919 ± 0,9280	0,5270 ± 0,4019	0,4618 ± 0,4146
	Кратн. изм.	1	<b>0,60</b>	0,71	1,08	1	<b>2,88</b>	1,91	1,68
	$p$	1,00	<b>0,031</b>	0,155	0,910	1,00	<b>0,018</b>	0,386	0,618

Таблица 1 (окончание)

Ген	Метрика	НСАЕС				НИТАЕС			
		ФСБД	Ca <sup>2+</sup>	КПМ-А	КПЧ-А	ФСБД	Ca <sup>2+</sup>	КПМ-А	КПЧ-А
<i>NOS3</i>	ΔCt	0,0094 ± 0,0063	0,0069 ± 0,0036	0,0069 ± 0,0033	0,0091 ± 0,0087	0,0031 ± 0,0018	0,0093 ± 0,0090	0,0119 ± 0,0126	0,0060 ± 0,0037
	Кратн. изм.	1	0,73	0,73	0,97	1	<b>3,00</b>	<b>3,84</b>	1,94
	<i>p</i>	1,00	0,473	0,475	0,997	1,00	<b>0,050</b>	<b>0,005</b>	0,547
<i>SNAI1</i>	ΔCt	0,0168 ± 0,0101	0,0100 ± 0,0040	0,0124 ± 0,0065	0,0344 ± 0,0291	0,0049 ± 0,0020	0,0129 ± 0,0110	0,0140 ± 0,0124	0,0094 ± 0,0100
	Кратн. изм.	1	0,60	0,74	<b>2,05</b>	1	<b>2,63</b>	<b>2,86</b>	1,92
	<i>p</i>	1,00	0,487	0,771	<b>0,009</b>	1,00	<b>0,042</b>	<b>0,018</b>	0,371
<i>SNAI2</i>	ΔCt	0,0129 ± 0,0103	0,0038 ± 0,0009	0,0065 ± 0,0046	0,0047 ± 0,0032	0,0009 ± 0,0007	0,0033 ± 0,0022	0,0099 ± 0,0160	0,0030 ± 0,0055
	Кратн. изм.	1	<b>0,29</b>	<b>0,50</b>	<b>0,36</b>	1	3,67	<b>11,00</b>	3,33
	<i>p</i>	1,00	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>0,001</b>	1,00	0,784	<b>0,015</b>	0,841
<i>TWIST1</i>	ΔCt	0,0015 ± 0,0012	0,0003 ± 0,0002	0,0002 ± 0,0001	0,0009 ± 0,0008	0,0004 ± 0,0004	0,0018 ± 0,0026	0,0037 ± 0,0077	0,0016 ± 0,0016
	Кратн. изм.	1	<b>0,20</b>	<b>0,13</b>	0,60	1	4,50	9,25	4,00
	<i>p</i>	1,00	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	0,150	1,00	0,742	0,170	0,874
<i>ZEB1</i>	ΔCt	0,2376 ± 0,1200	0,0779 ± 0,0561	0,1607 ± 0,0596	0,3277 ± 0,2237	0,1438 ± 0,0686	0,3697 ± 0,4382	0,4552 ± 0,4601	0,3559 ± 0,4082
	Кратн. изм.	1	<b>0,33</b>	0,68	1,38	1	2,57	<b>3,17</b>	2,47
	<i>p</i>	1,00	<b>0,002</b>	0,209	0,117	1,00	0,201	<b>0,049</b>	0,244

Примечание. Были проанализированы гены, кодирующие провоспалительные молекулы клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*), эндотелиальную NO-синтазу (*NOS3*) и транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*). Статистическая значимая кратность изменения (fold change) и значения *p* выделены жирным; ΔCt представлены как среднее ± стандартное отклонение.

Таблица 2. Относительная экспрессия генов (ΔCt; кратность изменения; значение *p*) в НСАЕС и НИТАЕС, инкубированных с ФСБД (контроль), свободными ионами Ca<sup>2+</sup>, КПМ-Ф и КПЧ-Ф (5 мкг кальция на 1 мл бессывороточной культуральной среды) в течение 24 ч

Ген	Метрика	НСАЕС				НИТАЕС			
		ФСБД	Ca <sup>2+</sup>	КПМ-Ф	КПЧ-Ф	ФСБД	Ca <sup>2+</sup>	КПМ-Ф	КПЧ-Ф
<i>VCAM1</i>	ΔCt	0,0020 ± 0,0015	0,0019 ± 0,0007	0,0018 ± 0,0009	0,0042 ± 0,0032	0,0004 ± 0,0003	0,0004 ± 0,0002	0,0005 ± 0,0003	0,0006 ± 0,0005
	Кратн. изм.	1	0,95	0,90	<b>2,1</b>	1	0,95	1,28	1,54
	<i>p</i>	1,00	0,998	0,984	<b>0,008</b>	1,00	0,995	0,628	0,113
<i>ICAM1</i>	ΔCt	0,0540 ± 0,0510	0,0165 ± 0,0133	0,0208 ± 0,0266	0,1011 ± 0,1201	0,0646 ± 0,0282	0,0906 ± 0,0503	0,0820 ± 0,0306	0,0885 ± 0,0519
	Кратн. изм.	1	0,31	0,39	1,87	1	1,40	1,27	1,37
	<i>p</i>	1,00	0,229	0,319	0,098	1,00	0,159	0,454	0,213

Таблица 2 (продолжение)

Ген	Метрика	HCAEC				HITAEC			
		ФСБД	Ca <sup>2+</sup>	КПМ-Ф	КПЧ-Ф	ФСБД	Ca <sup>2+</sup>	КПМ-Ф	КПЧ-Ф
<i>SELE</i>	ΔCt	0,0048 ± 0,0037	0,0082 ± 0,0107	0,0028 ± 0,0019	0,0091 ± 0,0053	0,0018 ± 0,0007	0,0084 ± 0,0055	0,0069 ± 0,0032	0,0058 ± 0,0061
	Кратн. изм.	1	1,71	0,58	1,90	1	4,67	3,83	3,22
	p	1,00	0,441	0,879	0,375	1,00	0,001	0,003	0,023
<i>SELP</i>	ΔCt	0,0119 ± 0,0131	0,0060 ± 0,0060	0,0089 ± 0,0079	0,0318 ± 0,0276	0,0050 ± 0,0023	0,0032 ± 0,0016	0,0035 ± 0,0017	0,0078 ± 0,0053
	Кратн. изм.	1	0,50	0,75	2,67	1	0,64	0,70	1,56
	p	1,00	0,534	0,895	0,002	1,00	0,227	0,374	0,025
<i>IL6</i>	ΔCt	0,0072 ± 0,0029	0,0100 ± 0,0097	0,0063 ± 0,0046	0,0233 ± 0,0188	0,0044 ± 0,0016	0,0045 ± 0,0045	0,0031 ± 0,0012	0,0064 ± 0,0042
	Кратн. изм.	1	1,39	0,88	3,24	1	1,02	0,70	1,45
	p	1,00	0,783	0,988	0,001	1,00	0,999	0,463	0,191
<i>CXCL8</i>	ΔCt	0,1330 ± 0,0572	0,2582 ± 0,1501	0,1892 ± 0,0573	0,1632 ± 0,0898	0,0294 ± 0,0175	0,0636 ± 0,0714	0,0366 ± 0,0185	0,0522 ± 0,0411
	Кратн. изм.	1	1,94	1,42	1,23	1	2,16	1,24	1,78
	p	1,00	0,001	0,203	0,668	1,00	0,053	0,924	0,272
<i>CCL2</i>	ΔCt	1,1073 ± 0,3168	2,8331 ± 1,9144	1,1255 ± 0,3747	1,3772 ± 0,8673	0,3096 ± 0,0759	0,5079 ± 0,3852	0,4625 ± 0,1941	0,5145 ± 0,3698
	Кратн. изм.	1	2,56	1,02	1,24	1	1,64	1,49	1,66
	p	1,00	0,001	0,999	0,795	1,00	0,105	0,265	0,090
<i>CXCL1</i>	ΔCt	0,3756 ± 0,1000	0,6205 ± 0,3781	0,4173 ± 0,1658	0,5612 ± 0,3499	0,0543 ± 0,0156	0,1053 ± 0,0885	0,0831 ± 0,0437	0,1477 ± 0,1538
	Кратн. изм.	1	1,65	1,11	1,49	1	1,94	1,53	2,72
	p	1,00	0,026	0,942	0,117	1,00	0,235	0,668	0,009
<i>MIF</i>	ΔCt	2,8076 ± 0,9811	2,6168 ± 1,6847	2,2889 ± 0,8340	5,5963 ± 3,2599	0,2999 ± 0,0856	0,4214 ± 0,3609	0,3627 ± 0,1458	0,6572 ± 0,5581
	Кратн. изм.	1	0,93	0,82	1,99	1	1,41	1,21	2,19
	p	1,00	0,983	0,763	0,001	1,00	0,583	0,904	0,007
<i>NOS3</i>	ΔCt	0,1599 ± 0,0597	0,1075 ± 0,0592	0,1686 ± 0,0643	0,2636 ± 0,0972	0,0176 ± 0,0056	0,0187 ± 0,0174	0,0170 ± 0,0060	0,0347 ± 0,0382
	Кратн. изм.	1	0,67	1,05	1,65	1	1,06	0,97	1,97
	p	1,00	0,082	0,969	0,001	1,00	0,997	0,999	0,050
<i>SNAI1</i>	ΔCt	0,0595 ± 0,0214	0,0513 ± 0,0284	0,0650 ± 0,0257	0,0943 ± 0,0377	0,0017 ± 0,0008	0,0020 ± 0,0017	0,0015 ± 0,0008	0,0031 ± 0,0024
	Кратн. изм.	1	0,86	1,09	1,58	1	1,18	0,88	1,82
	p	1,00	0,728	0,892	0,002	1,00	0,937	0,969	0,031

Таблица 2 (окончание)

Ген	Метрика	НСАЕС				НИТАЕС			
		ФСБД	Ca <sup>2+</sup>	КПМ-Ф	КПЧ-Ф	ФСБД	Ca <sup>2+</sup>	КПМ-Ф	КПЧ-Ф
<i>SNAI2</i>	ΔCt	0,0162 ± 0,0088	0,0097 ± 0,0056	0,0196 ± 0,0100	0,0521 ± 0,0311	0,0003 ± 0,0003	0,0005 ± 0,0006	0,0002 ± 0,0001	0,0003 ± 0,0003
	Кратн. изм.	1	0,60	1,21	<b>3,22</b>	1	1,57	0,63	1,01
	p	1,00	0,596	0,901	<b>0,001</b>	1,00	0,451	0,856	0,999
<i>TWIST1</i>	ΔCt	0,0019 ± 0,0010	0,0016 ± 0,0009	0,0022 ± 0,0011	0,0029 ± 0,0014	0,00013 ± 0,0001	0,0002 ± 0,0001	0,0001 ± 0,0001	0,0003 ± 0,0003
	Кратн. изм.	1	0,84	1,16	1,53	1	1,54	0,85	2,31
	p	1,00	0,757	0,794	0,086	1,00	0,992	0,981	0,094
<i>ZEB1</i>	ΔCt	0,3158 ± 0,2627	0,2493 ± 0,0424	0,2738 ± 0,0783	0,2246 ± 0,2089	0,0468 ± 0,0208	0,0734 ± 0,0970	0,0227 ± 0,0064	0,0589 ± 0,0651
	Кратн. изм.	1	0,16	0,23	0,71	1	1,57	0,49	1,26
	p	1,00	0,294	0,323	0,276	1,00	0,403	0,477	0,875

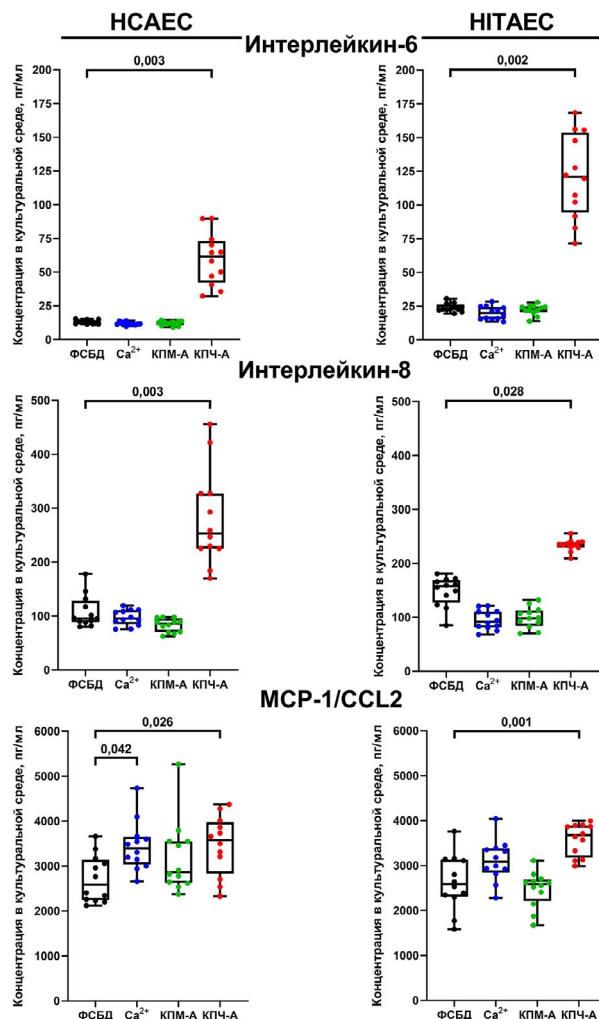
Примечание. Описания анализируемых генов и представления данных приведены в примечании к табл. 1.

Инкубация с КПЧ-А значительно увеличивала экспрессию индуцируемых эндотелиальных провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8 и MCP-1/CCL2) в культуральной среде от НСАЕС и НИТАЕС (рис. 6), в то время как добавление свободных ионов Ca<sup>2+</sup> и КПМ-А не вызывало стабильного патологического ответа на белковом уровне, подтверждая результаты анализа генной экспрессии (рис. 6). Инкубация с КПЧ-Ф также способствовала увеличению экспрессии упомянутых цитокинов в НСАЕС и НИТАЕС, тогда как свободные ионы Ca<sup>2+</sup> и КПМ-Ф вызывали цитокиновый ответ только в НИТАЕС (рис. 7).

Для дальнейшего изучения выделения цитокинов при кальциевом стрессе был проведён полуколичественный анализ методом дот-блоттинга бессывороточной культуральной среды от НСАЕС и НИТАЕС, инкубированных с Ca<sup>2+</sup>, КПМ-А и КПЧ-А. Инкубация с КПЧ-А приводила к повышению выделения PAI-1 (серпина E1), CXCL1, MCP-1/CCL2, IL-8, MIF, растворимых форм CD105 и CD147 в НСАЕС, а также стимулировала синтез ST2 и RANTES/CCL5 в НИТАЕС (рис. 8 и табл. П1 Приложения). Уровни растворимой формы uPAR и MIP-3α/CCL20 также были повышены в культуральной среде от обеих линий ЭК после инкубации с КПЧ-А (рис. 8 и табл. 1). Таким образом, воздействие КПЧ-А индуцировало выделение 11 цитокинов (рис. 8 и табл. П1 Приложения). Экспрессия шести из этих провоспалительных молекул (CXCL1, MCP-1/CCL2, MIF, uPAR, sCD147 и ST2) также была повышена в культуральной среде после инкубации ЭК с

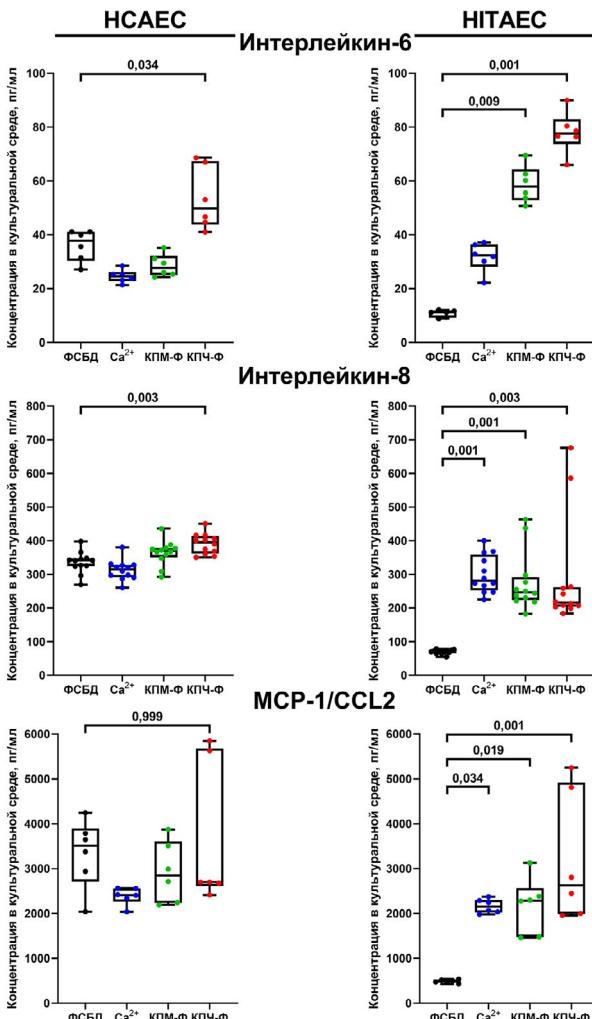
КПМ-А; экспрессия пяти белков (CXCL1, sCD147, ST2, PDGF-AA и RANTES/CCL5) была повышена после добавления CaCl<sub>2</sub> (рис. 8 и табл. П1 Приложения). Наиболее выраженное повышение было отмечено для растворимой формы CD147 (EMMPRIN/басигин; изменение в 11,41 раза в НСАЕС после воздействия КПЧ-А) и MIP-3α/CCL20 (изменение в 12,52 раза в НИТАЕС после воздействия КПЧ-А).

Инкубация моноцитов с КПЧ-А вызывала увеличение выделения серпина E1/PAI-1, CXCL1, хемокина CXCL5, адипонектина, NGAL, IL-6, CHI3L1, аполипопротеина A-I, uPAR, MIP-3α/CCL20 и MMP-9. В отличие от этого, Ca<sup>2+</sup> и КПМ-А вызывали лишь стохастические изменения выделения цитокинов (рис. 9 и табл. П2 Приложения). Воздействие КПЧ-А значительно увеличивало выделение 11 вышеуказанных цитокинов, тогда как эффекты Ca<sup>2+</sup> и КПМ-А ограничивались индукцией NGAL, CHI3L1 и MMP-9 (рис. 9 и табл. П1 Приложения). Белки CXCL1, адипонектин, IL-6 и аполипопротеин A-I были экспрессированы исключительно в культуральной среде от моноцитов, инкубированных с КПЧ-А. Таким образом, было установлено, что КПЧ-А вызывают провоспалительную активацию ЭК и моноцитов, что подтверждается повышенной экспрессией генов цитокинов и увеличенным выделением соответствующих белков. Хотя свободные ионы Ca<sup>2+</sup> и КПМ-А также стимулировали выделение некоторых цитокинов ЭК, их провоспалительные эффекты были менее выраженным по сравнению с КПЧ-А независимо от типа клеточной линии (НСАЕС, НИТАЕС и моноциты).



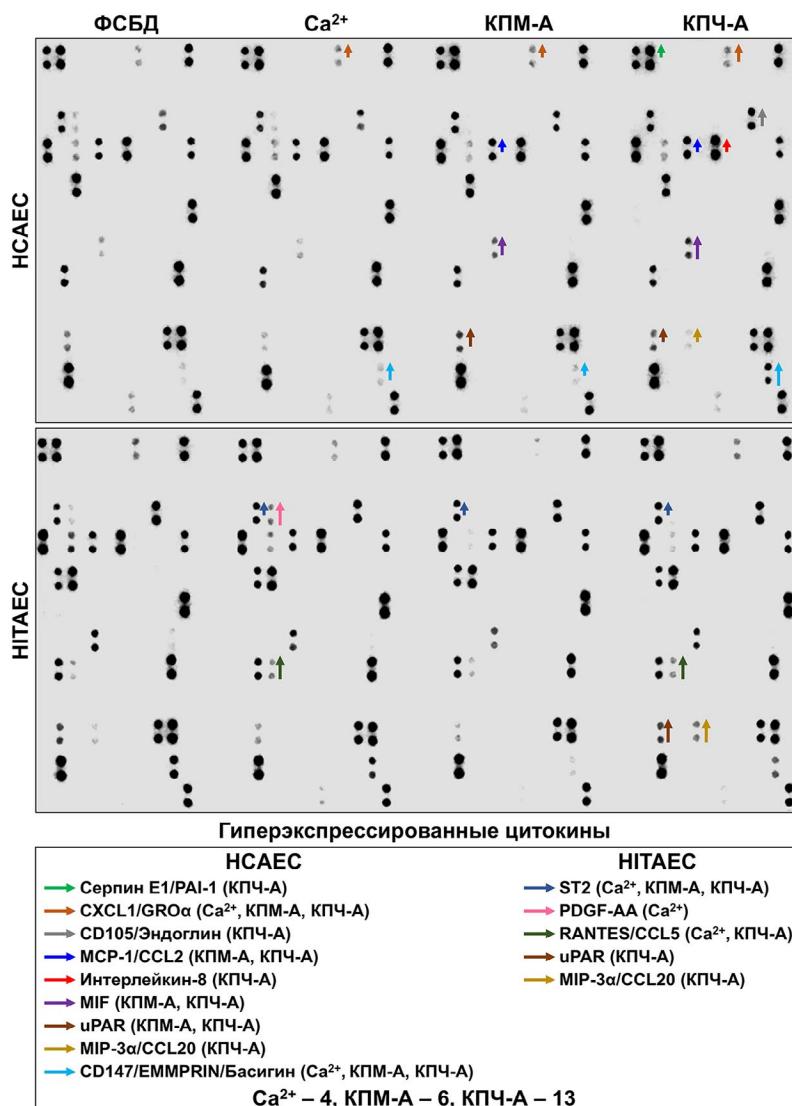
**Рис. 6.** Оценка уровней IL-6 (верхняя панель), IL-8 (средняя панель) и MCP-1/CCL2 (нижняя панель) в неконцентрированной бессывороточной культуральной среде от HCAEC и HITAEC, инкубированных с ФСБД (контроль; чёрный цвет), свободными ионами Ca<sup>2+</sup> (синий), КПМ-А (зелёный) и КПЧ-А (красный) (10 мкг кальция на 1 мл среды) в течение 24 ч (ИФА). Значения вероятности отклонить верную нулевую гипотезу (*p*) при межгрупповом сравнении указаны над графиками

Наконец, были исследованы *in vivo* эффекты различных форм кальциевого стресса после внутривенного введения CaCl<sub>2</sub>, КПМ-А и КПЧ-А крысам линии Вистар (10 мкг кальция на 1 мл крови). В отличие от результатов *in vitro*, все формы доставки кальция вызывали повышение содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крыс по результатам дот-блоттинга (22, 30 и 24 цитокина в случае инъекций Ca<sup>2+</sup>, КПМ-А и КПЧ-А соответственно; рис. 10 и табл. П3 Приложения). Среди обнаруженных молекул были GM-CSF, хемокины: CX3CL1 (фракталкин), MCP-1/CCL2, CXCL7, CCL11 (Эотаксин) и CCL17, серпин E1/PAI-1, матриксные металлопротеиназы (MMP-2, MMP-3), гепатокины: гепассоцин, фетуин-А, FGF-21 и GDF-15, белки



**Рис. 7.** Оценка уровней IL-6 (верхняя панель), IL-8 (средняя панель) и MCP-1/CCL2 (нижняя панель) в неконцентрированной бессывороточной культуральной среде от HCAEC и HITAEC, инкубированных с ФСБД (контроль; чёрный цвет), свободными ионами Ca<sup>2+</sup> (синий), КПМ-Ф (зелёный) и КПЧ-Ф (красный) (10 мкг кальция на 1 мл среды) в течение 24 ч (ИФА). Значения вероятности отклонить верную нулевую гипотезу (*p*) при межгрупповом сравнении указаны над графиками

с плейотропными эффектами: RAGE/AGER, адипонектин, фибулин-3, галектин-1 и галектин-3 (рис. 10 и табл. П3 Приложения). Уровни пролактина, GM-CSF, гепассоцина, CNTF, MMP-3, CX3CL1 (фракталкина), FGF-21, фибулина-3 и GDF-15 увеличивались после воздействия всех трёх видов кальциевого стресса (рис. 10 и табл. П3 Приложения). Однако уровни RAGE/AGER, фетуина-А, MCP-1/CCL2, MMP-9, CCL17 и галектина-3 повышались исключительно после инъекций КПМ-А и КПЧ-А, в то время как высвобождение HGF, CCL11 (этоксина) и галектина-1 стимулировалось только КПМ-А. Содержание PAI-1 увеличивалось исключительно при введении КПЧ-А (рис. 10 и табл. П3 Приложения). При этом экспрессия uPAR и MIP-3α/CCL20



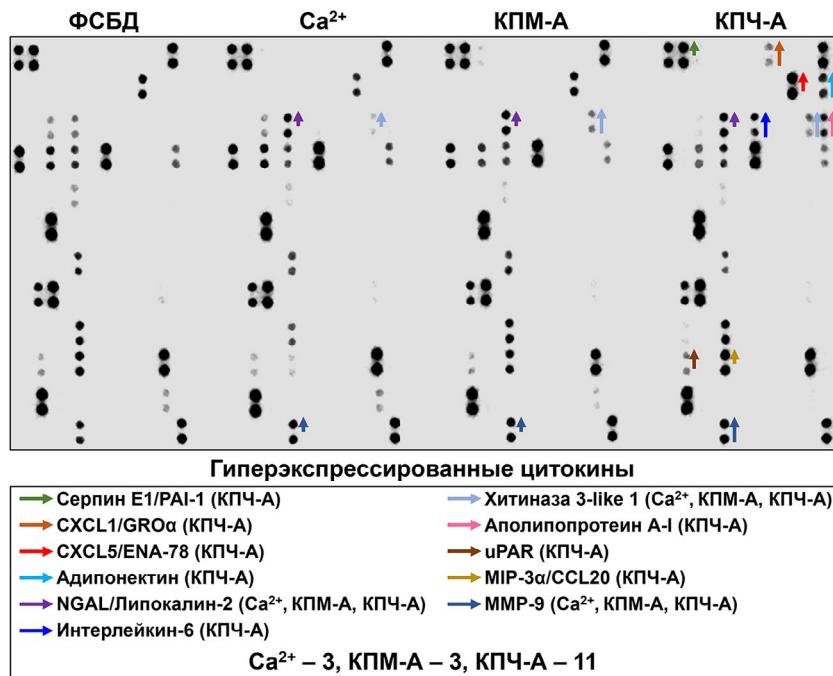
**Рис. 8.** Профилирование цитокинов в концентрированной (в 3 раза) бессывороточной культуральной среде от НСАЕС (верхняя панель) и НИТАЕС (нижняя панель), инкубированных с ФСБД (контроль), свободными ионами Ca<sup>2+</sup>, КПМ-А или КПЧ-А (10 мкг кальция на 1 мл культуральной среды) в течение 24 ч (дот-блоттинг). Зелёный цвет – серпин E1/PAI-1; светло-коричневый цвет – CXCL1/GROα; серый цвет – CD105/эндоглибин; тёмно-синий цвет – MCP-1/CCL2; красный цвет – IL-8; фиолетовый цвет – MIF; тёмно-коричневый цвет – uPAR; золотой цвет – MIP-3α/CCL20; светло-голубой цвет – CD147/EMMPRIN/басигин; лазурный цвет – ST2; розовый цвет – PDGF-AA; тёмно-зелёный цвет – RANTES/CCL5. Короткие, средние и длинные стрелки указывают на кратность изменения в 1,20–1,49, 1,50–1,99 и ≥ 2 раза соответственно по сравнению с контрольной группой (ФСБД). Количество гиперэкспрессированных цитокинов при воздействии Ca<sup>2+</sup>, КПМ-А или КПЧ-А указано внизу рисунка

повышалась во всех трёх типах клеток (НСАЕС, НИТАЕС и моноцитах), но не в сыворотке крыс. PAI-1 был единственной молекулой, содержание которой увеличивалось во всех образцах (среде от ЭК, моноцитов и в сыворотке крыс) после инкубации с КПЧ-А (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нарушения минерального гомеостаза (к примеру, патологическое снижение уровня альбуми-

на и/или патологическое увеличение содержания кальция или фосфора в сыворотке крови) являются независимым фактором риска болезней системы кровообращения [11]. Это состояние также характерно для хронической болезни почек, которая способствует развитию дисфункции эндотелия за счёт повышения концентраций мочевины и креатинина в сыворотке [53, 54]. Помимо этих биохимических триггеров, дисфункция эндотелия усугубляется интернализацией КПЧ ЭК сосудов [8–15] и синусоидальными ЭК печени [17, 18], что приводит к развитию хронического стериль-



**Рис. 9.** Профилирование цитокинов в концентрированной (в 7 раз) бессывороточной культуральной среде от человеческих моноцитов, инкубированных с ФСБД (контроль), свободными ионами Ca<sup>2+</sup>, КПМ-А и КПЧ-А (10 мкг кальция на 1 мл культуральной среды) в течение 24 ч (дот-блоттинг). Зелёный цвет – серпин E1/PAI-1; светло-коричневый цвет – CXCL1/GROα; красный цвет – CXCL5/ENA-78; светло-голубой цвет – адипонектин; фиолетовый цвет – NGAL/липокалин-2; тёмно-синий цвет – IL-6; небесно-голубой цвет – хитиназа 3-подобный белок 1; розовый цвет – аполипопротеин А-I; коричневый цвет – uPAR; золотой цвет – MIP-3α/CCL20; лазурный цвет – MMP-9. Короткие, средние и длинные стрелки указывают на кратность изменения в 1,20–1,49, 1,50–1,99 и ≥ 2,00 раз соответственно по сравнению с контрольной группой (ФСБД). Количество гиперэкспрессированных цитокинов при воздействии Ca<sup>2+</sup>, КПМ-А или КПЧ-А указано внизу рисунка

ного воспаления низкой интенсивности [13, 14]. Интернализация КПЧ ассоциирована с увеличением уровней провоспалительных цитокинов, нарушением баланса между вазоконстрикцией и вазодилатацией (включая снижение продукции NO) и эндотелиально-мезенхимальным переходом [55]. В частности, интернализация КПЧ ЭК и моноцитами запускает высвобождение индуцируемых эндотелиальных цитокинов (IL-6, IL-8, MCP-1/CCL2 и растворимой формы ICAM-1), а также цитокинов, выделяемых моноцитами (MIP-1α, MIP-3α, CINC-1, CINC-3 и CXCL10) [13]. Поскольку хроническое стерильное воспаление низкой интенсивности и дисфункция эндотелия взаимно усиливают друг друга [56–59], достаточно сложно объективно определить вклад, вносимый в развитие системного воспаления ЭК и моноцитами в результате воздействия КПЧ, а также специфическими цитокинами, которые они вырабатывают.

Согласно последним концепциям, КПМ нанометрового размера (~9–10 нм) служат «строительными блоками» для субмикронных (~30–100 нм) первичных КПЧ (или КПЧ-I), которые затем подвергаются агрегации и переходу из аморфной в кристаллическую форму, образуя микронные (100–300 нм) вторичные КПЧ (или КПЧ-II) [18,

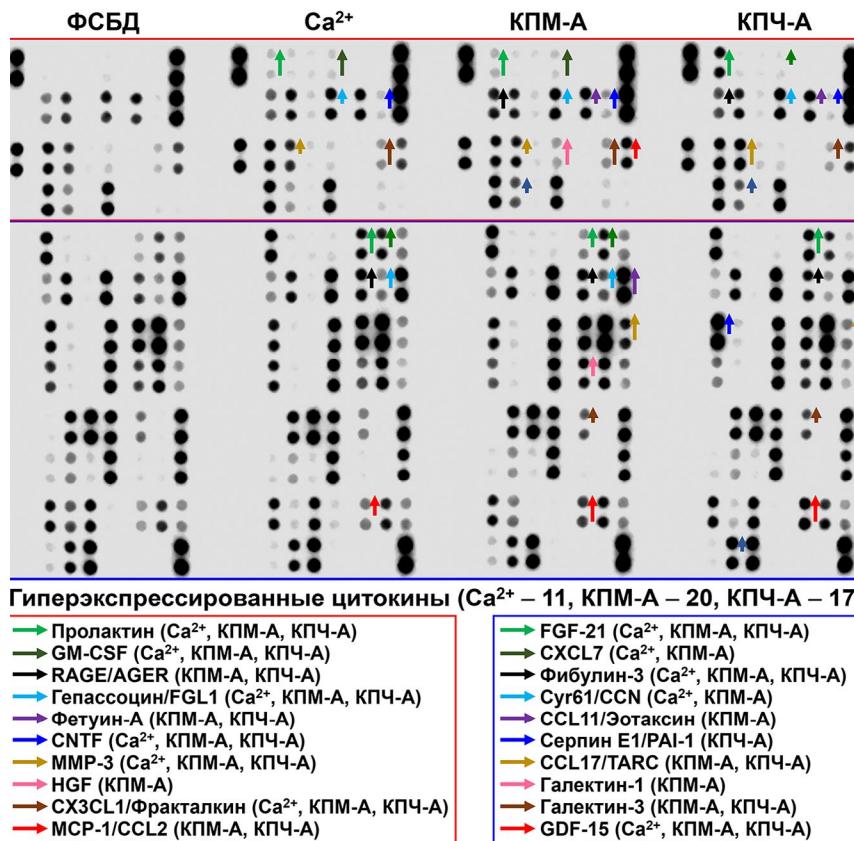
27, 60, 61]. Первичные КПЧ (изначально аморфные и сферические) созревают в веретенообразные или игольчатые кристаллические вторичные КПЧ [18, 27, 60, 61]. КПМ и первичные КПЧ состоят из аморфного фосфата кальция, тогда как вторичные КПЧ образованы карбонат-гидроксиапатитом (биоапатитом). КПЧ представляют собой сквениджеры кальция и фосфора, которые могут адсорбировать белки микроокружения (например, циркулирующие белки крови) [18, 27, 60, 61]. Кальций и фосфор взаимодействуют друг с другом в присутствии минерального шаперона фетуина-А и других кислых белков сыворотки, что приводит к образованию аморфного фосфата кальция (КПМ или первичных КПЧ) или карбонат-гидроксиапатита (вторичных КПЧ) [22, 62–64]. Высокие концентрации фосфора ингибируют продукцию оксида азота, что ухудшает вазодилатацию [65–67], индуцирует апоптоз ЭК [65, 67] и дозозависимо способствует системному воспалению за счёт запуска окислительного стресса и стимуляции экспрессии провоспалительных цитокинов [68]. Высокое содержание фосфатов считается независимым фактором дисфункции эндотелия и хронического стерильного воспаления низкой интенсивности [69–71].

**Таблица 3.** Специфические и общие цитокины с повышенным содержанием в культуральной среде (ЭК или моноциты) или сыворотке крыс после инкубации со свободными ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А и КПЧ-А (10 мкг кальция на 1 мл среды или крови) в течение 24 ч (для клеток) или 1 ч (для крыс) по сравнению с контролем (ФСБД)

Индуктор кальциевого стресса	<i>In vitro</i> (бессывороточная культуральная среда от HCAEC и HITAEC)	<i>In vitro</i> (бессывороточная культуральная среда от моноцитов)	<i>In vivo</i> (сыворотка крови крыс)
Свободные ионы $\text{Ca}^{2+}$ (вводимые с $\text{CaCl}_2$ )	CXCL1/GRO $\alpha$ , CD147/басигин, ST2, PDGF-AA, MIP-3 $\alpha$ /CCL20	NGAL, CHI3L1, MMP-9	пролактин, GM-CSF, гепассоцин, CNTF, MMP-3, фракталкин, FGF-21, CXCL7, фибулин-3, Cyr61/CCN, GDF-15
КПМ-А	MCP-1/CCL2, CXCL1/GRO $\alpha$ , MIF, uPAR, CD147/басигин, ST2	MMP-9, NGAL, CHI3L1	MCP-1/CCL2, MMP-9, пролактин, GM-CSF, RAGE/AGER, гепассоцин, фетуин-А, CNTF, MMP-3, HGF, фракталкин, FGF-21, CXCL7, фибулин-3, Cyr61/CCN, CCL11/эотаксин, CCL17/TARC, галектин-1, галектин-3, GDF-15
КПЧ-А	серпин E1/PAI-1, uPAR, CXCL1/GRO $\alpha$ , MIP-3 $\alpha$ /CCL20, MCP-1/CCL2, CD105/эндолгин, IL-8, MIF, CD147/басигин, ST2, RANTES/CCL5	серпин E1/PAI-1, uPAR, CXCL1/GRO $\alpha$ , MIP-3 $\alpha$ /CCL20, MMP-9, CXCL5/ENA-78, адипонектин, NGAL, IL-6, CHI3L1, аполипопротеин A-I	серпин E1/PAI-1, MCP-1/CCL2, MMP-9, пролактин, GM-CSF, RAGE/AGER, гепассоцин, фетуин-А, CNTF, MMP-3, фракталкин, FGF-21, фибулин-3, CCL17/TARC, галектин-3, GDF-15, Pref-1/DLK1/FA1
КПМ-А: повышение экспрессии в ЭК и в крысах	MCP-1/CCL2		
КПМ-А: повышение экспрессии в моноцитах и в крысах	MMP-9		
КПЧ-А: повышение экспрессии в ЭК и в моноцитах	uPAR, CXCL1/GRO $\alpha$ , MIP-3 $\alpha$ /CCL20		
КПЧ-А: повышение экспрессии в ЭК и в крысах	MCP-1/CCL2		
КПЧ-А: повышение экспрессии в моноцитах и в крысах	MMP-9		
КПЧ-А: повышение экспрессии в ЭК, моноцитах и крысах	серпин E1/PAI-1		

Хотя было показано, что исчерпание способности сыворотки связывать  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к осаждению КПЧ и что минеральный стресс влияет на развитие дисфункции эндотелия и системного воспаления, остаётся неясным, обусловлены ли последствия кальциевого стресса исключительно количеством кальция или также формой его доставки (свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ и КПЧ). Как правило, КПМ и КПЧ синтезируются искусственно

путём смешивания избыточных ионов кальция и фосфора с белками в буферном растворе. Ответ на вышеуказанный вопрос может быть получен при использовании целостного подхода (добавление сыворотки как источника белка) или редукционистского подхода (добавление какого-либо из основных белков сыворотки, например, альбумина или фетуина-А, в качестве источника белка). Целостный подход воспроизводит сценарий,



**Рис. 10.** Профилирование цитокинов в сыворотке крыс после внутривенного введения FCSBD (контроль), свободными ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А и КПЧ-А (10 мкг кальция на 1 мл крови) в течение 1 ч. Верхняя панель (красная рамка): зелёный цвет – пролактин; тёмно-зелёный – GM-CSF; чёрный цвет – RAGE/AGER; голубой цвет – гепассоцин/FGL-1; фиолетовый цвет – фетуин-А; тёмно-синий цвет – CNTF; золотой цвет – MMP-3; розовый цвет – HGF; коричневый цвет – CX3CL1/фракталкин; красный цвет – MCP-1/CCL2; лазурный цвет – MMP-9. Нижняя панель (синяя рамка): зелёный цвет – FGF-21; тёмно-зелёный цвет – CXCL7; чёрный цвет – фибулин-3; голубой цвет – Сир61/CCN1; фиолетовый цвет – CCL11/эотаксин; тёмно-синий цвет – серпин E1/PAI-1; золотой цвет – CCL17/TARC; розовый цвет – галектин-1; коричневый цвет – галектин-3; красный цвет – GDF-15; лазурный цвет – Pref-1/DLK1/FA1. Короткие, средние и длинные стрелки указывают на кратность изменения в 1,20–1,49, 1,50–1,99 и  $\geq 2,00$  раз соответственно по сравнению с группой FCSBD. Количество гиперэкспрессированных цитокинов при воздействии  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А или КПЧ-А указано внизу рисунка

происходящий в сыворотке человека, тогда как редукционистский подход позволяет проанализировать способность каждого белка сыворотки связывать минералы и исключить возможные отрицательные эффекты других компонентов сыворотки. Для более точного моделирования минерального стресса в данном исследовании был применён редукционистский подход для одновременного синтеза КПМ и КПЧ. В качестве источника белка для КПМ-А и КПЧ-А был выбран БСА, поскольку: (i) нижний quartиль содержания альбумина в сыворотке связан с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и коррелирует с повышенной склонностью сыворотки крови к преципитации КПЧ [11]; (ii) концентрация альбумина в сыворотке крови положительно коррелирует с концентрацией КПЧ (измеренной с помощью меченого бисфосфоната) и общим содержанием кальция [11]; (iii) альбумин является одним из двух основных скревенджер-

ров ионизированного кальция наряду с фетуином-А [7]; (iv) альбумин удобен в использовании, так как его выраженный жёлтый цвет облегчает визуальный контроль качества при проведении эксперимента. Кроме БСА, для синтеза КПМ-Ф и КПЧ-Ф также использовался БСФ, поскольку именно фетуин-А является основным минеральным шапероном, поддерживающим образование КПМ и КПЧ в организме человека [1–4].

При смешивании физиологических концентраций БСА с супрафизиологическими концентрациями кальция и фосфата соотношение (%) между ионизированным, связанным с белками (КПМ) и связанным с фосфатом (КПЧ) кальцием составило 50 : 20 : 30 соответственно. Это подтвердило физиологическую значимость разработанной модели минерального стресса (так как соотношение ионизированного и связанного кальция составило 1 : 1) и продемонстрировало, что циркулирующие минеральные депо – КПМ и КПЧ – способны

сохранять свою функцию связывания кальция на физиологическом уровне даже при выраженному минеральном стрессе. В условиях минерального стресса количество кальция в КПЧ превышало таковое в КПМ, что подчёркивает основную роль КПЧ как скревенджеров минералов, регулирующих уровень ионизированного кальция в крови человека. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными о соотношении кальция в КПЧ и КПМ (1 : 1) [18, 72]. Они предполагают, что КПЧ являются конечным буфером, который агрегирует избыточные ионы кальция и фосфора, предотвращая перенасыщение крови ионизированным кальцием при исчерпании других минеральных буферов. Относительно низкая доля альбумина, связанного с КПЧ (~15%) даже при супрафизиологических условиях минерального стресса, указывает на то, что формирование КПЧ, вероятно, не влияет на функции альбумина в живом организме.

Для сравнения эффектов различных форм доставки кальция ( $\text{CaCl}_2$  как донор ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А/КПМ-Ф и КПЧ-А/КПЧ-Ф) были выбраны ЭК и моноциты, поскольку они являются первыми клеточными популяциями, взаимодействующими с КПЧ в организме человека. В данном исследовании мы определили и использовали физиологическую дозу кальция (10 мкг/мл), поскольку данный параметр в организме строго регулируется для предотвращения аритмии и внеклеточной кальцификации [73–75]. Эта доза вызывала 10%-ное увеличение концентрации ионизированного кальция, что соответствовало межквартальному интервалу ионизированного кальция крови в популяции (от 0,10 до 0,14 ммоль/л, т.е. от 4,0 до 5,6 мкг/мл) [11]. Интернализация КПЧ является обязательным предварительным условием их патологического воздействия [8–19]. Было показано, что КПМ интернализуются ЭК в условиях потока аналогично КПЧ [10, 13]. В соответствии с нашими предыдущими данными [9–15], инкубация артериальных ЭК с КПЧ-А усиливала экспрессию генов, кодирующих провоспалительные молекулы клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1* и *SELE*) и провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2* и *CXCL1*). Инкубация артериальных ЭК с КПЧ-Ф стимулировала экспрессию генов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*, *IL6*, *MIF* и *CXCL1*. Подобное репрограммирование характерно для дисфункциональных ЭК [55, 76, 77] и указывает на развитие хронического стерильного воспаления низкой интенсивности [56–59] и ассоциированного со старением секреторного фенотипа [78–80].

Инкубация ЭК и моноцитов с КПЧ-А или КПЧ-Ф (10 мкг кальция на 1 мл культуральной среды) усилила выделение провоспалительных цитокинов. Среди молекул, повышенная экспрессия

которых наблюдалась в артериальных ЭК и моноцитах после воздействия КПЧ-А, были цитокины и хемокины (*IL-6*, *IL-8*, *MCP-1/CCL2*, *CXCL1/GROα*, *MIP-3α/CCL20*), а также про- и антитромботические молекулы (*PAI-1* и *uPAR*). Из них *uPAR*, *MIP-3α/CCL20* и *PAI-1* увеличивались в НСАЕС, НИАЕС и моноцитах. В обобщение результатов экспериментов *in vitro*, воздействие КПЧ вызывало провоспалительный ответ, характеризующийся активацией выделения цитокинов и соответствующими изменениями экспрессии генов. Хотя  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А и КПМ-Ф также стимулировали выработку нескольких цитокинов ЭК, данный ответ был менее выраженным, что свидетельствовало об ограниченных патогенных эффектах этих форм кальция.

Профильтрование цитокинов с помощью ИФА выявило статистически значимое увеличение продукции *IL-6*, *IL-8* и *MCP-1/CCL2* в НСАЕС и НИАЕС после их инкубации с КПЧ-А. Тем не менее дот-блот-профильтрование показало увеличение содержания *IL-8* и *MCP-1/CCL2* исключительно в НСАЕС; *IL-6* не был обнаружен в культуральной среде даже после её трёхкратной концентрации. Наиболее вероятной причиной этого несоответствия является ограниченная чувствительность полуколичественного хемилюминесцентного дот-блоттинга, так как уровни *IL-6* не превышали 175 пг/мл (по сравнению с 250–500 пг/мл для *IL-8* и 2500–6000 пг/мл для *MCP-1/CCL2*). Это предположение частично подтверждается нашими предыдущими данными [13], согласно которым концентрация *IL-6* после 24-часового культивирования ЭК, инкубированных с КПЧ, достигала 300–450 пг/мл и могла быть обнаружена с помощью дот-блоттинга.

Предыдущие исследования последовательно демонстрировали цитотоксические и провоспалительные эффекты КПЧ, преимущественно опосредованные инфламмасомой NLRP3. Эти эффекты обусловлены кальциевым и осмотическим стрессом, который возникает в результате резкого увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле после растворения кальция в лизосомах [11, 81, 82]. Бафиломицин A1, специфический ингибитор вакуолярной  $\text{H}^+$ -АТРазы (V-АТРазы), предотвращал лизосомально-опосредованную гибель ЭК [11] и сосудистых гладкомышечных клеток [81], вызванную КПЧ, путём предотвращения ацидификации лизосом и растворения КПЧ. Аналогичные цитопротекторные эффекты наблюдались при использовании ингибиторов кальций-чувствительного рецептора, NLRP3 или каспазы-1 в условиях кальциевого стресса [82]. Фармакологическое ингибирование ключевой лизосомальной протеазы катепсина В также уменьшало выделение *IL-1β* макрофагами при воздействии КПЧ [25, 82].

Протеомное профилирование выявило увеличение экспрессии белков, связанных с лизосомами (особенно белков лизосомальной мембраны) в артериальных ЭК [13]. Молекулярные процессы, связанные с лизосомальным растворением кальция (ацидификация вакуолей, регуляция pH, регуляция протеолиза, увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле и проницаемость наружной мембранны митохондрий), также были усилены в НСАЕС и НИАЕС, инкубированных с КПЧ [13]. Протеомное профилирование позволило предположить, что лизосомальный ответ на интернализацию КПЧ включает использование уже существующего белкового аппарата, а не регуляцию на транскрипционном, посттранскрипционном и трансляционном уровнях [15]. Хотя некоторые исследования сообщали об алкализации лизосом и снижении активности гидролаз при растворении КПЧ из-за избытка  $\text{Ca}^{2+}$  [26, 28], в данном исследовании КПЧ-А и КПЧ-Ф были обнаружены в лизосомах ЭК с использованием стандартного pH-сенсора (LysoTracker Red). Обобщённые данные о лизосомоспецифическом распределении и цитотоксических и проапоптотических эффектах КПЧ-А и КПЧ-Ф позволяют предположить, что их патогенный профиль схож с таковым у КПЧ, выделенных из атеросклеротических бляшек и сыворотки [8], а также с КПЧ-П и КПЧ-С (кристаллические вторичные КПЧ) [9–13, 15].

Внутривенное введение  $\text{Ca}^{2+}$ , КПМ-А или КПЧ-А крысам линии Wistar, не имеющим других факторов сердечно-сосудистого риска, также вызывало системный воспалительный ответ, преимущественно опосредованный хемокинами (MCP-1/CCL2, CX3CL1, CXCL7, CCL11 и CCL17), гепатокинами (гепассоцин, фетуин-А, FGF-21 и GDF-15), протеазами (MMP-2 и MMP-3) и ингибиторами протеаз (PAI-1). Наши данные *in vitro* и *in vivo* подтверждают выраженный провоспалительный эффект КПЧ. Для данного исследования на основании результатов предыдущих работ был выбран 1-часовой временной интервал [13], учитывая быстрое выведение избытка кальция из крови через его связывание кислыми белками сыворотки, удаление КПМ почками и переработку КПЧ в печени [5]. Концентрация ионизированного кальция является одним из наиболее строго регулируемых биохимических параметров крови человека (аналогичным pH); стабильная гиперкальциемия встречается относительно редко, а даже кратковременная гиперкальциемия может привести к аритмии [83–86]. Модель транзиторной гиперкальциемии, состояния, которое часто встречается у пациентов с гиперпаратиреозом или избыточным приёмом витамина D, является весьма актуальной [83–86]. Патологические эффекты кальциевого стресса, наблюдаемые через 1 ч

после внутривенного введения  $\text{CaCl}_2$ , КПМ или КПЧ крысам линии Wistar, были связаны с хроническим стерильным воспалением низкой интенсивности, определяемым как умеренное увеличение уровней цитокинов в кровотоке. Таким образом, кальциевый стресс способен приводить к провоспалительному состоянию, которое само по себе может поддерживать активацию эндотелия. Если такое состояние остаётся неконтролируемым (например, у пожилых пациентов с более чем одним сопутствующим заболеванием, таким как диабет или хроническая болезнь почек), такие временные повышения провоспалительных цитокинов могут способствовать синдрому старческой астении, при котором биологический возраст превышает хронологический [56–59].

Наши результаты согласуются с данными, полученными группой W. Jähnen-Dechent, которые показали отсутствие токсичности или провоспалительных эффектов у КПМ после их интернализации синусоидальными ЭК печени и эпителиальными клетками проксимальных каналцев, в отличие от КПЧ, которые проявляли значительные цитотоксические эффекты и вызывали быструю активацию инфламмасомы NLRP3 уже через 2 ч после добавления КПЧ [18]. Объединённый анализ результатов *in vitro* и *in vivo* показал, что PAI-1 был единственной молекулой, уровень которой стабильно повышался в ЭК, моноцитах и сыворотке крыс после инкубации с КПЧ-А. Причины такого устойчивого повышения уровня PAI-1 могут включать его относительно высокую экспрессию (что позволяет фиксировать увеличение его выделения методом дот-блоттинга) и кальций-зависимую регуляцию. Другие цитокины, концентрация которых была повышена в культуральной среде от клеток, инкубированных с КПЧ-А/КПЧ-Ф, или в сыворотке крыс, которым внутривенно вводили КПЧ-А/КПЧ-Ф (uPAR, CXCL1/GROα, MIP-3α/CCL20, MCP-1/CCL2 и MMP-9), демонстрировали менее стабильную экспрессию в разных экспериментальных моделях. Например, uPAR и CXCL1/GROα характеризовались умеренным сигналом в культуральной среде от ЭК и моноцитов, тогда как MIP-3α/CCL20 и MMP-9 были высокоэкспрессированы в культуральной среде от моноцитов, но не ЭК. Подобно PAI-1, MCP-1/CCL2 показывал относительно высокую экспрессию во всех моделях, но не был повышен в культуральной среде от моноцитов. PAI-1 продуцируется [87, 88] и его активность поддерживается [89] кальций- зависимым образом, что предполагает наличие механизма, обеспечивающего активацию его выделения после инкубации с КПЧ-А или КПЧ-Ф. К сожалению, предыдущие исследования не изучали продукцию PAI-1 различными клеточными популяциями после воздействия КПЧ.

Последующие исследования могут быть сосредоточены на изучении эффектов КПМ и КПЧ, учитывая высокое сродство фетуина-А к кальцию и уникальную функцию этого белка как минерального шаперона, регулирующего формирование КПЧ, хотя средний уровень фетуина-А в сыворотке (1 г/л) значительно ниже, чем у альбумина (34 г/л) [90–93]. Перспективным направлением является исследование комбинированных эффектов  $\text{Ca}^{2+}$  и КПМ или КПЧ, поскольку кальций-чувствительный рецептор способствует интернализации КПЧ [39], что может усиливать их патогенные эффекты. Другой задачей является определение иерархии способности кислых белков сыворотки (например, таких как альбумин, фетуин-А, остеонектин, остеопротегерин, остеопонтин, матриксный Gla-белок, Gla-богатый белок, альфа-1-кислый гликопротеин, трансферрин, гаптоглобин, фибриноген, церулоплазмин, альфа-2-макроглобулин, иммуноглобулин А, фибронектин и антитромбин III) связывать минералы. С диагностической точки зрения дифференциальное обнаружение КПМ и КПЧ может быть выполнено с использованием проточной цитометрии с флюоресцентно меченным бисфосфонатом (например, IVISense Osteo 680) и искусственно синтезированных КПМ и КПЧ. Измерение концентраций КПМ и КПЧ в сыворотке крови здоровых людей и при различных заболеваниях может помочь лучше понять патофизиологическую значимость этих параметров.

Полученные результаты позволяют предположить, что негативные эффекты кальциевого стресса определяются формой доставки кальция, а не только его количеством. Это может свидетельствовать о необходимости пересмотра подходов к количественной оценке КПЧ, хотя альтернативные методы (флюоресцентное мечение в сочетании с проточной цитометрией, турбидиметрия, нефелометрия, динамическое рассеяние света и сканирующая электронная микроскопия) менее стандартизированы, и их применение для количественной оценки КПЧ *in vitro* является предметом широкого обсуждения. Динамическое рассеяние света и сканирующая электронная микроскопия занимают достаточно много времени, в то время как результаты турбидиметрии зависят от распределения размеров частиц. Последующие исследования в этом направлении, вероятно, будут сфокусированы на разработке новых методов количественной оценки КПЧ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы установили, что физиологическое увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (на 10%, что эквива-

лентно межквартильному интервалу в популяции) достигается добавлением 10 мкг кальция на 1 мл бессывороточной культуральной среды или сыворотки крыс. Инкубация ЭК и моноцитов с таким количеством КПЧ-А или КПЧ-Ф инициировала их провоспалительную активацию, проявляющуюся в виде транскрипционного репрограммирования и увеличенного выделения цитокинов, продуцируемых эндотелием (IL-6, IL-8, MCP-1/CCL2, uPAR, MIP-3 $\alpha$ /CCL20, PAI-1) и моноцитами (IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ /1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ /CCL20, uPAR, PAI-1, CXCL1, CXCL5). Добавление свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и КПМ-А вызывало ограниченные отрицательные эффекты в ЭК и моноцитах, хотя КПМ интернализировались ЭК в условиях потока аналогично КПЧ. Все формы доставки кальция (свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , коллоидные КПМ-А и корпскулярные КПЧ-А) вызывали системный воспалительный ответ у крыс линии Wistar ( $\text{Ca}^{2+}$ : 22 цитокина, КПМ-А: 30 цитокинов, КПЧ-А: 24 цитокина). PAI-1 был единственной молекулой, уровень которой стабильно повышался и в ЭК, и в моноцитах, и в сыворотке крыс после инкубации с КПЧ-А. Повышение выделения хемокинов (CX3CL1, MCP-1/CCL2, CXCL7, CCL11, CCL17) и гепатокинов (гепассоцин, фетуин-А, FGF-21, GDF-15) после воздействия КПЧ свидетельствует об их роли в развитии хронического стерильного воспаления низкой интенсивности.

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

**Вклад авторов.** Д.Ш. и А.К. разработали дизайн исследования и осуществили валидацию данных; Д.Ш., Виктория М., Ю.М., М.С., А.С., Вера М., Е.Т., А.Л. и А.С. разработали методологию исследования, провели эксперименты и проанализировали данные; А.К. провёл анализ и валидацию данных, получил финансирование, осуществлял общее руководство проектом, подготовил рисунки, написал и отредактировал текст статьи. Все авторы ознакомлены и согласны с опубликованной версией статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00107 «Патологические последствия и молекулярные механизмы воздействия кальций-fosfatных бионов (кальципротеиновых частиц) на форменные элементы крови», <https://rscf.ru/project/22-15-00107/>.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все протоколы экспериментов на животных были одобрены Локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (код протокола:

042/2023; дата одобрения: 4 апреля 2023 г.). Все эксперименты на животных проводились в соответствии с Европейской конвенцией о защите позво-

ночных животных (Страсбург, 1986) и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heiss, A., Pipich, V., Jahnens-Decent, W., and Schwahn, D. (2010) Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition, *Biophys. J.*, **99**, 3986-3995, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.030>.
2. Jahnens-Decent, W., Heiss, A., Schäfer, C., and Ketteler, M. (2011) Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism, *Circ. Res.*, **108**, 1494-1509, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.234260>.
3. Jahnens-Decent, W., Büscher, A., Köppert, S., Heiss, A., Kuro-O, M., and Smith, E. R. (2020) Mud in the blood: the role of protein-mineral complexes and extracellular vesicles in biominerallisation and calcification, *J. Struct. Biol.*, **212**, 107577, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107577>.
4. Smith, E. R., Hewitson, T. D., and Jahnens-Decent, W. (2020) Calciprotein particles: mineral behaving badly? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **29**, 378-386, <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000609>.
5. Kutikhin, A. G., Feenstra, L., Kostyunin, A. E., Yuzhalin, A. E., Hillebrands, J. L., and Krenning, G. (2021) Calciprotein particles: balancing mineral homeostasis and vascular pathology, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **41**, 1607-1624, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.31569>.
6. Jahnens-Decent, W., and Pasch, A. (2023) Solving the insoluble: calciprotein particles mediate bulk mineral transport, *Kidney Int.*, **103**, 663-665, <https://doi.org/10.1016/j.kint.2023.01.011>.
7. Bäck, M., Aranyi, T., Cancela, M. L., Carracedo, M., Conceição, N., Leftheriotis, G., Macrae, V., Martin, L., Nitschke, Y., Pasch, A., Quaglino, D., Rutsch, F., Shanahan, C., Sorribas, V., Szeri, F., Valdivielso, P., Vanakker, O., and Kempf, H. (2019) Endogenous calcification inhibitors in the prevention of vascular calcification: a consensus statement from the COST Action EuroSoftCalcNet, *Front. Cardiovasc. Med.*, **5**, 196, <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00196>.
8. Kutikhin, A. G., Velikanova, E. A., Mukhamadiyarov, R. A., Glushkova, T. V., Borisov, V. V., Matveeva, V. G., Antonova, L. V., Filip'ev, D. E., Golovkin, A. S., Shishkova, D. K., Burago, A. Y., Frolov, A. V., Dolgov, V. Y., Efimova, O. S., Popova, A. N., Malysheva, V. Y., Vladimirov, A. A., Sozinov, S. A., Ismagilov, Z. R., Russakov, D. M., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V., Gutakovskiy, A. K., Zhivodkov, Y. A., Demidov, E. A., Peltek, S. E., Dolganyuk, V. F., Babich, O. O., Grigoriev, E. V., Brusina, E. B., Barbarash, O. L., and Yuzhalin, A. E. (2016) Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions, *Sci. Rep.*, **6**, 27255, <https://doi.org/10.1038/srep27255>.
9. Shishkova, D., Velikanova, E., Sinitsky, M., Tsepokina, A., Gruzdeva, O., Bogdanov, L., and Kutikhin, A. (2019) Calcium phosphate bions cause intimal hyperplasia in intact aortas of normolipidemic rats through endothelial injury, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5728, <https://doi.org/10.3390/ijms20225728>.
10. Shishkova, D., Markova, V., Sinitsky, M., Tsepokina, A., Velikanova, E., Bogdanov, L., Glushkova, T., and Kutikhin, A. (2020) Calciprotein particles cause endothelial dysfunction under flow, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8802, <https://doi.org/10.3390/ijms21228802>.
11. Shishkova, D. K., Velikanova, E. A., Bogdanov, L. A., Sinitsky, M. Y., Kostyunin, A. E., Tsepokina, A. V., Gruzdeva, O. V., Mironov, A. V., Mukhamadiyarov, R. A., Glushkova, T. V., Krivkina, E. O., Matveeva, V. G., Hryachkova, O. N., Markova, V. E., Dyleva, Y. A., Belik, E. V., Frolov, A. V., Shabaev, A. R., Efimova, O. S., Popova, A. N., Malysheva, V. Y., Kolmykov, R. P., Sevostyanov, O. G., Russakov, D. M., Dolganyuk, V. F., Gutakovskiy, A. K., Zhivodkov, Y. A., Kozhukhov, A. S., Brusina, E. B., Ismagilov, Z. R., Barbarash, O. L., Yuzhalin, A. E., and Kutikhin, A. G. (2021) Calciprotein particles link disturbed mineral homeostasis with cardiovascular disease by causing endothelial dysfunction and vascular inflammation, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12458, <https://doi.org/10.3390/ijms222212458>.
12. Bogdanov, L., Shishkova, D., Mukhamadiyarov, R., Velikanova, E., Tsepokina, A., Terekhov, A., Koshelev, V., Kanonykina, A., Shabaev, A., Frolov, A., Zagorodnikov, N., and Kutikhin, A. (2022) Excessive adventitial and perivascular vascularisation correlates with vascular inflammation and intimal hyperplasia, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12156, <https://doi.org/10.3390/ijms232012156>.
13. Shishkova, D., Lobov, A., Zainullina, B., Matveeva, V., Markova, V., Sinitskaya, A., Velikanova, E., Sinitsky, M., Kanonykina, A., Dyleva, Y., and Kutikhin, A. (2022) Calciprotein particles cause physiologically significant pro-inflammatory response in endothelial cells and systemic circulation, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 14941, <https://doi.org/10.3390/ijms232314941>.
14. Feenstra, L., Kutikhin, A. G., Shishkova, D. K., Buikema, H., Zeper, L. W., Bourgonje, A. R., Krenning, G., and Hillebrands, J. L. (2023) Calciprotein particles induce endothelial dysfunction by impairing endothelial nitric oxide metabolism, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **43**, 443-455, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318420>.

15. Shishkova, D., Lobov, A., Repkin, E., Markova, V., Markova, Y., Sinitskaya, A., Sinitsky, M., Kondratiev, E., Torgunakova, E., and Kutikhin, A. (2023) Calciprotein particles induce cellular compartment-specific proteome alterations in human arterial endothelial cells, *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, **11**, 5, <https://doi.org/10.3390/jcdd11010005>.
16. Herrmann, M., Schäfer, C., Heiss, A., Gräber, S., Kinkeldey, A., Büscher, A., Schmitt, M. M., Bornemann, J., Nimmerjahn, F., Herrmann, M., Helming, L., Gordon, S., and Jähnen-Dechent, W. (2012) Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A, *Circ. Res.*, **111**, 575-584, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.261479>.
17. Köppert, S., Büscher, A., Babler, A., Ghallab, A., Buhl, E. M., Latz, E., Hengstler, J. G., Smith, E. R., and Jähnen-Dechent, W. (2018) Cellular clearance and biological activity of calciprotein particles depend on their maturation state and crystallinity, *Front. Immunol.*, **9**, 1991, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01991>.
18. Koeppert, S., Ghallab, A., Peglow, S., Winkler, C. F., Graeber, S., Büscher, A., Hengstler, J. G., and Jähnen-Dechent, W. (2021) Live imaging of calciprotein particle clearance and receptor mediated uptake: role of calciprotein monomers, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 633925, <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.633925>.
19. Zeper, L. W., Bos, C., Leermakers, P. A., Franssen, G. M., Raavé, R., Hoenderop, J. G. J., and de Baaij, J. H. F. (2024) Liver and spleen predominantly mediate calciprotein particle clearance in a rat model of chronic kidney disease, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **326**, F622-F634, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00239.2023>.
20. Hutcheson, J. D., and Goetsch, C. (2023) Cardiovascular calcification heterogeneity in chronic kidney disease, *Circ. Res.*, **132**, 993-1012, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.321760>.
21. Sutton, N. R., Malhotra, R., St Hilaire, C., Aikawa, E., Blumenthal, R. S., Gackenbach, G., Goyal, P., Johnson, A., Nigwekar, S. U., Shanahan, C. M., Towler, D. A., Wolford, B. N., and Chen, Y. (2023) Molecular mechanisms of vascular health: insights from vascular aging and calcification, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **43**, 15-29, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.317332>.
22. Turner, M. E., Beck, L., Hill Gallant, K. M., Chen, Y., Moe, O. W., Kuro-O, M., Moe, S. M., and Aikawa, E. (2024) Phosphate in cardiovascular disease: from new insights into molecular mechanisms to clinical implications, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **44**, 584-602, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.319198>.
23. Smith, E. R., Hanssen, E., McMahon, L. P., and Holt, S. G. (2013) Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage, *PLoS One*, **8**, e60904, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060904>.
24. Peng, H. H., Wu, C. Y., Young, D., Martel, J., Young, A., Ojcius, D. M., Lee, Y. H., and Young, J. D. (2013) Physicochemical and biological properties of biomimetic mineralo-protein nanoparticles formed spontaneously in biological fluids, *Small*, **9**, 2297-2307, <https://doi.org/10.1002/smll.201202270>.
25. Anzai, F., Karasawa, T., Komada, T., Yamada, N., Miura, Y., Sampilvanjil, A., Baatarjav, C., Fujimura, K., Matsumura, T., Tago, K., Kurosu, H., Takeishi, Y., Kuro-O, M., and Takahashi, M. (2021) Calciprotein particles induce IL-1 $\beta$ /α-mediated inflammation through NLRP3 inflammasome-dependent and -independent mechanisms, *Immunohorizons*, **5**, 602-614, <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.2100066>.
26. Murthy, S., Karkossa, I., Schmidt, C., Hoffmann, A., Hagemann, T., Rothe, K., Seifert, O., Anderegg, U., von Bergen, M., Schubert, K., and Rossol, M. (2022) Danger signal extracellular calcium initiates differentiation of monocytes into SPP1/osteopontin-producing macrophages, *Cell Death Dis.*, **13**, 53, <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04507-3>.
27. Tiong, M. K., Smith, E. R., Toussaint, N. D., Al-Khayyat, H. F., and Holt, S. G. (2021) Reduction of calciprotein particles in adults receiving infliximab for chronic inflammatory disease, *JBMR Plus*, **5**, e10497, <https://doi.org/10.1002/jbmr.4.10497>.
28. Kunishige, R., Mizoguchi, M., Tsubouchi, A., Hanaoka, K., Miura, Y., Kurosu, H., Urano, Y., Kuro-O, M., and Murata, M. (2020) Calciprotein particle-induced cytotoxicity via lysosomal dysfunction and altered cholesterol distribution in renal epithelial HK-2 cells, *Sci. Rep.*, **10**, 20125, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77308-3>.
29. Kobylecki, C. J., Nordestgaard, B. G., and Afzal, S. (2021) Plasma ionized calcium and risk of cardiovascular disease: 106,774 individuals from the Copenhagen General Population Study, *Clin. Chem.*, **67**, 265-275, <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa245>.
30. Kobylecki, C. J., Nordestgaard, B. G., and Afzal, S. (2022) Low plasma ionized calcium is associated with increased mortality: a population-based study of 106,768 individuals, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **107**, e3039-e3047, <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac146>.
31. Gimbrone, M. A., Jr., and García-Cardeña, G. (2016) Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis, *Circ. Res.*, **118**, 620-636, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>.
32. Mundi, S., Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M. A., van Hinsbergh, V. W. M., Iruela-Arispe, M. L., and De Caterina, R. (2018) Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors – a review, *Cardiovasc. Res.*, **114**, 35-52, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx226>.
33. Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgozoglu, L., and Lewis, E. F. (2019) Atherosclerosis, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **5**, 56, <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>.

34. Tamargo, I. A., Baek, K. I., Kim, Y., Park, C., and Jo, H. (2023) Flow-induced reprogramming of endothelial cells in atherosclerosis, *Nat. Rev. Cardiol.*, **20**, 738-753, <https://doi.org/10.1038/s41569-023-00883-1>.
35. Wang, X., Shen, Y., Shang, M., Liu, X., and Munn, L. L. (2023) Endothelial mechanobiology in atherosclerosis, *Cardiovasc. Res.*, **119**, 1656-1675, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvad076>.
36. Giorgi, C., Marchi, S., and Pinton, P. (2018) The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 713-730, <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>.
37. Walkon, L. L., Strubbe-Rivera, J. O., and Bazil, J. N. (2022) Calcium overload and mitochondrial metabolism, *Biomolecules*, **12**, 1891, <https://doi.org/10.3390/biom12121891>.
38. De Nicolo, B., Cataldi-Stagetti, E., Diquigiovanni, C., and Bonora, E. (2023) Calcium and reactive oxygen species signaling interplays in cardiac physiology and pathologies, *Antioxidants (Basel)*, **12**, 353, <https://doi.org/10.3390/antiox12020353>.
39. Werner, L. E., and Wagner, U. (2023) Calcium-sensing receptor-mediated NLRP3 inflammasome activation in rheumatoid arthritis and autoinflammation, *Front. Physiol.*, **13**, 1078569, <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1078569>.
40. Mukai, H., Miura, Y., Kotani, K., Kotoda, A., Kurosu, H., Yamada, T., Kuro-O, M., and Iwazu, Y. (2022) The effects for inflammatory responses by CPP with different colloidal properties in hemodialysis patients, *Sci. Rep.*, **12**, 21856, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26166-2>.
41. Bojic, M., Cejka, D., Bielez, B., and Schernthaner, G. H. (2023) Secondary calciprotein particle size is associated with patient mortality in peripheral artery disease, *Atherosclerosis*, **370**, 12-17, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2023.02.006>.
42. Chen, W., Anokhina, V., Dieudonne, G., Abramowitz, M. K., Kashyap, R., Yan, C., Wu, T. T., de Mesy Bentley, K. L., Miller, B. L., and Bushinsky, D. A. (2019) Patients with advanced chronic kidney disease and vascular calcification have a large hydrodynamic radius of secondary calciprotein particles, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **34**, 992-1000, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy117>.
43. Chen, W., Fitzpatrick, J., Monroy-Trujillo, J. M., Sozio, S. M., Jaar, B. G., Estrella, M. M., Serrano, J., Anokhina, V., Miller, B. L., Melamed, M. L., Bushinsky, D. A., and Parekh, R. S. (2021) Associations of serum calciprotein particle size and transformation time with arterial calcification, arterial stiffness, and mortality in incident hemodialysis patients, *Am. J. Kidney Dis.*, **77**, 346-354, <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.05.031>.
44. Feenstra, L., Reijrink, M., Pasch, A., Smith, E. R., Visser, L. M., Bulthuis, M., Lodewijk, M. E., Mastik, M. F., Greuter, M. J. W., Slart, R. H. J. A., Mulder, D. J., Pol, R. A., Te Velde-Keyzer, C. A., Krenning, G., Hillebrands, J. L., and TransplantLines Investigators (2024) Calciprotein particle counts associate with vascular remodelling in chronic kidney disease, *Cardiovasc. Res.*, **120**, 1953-1966, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvae164>.
45. Zeper, L. W., Smith, E. R., Ter Braake, A. D., Tinnemans, P. T., de Baaij, J. H. F., and Hoenderop, J. G. J. (2023) Calciprotein particle synthesis strategy determines in vitro calcification potential, *Calcif. Tissue Int.*, **112**, 103-117, <https://doi.org/10.1007/s00223-022-01036-1>.
46. Mencke, R., Al Ali, L., de Koning, M. L. Y., Pasch, A., Minnion, M., Feelisch, M., van Veldhuisen, D. J., van der Horst, I. C. C., Gansevoort, R. T., Bakker, S. J. L., de Borst, M. H., van Goor, H., van der Harst, P., Lipsic, E., and Hillebrands, J. L. (2024) Serum calcification propensity is increased in myocardial infarction and hints at a pathophysiological role independent of classical cardiovascular risk factors, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **44**, 1884-1894, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.124.320974>.
47. Mori, K., Shoji, T., Nakatani, S., Uedono, H., Ochi, A., Yoshida, H., Imanishi, Y., Morioka, T., Tsujimoto, Y., Kuro-O, M., and Emoto, M. (2024) Differential associations of fetuin-A and calcification propensity with cardiovascular events and subsequent mortality in patients undergoing hemodialysis, *Clin. Kidney J.*, **17**, sfae042, <https://doi.org/10.1093/ckj/sfae042>.
48. Van der Vaart, A., Eelderink, C., van Goor, H., Hillebrands, J. L., Te Velde-Keyzer, C. A., Bakker, S. J. L., Pasch, A., van Dijk, P. R., Laverman, G. D., and de Borst, M. H. (2024) Serum T50 predicts cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: a prospective cohort study, *J. Intern. Med.*, **295**, 748-758, <https://doi.org/10.1111/joim.13781>.
49. Miura, M., Miura, Y., Iwazu, Y., Mukai, H., Sugiura, T., Suzuki, Y., Kato, M., Kano, M., Nagata, D., Shiizaki, K., Kurosu, H., and Kuro-O, M. (2023) Removal of calciprotein particles from the blood using an adsorption column improves prognosis of hemodialysis miniature pigs, *Sci. Rep.*, **13**, 15026, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42273-0>.
50. Kawakami, K., Ohya, M., Yashiro, M., Sonou, T., Yamamoto, S., Nakashima, Y., Yano, T., Tanaka, Y., Ishida, K., Kobashi, S., Shigematsu, T., and Araki, S. I. (2023) Bisphosphonate FYB-931 prevents high phosphate-induced vascular calcification in rat aortic rings by altering the dynamics of the transformation of calciprotein particles, *Calcif. Tissue Int.*, **113**, 216-228, <https://doi.org/10.1007/s00223-023-01086-z>.
51. Rossi, A., Pizzo, P., and Filadi, R. (2019) Calcium, mitochondria and cell metabolism: a functional triangle in bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1866**, 1068-1078, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>.

52. Park, C. J., and Shin, R. (2022) Calcium channels and transporters: roles in response to biotic and abiotic stresses, *Front. Plant Sci.*, **13**, 964059, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.964059>.
53. Harlacher, E., Wollenhaupt, J., Baaten, C. C. F. M. J., and Noels, H. (2022) Impact of uremic toxins on endothelial dysfunction in chronic kidney disease: a systematic review, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 531, <https://doi.org/10.3390/ijms23010531>.
54. Roumeliotis, S., Mallamaci, F., and Zoccali, C. (2020) Endothelial dysfunction in chronic kidney disease, from biology to clinical outcomes: a 2020 update, *J. Clin. Med.*, **9**, 2359, <https://doi.org/10.3390/jcm9082359>.
55. Kutikhin, A. G., Shishkova, D. K., Velikanova, E. A., Sinitsky, M. Y., Sinitskaya, A. V., and Markova, V. E. (2022) Endothelial dysfunction in the context of blood-brain barrier modeling, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **58**, 781-806, <https://doi.org/10.1134/S0022093022030139>.
56. Ferrucci, L., and Fabbri, E. (2018) Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty, *Nat. Rev. Cardiol.*, **15**, 505-522, <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2>.
57. Liberale, L., Montecucco, F., Tardif, J. C., Libby, P., and Camici, G. G. (2020) Inflamm-ageing: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease, *Eur. Heart J.*, **41**, 2974-2982, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz961>.
58. Walker, K. A., Basisty, N., Wilson, D. M., 3rd, and Ferrucci, L. (2022) Connecting aging biology and inflammation in the omics era, *J. Clin. Invest.*, **132**, e158448, <https://doi.org/10.1172/JCI158448>.
59. Li, X., Li, C., Zhang, W., Wang, Y., Qian, P., and Huang, H. (2023) Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies, *Signal Transduct. Target Ther.*, **8**, 239, <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01502-8>.
60. Kuro-O, M. (2021) Phosphate as a pathogen of arteriosclerosis and aging, *J. Atheroscler. Thromb.*, **28**, 203-213, <https://doi.org/10.5551/jat.RV17045>.
61. Tiong, M. K., Holt, S. G., Ford, M. L., and Smith, E. R. (2022) Serum calciprotein monomers and chronic kidney disease progression, *Am. J. Nephrol.*, **53**, 806-815, <https://doi.org/10.1159/000526609>.
62. Kuro-O, M. (2021) Klotho and calciprotein particles as therapeutic targets against accelerated ageing, *Clin. Sci. (Lond.)*, **135**, 1915-1927, <https://doi.org/10.1042/CS20201453>.
63. Gelli, R., Ridi, F., and Baglioni, P. (2019) The importance of being amorphous: calcium and magnesium phosphates in the human body, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **269**, 219-235, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.011>.
64. Pasch, A., Jahnens-Dechent, W., and Smith, E. R. (2018) Phosphate, calcification in blood, and mineral stress: the physiologic blood mineral buffering system and its association with cardiovascular risk, *Int. J. Nephrol.*, **2018**, 9182078, <https://doi.org/10.1155/2018/9182078>.
65. Di Marco, G. S., Hausberg, M., Hillebrand, U., Rustemeyer, P., Wittkowski, W., Lang, D., and Pavenstädt, H. (2008) Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis *in vitro*, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **294**, F1381-F1387, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00003.2008>.
66. Shuto, E., Taketani, Y., Tanaka, R., Harada, N., Isshiki, M., Sato, M., Nashiki, K., Amo, K., Yamamoto, H., Higashi, Y., Nakaya, Y., and Takeda, E. (2009) Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **20**, 1504-1512, <https://doi.org/10.1681/ASN.2008101106>.
67. Peng, A., Wu, T., Zeng, C., Rakheja, D., Zhu, J., Ye, T., Hutcheson, J., Vaziri, N. D., Liu, Z., Mohan, C., and Zhou, X. J. (2011) Adverse effects of simulated hyper- and hypo-phosphatemia on endothelial cell function and viability, *PLoS One*, **6**, e23268, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023268>.
68. Yamada, S., Tokumoto, M., Tatsumoto, N., Taniguchi, M., Noguchi, H., Nakano, T., Masutani, K., Ooboshi, H., Tsuruya, K., and Kitazono, T. (2014) Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **306**, F1418-F1428, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00633.2013>.
69. Voelkl, J., Egli-Spichtig, D., Alesutan, I., and Wagner, C. A. (2021) Inflammation: a putative link between phosphate metabolism and cardiovascular disease, *Clin. Sci. (Lond.)*, **135**, 201-227, <https://doi.org/10.1042/CS20190895>.
70. Ding, M., Zhang, Q., Zhang, M., Jiang, X., Wang, M., Ni, L., Gong, W., Huang, B., and Chen, J. (2022) Phosphate overload stimulates inflammatory reaction via PiT-1 and induces vascular calcification in uremia, *J. Ren. Nutr.*, **32**, 178-188, <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2021.03.008>.
71. Hetz, R., Beeler, E., Janoczkin, A., Kiers, S., Li, L., Willard, B. B., Razzaque, M. S., and He, P. (2022) Excessive inorganic phosphate burden perturbed intracellular signaling: quantitative proteomics and phosphoproteomics analyses, *Front. Nutr.*, **8**, 765391, <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.765391>.
72. Heiss, A., Eckert, T., Aretz, A., Richtering, W., van Dorp, W., Schäfer, C., and Jahnens-Dechent, W. (2008) Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles, *J. Biol. Chem.*, **283**, 14815-14825, <https://doi.org/10.1074/jbc.M709938200>.
73. Dridi, H., Kushnir, A., Zalk, R., Yuan, Q., Melville, Z., and Marks, A. R. (2020) Intracellular calcium leak in heart failure and atrial fibrillation: a unifying mechanism and therapeutic target, *Nat. Rev. Cardiol.*, **17**, 732-747, <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0394-8>.

74. Arnold, A., Dennison, E., Kovacs, C. S., Mannstadt, M., Rizzoli, R., Brandi, M. L., Clarke, B., and Thakker, R. V. (2021) Hormonal regulation of biomineralization, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **17**, 261-275, <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00477-2>.
75. Collins, M. T., Marcucci, G., Anders, H. J., Beltrami, G., Cauley, J. A., Ebeling, P. R., Kumar, R., Linglart, A., Sangiorgi, L., Towler, D. A., Weston, R., Whyte, M. P., Brandi, M. L., Clarke, B., and Thakker, R. V. (2022) Skeletal and extraskeletal disorders of biomineralization, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **18**, 473-489, <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00682-7>.
76. Shishkova, D. K., Sinitskaya, A. V., Sinitsky, M. Y., Matveeva, V. G., Velikanova, E. A., Markova, V. E., and Kutikhin, A. G. (2022) Spontaneous endothelial-to-mesenchymal transition in human primary umbilical vein endothelial cells, *Compl. Iss. Cardiovasc. Dis.*, **11**, 97-114, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2022-11-3-97-114>.
77. Bogdanov, L. A., Velikanova, E. A., Kanonykina, A. Y., Frolov, A. V., Shishkova, D. K., Lazebnaya, A. I., and Kutikhin, A. G. (2022) Vascular smooth muscle cell contractile proteins as universal markers of vessels of microcirculatory bed, *Compl. Iss. Cardiovasc. Dis.*, **11**, 162-176, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2022-11-3-162-176>.
78. Wang, B., Han, J., Elisseeff, J. H., and Demaria, M. (2024) The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **25**, 958-978, <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00727-x>.
79. Mehdizadeh, M., Aguilar, M., Thorin, E., Ferbeyre, G., and Nattel, S. (2022) The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance, *Nat. Rev. Cardiol.*, **19**, 250-264, <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00624-2>.
80. Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., and d'Adda di Fagagna, F. (2021) Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 75-95, <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>.
81. Ewence, A. E., Bootman, M., Roderick, H. L., Skepper, J. N., McCarthy, G., Epple, M., Neumann, M., Shanahan, C. M., and Proudfoot, D. (2008) Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization, *Circ. Res.*, **103**, e28-e34, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.181305>.
82. Jäger, E., Murthy, S., Schmidt, C., Hahn, M., Strobel, S., Peters, A., Stäubert, C., Sungur, P., Venus, T., Geisler, M., Radusheva, V., Raps, S., Rothe, K., Scholz, R., Jung, S., Wagner, S., Pierer, M., Seifert, O., Chang, W., Estrela-Lopis, I., Raulien, N., Krohn, K., Sträter, N., Hoeppener, S., Schöneberg, T., Rossol, M., and Wagner, U. (2020) Calcium-sensing receptor-mediated NLRP3 inflammasome response to calciprotein particles drives inflammation in rheumatoid arthritis, *Nat. Commun.*, **11**, 4243, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17749-6>.
83. Tournis, S., Makris, K., Cavalier, E., and Trovas, G. (2020) Cardiovascular risk in patients with primary hyperparathyroidism, *Curr. Pharm. Des.*, **26**, 5628-5636, <https://doi.org/10.2174/1381612824999201105165642>.
84. Bkaily, G., and Jacques, D. (2023) Calcium homeostasis, transporters, and blockers in health and diseases of the cardiovascular system, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 8803, <https://doi.org/10.3390/ijms24108803>.
85. Minisola, S., Arnold, A., Belyaia, Z., Brandi, M. L., Clarke, B. L., Hannan, F. M., Hofbauer, L. C., Insogna, K. L., Lacroix, A., Liberman, U., Palermo, A., Pepe, J., Rizzoli, R., Wermers, R., and Thakker, R. V. (2022) Epidemiology, pathophysiology, and genetics of primary hyperparathyroidism, *J. Bone Miner. Res.*, **37**, 2315-2329, <https://doi.org/10.1002/jbmr.4665>.
86. Tonon, C. R., Silva, T. A. A. L., Pereira, F. W. L., Queiroz, D. A. R., Junior, E. L. F., Martins, D., Azevedo, P. S., Okoshi, M. P., Zornoff, L. A. M., de Paiva, S. A. R., Minicucci, M. F., and Polegato, B. F. (2022) A review of current clinical concepts in the pathophysiology, etiology, diagnosis, and management of hypercalcemia, *Med. Sci. Monit.*, **28**, e935821, <https://doi.org/10.12659/MSM.935821>.
87. Lang, I. M., and Schleef, R. R. (1996) Calcium-dependent stabilization of type I plasminogen activator inhibitor within platelet alpha-granules, *J. Biol. Chem.*, **271**, 2754-2761, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2754>.
88. Liu, Q., Möller, U., Flügel, D., and Kietzmann, T. (2004) Induction of plasminogen activator inhibitor I gene expression by intracellular calcium via hypoxia-inducible factor-1, *Blood*, **104**, 3993-4001, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1017>.
89. Peiretti, F., Fossat, C., Anfosso, F., Alessi, M. C., Henry, M., Juhan-Vague, I., and Nalbone, G. (1996) Increase in cytosolic calcium upregulates the synthesis of type 1 plasminogen activator inhibitor in the human histiocytic cell line U937, *Blood*, **87**, 162-173, <https://doi.org/10.1182/blood.V87.1.162.162>.
90. Heiss, A., DuChesne, A., Denecke, B., Grötzing, J., Yamamoto, K., Renné, T., and Jähnen-Dechent, W. (2003) Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A: formation of colloidal calciprotein particles, *J. Biol. Chem.*, **278**, 13333-13341, <https://doi.org/10.1074/jbc.M210868200>.
91. Schäfer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., Müller-Esterl, W., Schinke, T., and Jähnen-Dechent, W. (2003) The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification, *J. Clin. Invest.*, **112**, 357-366, <https://doi.org/10.1172/JCI17202>.

92. Heiss, A., Jahnens-Decent, W., Endo, H., and Schwahn, D. (2007) Structural dynamics of a colloidal protein-mineral complex bestowing on calcium phosphate a high solubility in biological fluids, *Biointerphases*, **2**, 16-20, <https://doi.org/10.1116/1.2714924>.
93. Rochette, C. N., Rosenfeldt, S., Heiss, A., Narayanan, T., Ballauff, M., and Jahnens-Decent, W. (2009) A shielding topology stabilizes the early stage protein-mineral complexes of fetuin-A and calcium phosphate: a time-resolved small-angle X-ray study, *Chembiochem*, **10**, 735-740, <https://doi.org/10.1002/cbic.200800719>.

## PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS OF CALCIPROTEIN PARTICLES TRIGGER ACTIVATION AND PRO-INFLAMMATORY RESPONSE IN ENDOTHELIAL CELLS AND MONOCYTES

**D. K. Shishkova, V. E. Markova, Y. O. Markova, M. Yu. Sinitsky,  
A. V. Sinitskaya, V. G. Matveeva, E. A. Torgunakova, A. I. Lazebnaya,  
A. D. Stepanov, and A. G. Kutikhin\***

*Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,  
650002 Kemerovo, Russia; e-mail: kytiag@kemcardio.ru*

Supraphysiological concentrations of calciprotein particles (CPPs), which are indispensable scavengers of excessive  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  ions in blood, induce pro-inflammatory activation of endothelial cells (ECs) and monocytes. Here, we determined physiological levels of CPPs (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  calcium, corresponding to 10% increase in  $\text{Ca}^{2+}$  in the serum or medium) and investigated whether the pathological effects of calcium stress depend on the calcium delivery form, such as  $\text{Ca}^{2+}$  ions, albumin- or fetuin-centric calciprotein monomers (CPM-A/CPM-F), and albumin- or fetuin-centric CPPs (CPP-A/CPP-F). The treatment with CPP-A or CPP-F upregulated transcription of pro-inflammatory genes (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*) and promoted release of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, MCP-1/CCL2, and MIP-3 $\alpha$ /CCL20) and pro- and anti-thrombotic molecules (PAI-1 and uPAR) in human arterial ECs and monocytes, although these results depended on the type of cell and calcium-containing particles. Free  $\text{Ca}^{2+}$  ions and CPM-A/CPM-F induced less consistent detrimental effects. Intravenous administration of  $\text{CaCl}_2$ , CPM-A, or CPP-A to Wistar rats increased production of chemokines (CX3CL1, MCP-1/CCL2, CXCL7, CCL11, CCL17), hepatokines (hepassocin, fetuin-A, FGF-21, GDF-15), proteases (MMP-2, MMP-3) and protease inhibitors (PAI-1) into the circulation. We concluded that molecular consequences of calcium overload are largely determined by the form of its delivery and CPPs are efficient inducers of mineral stress at physiological levels.

**Keywords:** calciprotein particles, calciprotein monomers, calcium ions, calcium stress, mineral stress, endothelial cells, monocytes, endothelial dysfunction, endothelial activation, systemic inflammatory response